UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCELO BORGES CAVALCANTE

GASTROSQUISE EXPERIMENTAL EM FETOS DE RATAS: AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL E CONTRATILIDADE GÁSTRICA

FORTALEZA

2012

MARCELO BORGES CAVALCANTE

GASTROSQUISE EXPERIMENTAL EM FETOS DE RATAS: AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL E CONTRATILIDADE GÁSTRICA

Tese submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho.

FORTALEZA

2012

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

C364g Cavalcante, Marcelo Borges.

Gastrosquise experimental em fetos de ratas: avaliação da inflamação intestinal e contratilidade gástrica. / Marcelo Borges Cavalcante. – 2012.

142 f.: il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Clínica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Doutorado em Ciências Médicas, Fortaleza, 2012.

Área de concentração: Ciências Médicas.

Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza.

Co-Orientação: Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho.

1. Gastrosquise. 2. Contração Muscular. 3. Estômago. 4. Fundo Gástrico. 5. Dilatação Gástrica. I. Título.

CDD 616.33

MARCELO BORGES CAVALCANTE

GASTROSQUISE EXPERIMENTAL EM FETOS DE RATAS: AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO INTESTINAL E CONTRATILIDADE GÁSTRICA

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em: 07/12/2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
(Orientador UFC)

Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho
(Co-orientador)

Prof. Dr. Ricardo Barini
(UNICAMP)

Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto
(FMRP-USP)

Prof. Dr. Helvécio Neves Feitosa
(UNIFOR)

Profa. Dra. Raquel Autran Coelho
(UFC)

Ao meu saudoso pai, que muito contribuiu com minha formação, apesar de nos ter deixado precocemente. Essa conquista também é dele.

À minha mãe, a maior responsável pela minha educação, sua determinação foi essencial nessa vitória.

À minha esposa, que compreende minhas dificuldades e ajuda a superá-las, minha sustentação para as conquistas.

À minha filha e meu filho, os estimuladores para os novos desafios, as vitórias são por eles e para eles.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Antônio Aldo Melo Filho, coorientador, o grande responsável por tudo. Participou de todas as etapas dessa vitória, sempre muito entusiasmado e otimista. Obrigado mesmo.

Ao Professor Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza, orientador, por ter acreditado nesse projeto e pela forma tranquila que o conduziu.

Ao Professor Lourenço Sbragia pela ajuda nos primeiros experimentos e pela parceria nos eventos científicos.

Ao Professor Pedro Magalhães e aos colegas Franzé e Willi pela orientação e ajuda nos experimentos da contratilidade gástrica.

Ao grupo de estudo em medicina fetal da UFC, em especial aos alunos Fabrício e Oliveira, parceiros de todas as horas nos experimentos.

Aos professores, alunos da graduação, pós-graduação e funcionários do LAFICA e da pós-graduação em Ciências Médicas por terem dado o suporte nos nossos experimentos.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a essa conquista.

"Um homem deixa de ser um principiante em qualquer ciência e se torna um mestre quando aprende que vai ser um principiante a vida inteira."

(Robin George Collingwood)

RESUMO

Introdução: Gastrosquise é um defeito congênito de fechamento da parede abdominal, com herniação das alças intestinais, ficando em contato com líquido amniótico (LA). As alterações estruturais e a dismotilidade intestinal já são bem descritas em modelos animais de gastrosquise. Porém, pouco se conhece sobre a motilidade gástrica em fetos com gastrosquise. **Objetivo:** Determinar a influência do tempo de exposição das alças intestinais e a eficácia da corticoterapia sobre parâmetros morfométricos e avaliar a contratilidade gástrica em fetos de ratas com gastrosquise experimental. **Material e métodos:** Utilizou-se o modelo experimental de gastrosquise em fetos de ratas *Wistar*. Para a avaliação do tempo de exposição das alças intestinais ao LA, sobre os parâmetros morfométricos, dois grupos de fetos foram estudados: fetos de ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação. Para a avaliação da eficácia da corticoterapia, sobre os parâmetros morfométricos, dois grupos de fetos foram estudados: fetos de ratas operadas com 18,5 dias de gestação com e sem tratamento com dexametasona. Para avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e da contratilidade gástrica, foram estudados fetos de ratas operadas com 18,5 dias de gestação sem tratamento com dexametasona. Cada grupo foi composto por subgrupos de fetos submetidos à gastrosquise (G), controle (C) e *sham* (Sh). *Morfometria*: Avaliou-se a massa corpórea (MC), massa (MI) e comprimento intestinal (CI). *Atividade MPO*: Mediu-se a atividade MPO no intestino e no estômago. *Contratilidade gástrica:* Avaliou-se a contratilidade em segmentos de fundo e antro gástrico. As diferenças entre os Grupos e subgrupos foram testadas pelo método ANOVA ($p<0,05$). **Resultados:** *Tempo de exposição*: não houve diferença significativa entre as variáveis morfométricas analisadas, quando comparados os grupos com tempos de exposição diferentes. Corticoterapia: o tratamento materno com dexametasona reduziu o encurtamento intestinal dos fetos com gastrosquise. *Atividade MPO:* Fetos, submetidos à gastrosquise experimental, apresentaram elevação da atividade da MPO intestinal, e não houve diferença na atividade MPO gástrica entre os subgrupos. *Contratilidade gástrica:* Em condições basais, contrações oscilatórias espontâneas de antro e fundo de G, Sh e C foram semelhantes. As concentrações cumulativas de Carbacol (CCh) produziram um aumento significativo em amplitude e frequência das contrações espontâneas no músculo liso antral e um aumento sustentado da tonicidade em segmentos fúndicos. Não houve diferença significativa na freqüência ou amplitude observada em tecidos antrais. Também, em músculo liso fúndico, nenhuma diferença significativa foi observada, comparando a contratilidade dos grupos com a curva de CCh induzida na sequência em um formato sigmóide típico, dependente de concentrações crescentes. **Conclusões:** O tempo de exposição não interferiu nas alterações morfométricas de fetos com gastrosquise experimental. A corticoterapia mostrou-se benéfica na redução de danos morfométricos no intestino. As respostas gástricas contráteis para CCh são preservadas em fetos de ratos submetidos à gastrosquise experimental, sugerindo que a dilatação gástrica pode ocorrer apenas secundária à inflamação intestinal.

Palavras-chave: Gastrosquise. Contração muscular. Estômago. Fundo gástrico. Dilatação gástrica.

ABSTRACT

Introduction: Gastroschisis is a congenital defect of the abdominal wall closure, with herniation of the intestines, getting in contact with amniotic fluid (AF). Structural changes and intestinal dysmotility are well described in animal models of gastroschisis. However, little is known about gastric motility in fetuses with gastroschisis. **Objective:** To determine the influence of time of exposure of the bowel and efficacy of corticosteroid therapy on morphometric parameters and evaluate the gastric contractility in fetal rats with experimental gastroschisis. **Methods:** We used the experimental model of gastroschisis in fetal Wistar. To evaluate the exposure time of the bowel to AF on morphometric parameters, two groups of fetuses were studied: fetuses of rats operated at 18.5 and 19.5 days of gestation. To evaluate the efficacy of corticosteroid therapy on morphometric parameters, two groups of fetuses were studied: fetuses of rats operated at 18.5 days of pregnancy with and without dexamethasone treatment. To evaluate the activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) and gastric contractility were studied fetuses of rats operated at 18.5 days of pregnancy without treatment. Each group was composed of subgroups of fetuses undergoing gastroschisis (G), control (C) and sham (Sh). Morphometrics: We evaluated the body mass (BM), mass (IM) and intestinal length (IL). MPO activity: We measured MPO activity in the intestine and stomach. Gastric Contractility: contractility was assessed in segments of background and gastric antrum. Differences between groups and subgroups were tested using ANOVA ($p < 0.05$). **Results:** Exposure time: no significant difference between the morphometric variables analyzed, comparing the groups with different time of exposure days. Glucocorticoid therapy: maternal treatment with dexamethasone prevented the shortening of intestinal fetuses with gastroschisis. MPO activity: Fetuses with gastroschisis undergoing gastroschisis with 18.5 days showed elevated intestinal MPO activity, and there was no difference in gastric MPO activity between subgroups. Gastric Contractility: At baseline, spontaneous oscillatory contractions of the antrum and fund G, Sh and C were similar. The cumulative concentrations of carbachol (CCh) produced a significant increase in amplitude and frequency of spontaneous contractions and antral smooth muscle tonicity a sustained increase in fundic segments. There was no significant difference in the frequency or amplitude observed in antral tissues. Also, in fundic smooth muscle, no significant difference was observed comparing the contractility of the groups with the curve of CCh induced following a typical sigmoid shape, dependent on increasing concentrations. **Conclusions:** The time did not interfere in morphometric changes of experimental fetuses with gastroschisis. Steroid therapy was beneficial in reducing morphometric damage in fetuses with experimental gastroschisis. The gastric contractile responses to CCh are preserved in rat fetuses subjected to experimental gastroschisis. These results do not support the theory that gastric dilation can only occur secondary to intestinal inflammation.

Keywords: gastroschisis, muscle contraction, stomach, gastric fundus, gastric dilatation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1	Incidências de gastrosquise em diferentes países da América Latina.....	22
QUADRO 2	Incidências de gastrosquise em diferentes países da Europa.....	23
QUADRO 3	Principais diferenças entre gastrosquise e onfalocele.....	25
FIGURA 1	Cronologia do período gestacional e procedimentos experimentais.....	43
FIGURA 2	Modelo experimental de gastrosquise.....	45
FIGURA 3	Etapas da coleta de amostras.....	51
FIGURA 4	Esquema mostrando segmentos de fundo e o antro de cada amostra do estômago (seccionados em forma de anel), isolados e suspensos, utilizando um fio de algodão não extensível, a um transdutor de força.....	52
FIGURA 5	Sistema de avaliação da contratilidade gástrica.....	53
FLUXOGRAMA 1	Delineamento experimental para estudo da morfometria em diferentes tempos cirúrgicos.....	46
FLUXOGRAMA 2	Delineamento experimental para estudo da morfometria no tratamento com dexametasona.....	47
FLUXOGRAMA 3	Delineamento experimental para estudo da MPO e contratilidade gástrica.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Gráfico comparando as medidas da massa corpórea dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.....	57
GRÁFICO 2	Gráfico comparando as medidas da massa intestinal dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.....	58
GRÁFICO 3	Gráfico comparando as medidas do comprimento intestinal dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.....	59
GRÁFICO 4	Gráfico comparando as medidas da relação MI/MC dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.....	60
GRÁFICO 5	Gráfico comparando as medidas da relação MI/CI dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.....	61
GRÁFICO 6	Gráfico comparando as medidas da relação MC-MI dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.....	62
GRÁFICO 7	Gráfico comparando as medidas da massa corpórea dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona.....	63
GRÁFICO 8	Gráfico comparando as medidas da massa intestinal dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona.....	64
GRÁFICO 9	Gráfico comparando as medidas do comprimento intestinal dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona.....	66

GRÁFICO 10 Gráfico comparando as medidas da relação MI/MC dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona..... 67

GRÁFICO 11 Gráfico comparando as medidas da relação MI/CI dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona..... 68

GRÁFICO 12 Gráfico comparando as medidas da relação MC-MI dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona..... 69

GRÁFICO 13 Gráfico comparando a atividade da enzima mieloperoxidade intestinal dos fetos controle, sham e com gastrosquise, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento..... 72

GRÁFICO 14 Gráfico comparando a atividade da enzima mieloperoxidade gástrica dos fetos controle, sham e com gastrosquise, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento..... 73

GRÁFICO 15 Gráfico comparando efeitos da adição de carbacol em segmentos gástricos dos fetos com gastrosquise, controle e sham, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento..... 74

GRÁFICO 16 Comparação da resposta induzida por carbacol em segmentos de antro gástrico dos fetos com gastrosquise, controle e sham, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento..... 75

GRÁFICO 17 Comparação da resposta induzida por carbacol em segmentos de fundo gástrico dos fetos com gastrosquise, controle e sham, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento..... 76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Resultados da morfometria nos grupos de ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.....	70
TABELA 2	Resultados da morfometria nos grupos de ratas operadas com 18,5, não tratadas e tratadas com dexametasona.....	71
TABELA 3	Parâmetros da contratilidade da musculatura lisa em segmentos de estômago de fetos de ratos.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP	Alfafetoproteína
ANOVA	Análise de variância
C	Grupo controle
CCh	Carbacol
C-Dx	Grupo controle tratado com dexametasona
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CI	Comprimento intestinal
CID-10	Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde - Décima Revisão
DP	Desvio padrão
EC50	Concentração de Carbacol que alcança 50% do efeito máximo
ECLAMC	Estudo Colaborativo Latinoamericano de Malformações Congênitas
Emax	Efeito máximo
EUROCAT	*European surveillance of congenital anomalies*
G	Grupo gastrosquise
G-Dx	Grupo gastrosquise tratado com dexametasona
HTAB	*Hexadecyltrimethylammonium bromide*
LA	Líquido amniótico
MPO	Mieloperoxidase
Min	Minuto
MC	Massa corpórea

MC-MI	Massa corpórea menos massa intestinal
MI/CI	Massa intestinal dividido pelo comprimento intestinal
MI/MC	Massa intestinal dividido pela massa corpórea
MI	Massa intestinal
RCIU	Restrição de crescimento intrauterino
Sh	Grupo *sham*
Sh-Dx	Grupo *sham* tratado com dexametasona
UFC	Universidade Federal do Ceará
VATER	Anomalias vertebrais, atresia anal, fístula traqueoesofágica, anomalia do lado radial dos membros superiores

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CO_2	Dióxido de carbono
G	Gauge
g	Gramas
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
mg	Miligrama
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mm	Milímetros
mM	Milimol
NaCl	Cloreto de sódio
NaH_2PO_4	Diidrogeno fosfato de sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
O_2	Oxigênio
rpm	Rotações por minuto
µl	Microlitro
µM	Micromol/litro ou Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 20

1.1 Gastrosquise em humanos: definição e aspectos históricos..... 20

1.2 Prevalência, fatores de risco e aspectos epidemiológicos..... 21

1.3 Patogênese da gastrosquise em humanos..... 26

1.4 Importância do diagnóstico pré-natal, preditores, conduta pré-natal e neonatal..... 27

1.5 Evolução natural, mortalidade e morbidade..... 31

1.6 Modelos experimentais de gastrosquise em animais..... 33

1.7 Anatomia e fisiologia gastrointestinal..... 34

1.8 Lesão intestinal e gástrica na gastrosquise..... 37

2 OBJETIVOS..... 40

2.1 Objetivo geral..... 40

2.2 Objetivos específicos..... 40

3 MATERIAL E MÉTODOS..... 42

3.1 Animal..... 42

3.2 Modelo experimental..... 42

3.3 Delineamento experimental..... 46

3.3.1 Tempo de exposição intestinal - Análise morfométrica..... 46

3.3.2 Tratamento com dexametasona – Análise morfométrica..... 47

3.3.3 Estudo Mieloperoxidase e contratilidade gástrica – Definição de grupos..... 48

3.4 Coleta de amostras..... 49

3.5 Avaliação morfométrica..... 50

3.6 Avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase..... 51

3.7 Análise da contratilidade gástrica..... 52

3.8 Análise estatística..... 54

4 RESULTADOS..... 56

4.1 Resultados do procedimento cirúrgico..... 56

4.2 Resultados da morfometria: Tempo de exposição intestinal..... 56

4.2.1 Massa corpórea (MC)..... 56

4.2.2 Massa intestinal (MI)..... 57

4.2.3 Comprimento intestinal (CI)..... 59

4.2.4 Relação Massa Intestinal /Massa Corpórea (MI/MC)..... 60

4.2.5 Relação Massa Intestinal / Comprimento Intestinal (MI/CI)..... 61

4.2.6 Diferença Massa Corpórea–Mass Intestinal (MC-MI)..... 62

4.3 Resultados da morfometria: Efeito do tratamento com dexametasona..... 63

4.3.1 Massa corpórea (MC)..... 63

4.3.2 Massa intestinal (MI)..... 64

4.3.3 Comprimento intestinal (CI)..... 65

4.3.4 Relação Massa Intestinal /Massa Corpórea (MI/MC)..... 66

4.3.5 Relação Massa Intestinal / Comprimento Intestinal (MI/CI)..... 67

4.3.6 *Diferença Massa Corpórea–Massa Intestinal (MC-MI)*..... 69

4.4 Resultado do ensaio da MPO..... 72

4.5 Resultado da contratilidade gástrica..... 73

5 DISCUSSÃO..... 79

6 CONCLUSÕES..... 91

REFERÊNCIAS..... 93

APÊNDICES..... 109

ANEXOS..... 139

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gastrosquise em humanos: definição e aspectos históricos

Gastrosquise é uma malformação congênita na parede abdominal, caracterizada por uma falha de seu fechamento embrionário, com exposição de estruturas abdominais, não recobertas por membrana, para a cavidade amniótica. A falha na parede abdominal mede entre 2 e 8 cm, raramente menor de 2 cm, e está localizada, na grande maioria dos casos, à direita do cordão umbilical (raramente à esquerda), que se encontra íntegro. O intestino delgado é a principal estrutura abdominal fetal sempre exposta, por definição, não está rodado e não possui fixação secundária a parede abdominal posterior. Outros órgãos que podem ser eviscerados são: intestino grosso (frequentemente), estômago, porções do sistema geniturinário (ocasionalmente) e o fígado (muito raramente) (LEDBETTER, 2006).

O termo gastrosquise foi proposto, em 1953, como sendo o defeito de fechamento da espessura total da parede abdominal. A palavra deriva do grego que significa "abdome fendido" (*gastro* – ventre; *schism* – fissura). Outros nomes para essa malformação incluem paraonfalocele, laparosquise, abdominosquise e onfalocele rota embrionária (WILSON; JOHNSON, 2004; CHABRA, 2007).

Os relatos históricos não são claros quanto ao primeiro caso de gastrosquise da literatura. As malformações da parede abdominal em humanos são relatadas em inscrições da Era Babilônica, onde se acreditava que haveria um longo período de fome na comunidade onde nascia uma criança com as alças intestinais exteriorizadas (CHABRA, 2007; VALDEZ; COYOTL; VEJA, 2011)

O relato mais antigo, na literatura médica, de um defeito de parede abdominal anterior em fetos humanos é atribuído ao cirurgião francês Ambroise Paré (1510-1590), porém não há certeza se realmente tratava-se de uma gastrosquise (PUTNAN; EMMENS, 1990). Em 1557, Lycosthenes relatou um possível caso de gastrosquise. A descrição de um caso típico de gastrosquise ocorreu somente em 1733, quando Calder relatou a herniação de intestino delgado em um natimorto, com anatomia umbilical normal (CHABRA, 2007).

Ballantyne, em 1904, utilizou o termo gastrosquise para denominar todos os defeitos de parede abdominal, com exceção da hérnia de cordão umbilical fisiológica. Em

1940, Bernstein descreveu a alteração anatômica presente nos casos de gastrosquise, como sendo a ausência de saco herniário envolvendo as alças intestinais expostas, na presença de cordão umbilical normal, diferenciando dos casos de onfalocele, em que existe alteração do cordão umbilical e as alças intestinais estão recobertas com uma membrana. Finalmente, em 1953, Moore e Stokes propuseram um sistema de classificação para diferenciar as malformações de parede abdominal (VALDEZ; COYOTL; VEGA, 2011).

Na versão atual da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde - Décima Revisão (CID-10) a gastrosquise está classificada no Capítulo XVII (Malformações congênitas, deformidades e anomalias cromossômicas), no grupo de Malformações congênitas e deformidades do aparelho osteomuscular sob o código Q79.3 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000).

1.2 Prevalência, fatores de risco e aspectos epidemiológicos

Durante as últimas décadas, a incidência da gastrosquise em diferentes países do mundo tem apresentado uma elevação significante (CASTILLA; MASTROIACOVO; ORIOLI, 2008; HOLLAND; WALKER; BADAWI, 2010). A incidência mundial em 1974 era de 0,29 para cada 10.000 nascidos vivos e 1,66 para cada 10.000 nascidos vivos no ano de 1998, chegando a números atuais de 4 a 7 casos novos por cada 10.000 nascidos vivos (LOANE; DOLK; BRADBURY, 2007; LOANE *et al*., 2011).

O motivo para essa elevação no número de nascimentos de crianças com gastrosquise é muito discutido. Porém, ela não se deve somente a melhoria dos métodos para diagnóstico no período gestacional. Possivelmente, outros fatores como a exposição à fatores de risco ambientais, uso de drogas, medicamentos e dieta inadequada parecem ser os principais responsáveis por esse novo quadro mundial (HOLLAND; WALKER; BADAWI, 2010).

Um estudo em um banco de dados americano, no período de 2004 a 2006, revelou que a incidência de gastrosquise é de 4,49 casos para cada 10.000 nascimentos, com uma estimativa anual de 1.900 novos casos por ano (PARKER *et al*., 2010).

Durante um período de 10 anos (1999-2008), o banco de dados europeu EUROCAT (*European surveillance of congenital anomalies*) detectou o nascimento de

84.529 crianças com malformações congênitas não genéticas. Desse total, 2.298 casos eram de malformações de parede abdominal, sendo 1.248 casos de gastrosquise em 10 anos, representando uma prevalência, nesse período, de 2,98 casos para cada 10.000 nascimentos. A gastrosquise esteve entre as anomalias congênitas com elevação de incidência no período investigado, com uma taxa de crescimento de sua incidência variando de 2 a 6% a cada dois anos. As outras malformações congênitas com elevação da incidência nesse mesmo período foram: displasia renal, hipospádia e síndrome de Edward (trissomia do cromossomo 18) (LOANE *et al*., 2011).

Os dados do Estudo Colaborativo Latino-americano de Malformações Congênitas (ECLAMC), no período de 1995 a 2008, avaliando 2.409.407 nascimentos, revelaram que a incidência da gastrosquise na América Latina foi de 4,1 casos para cada 10.000 nascimentos, com uma grande variação entre os países colaboradores. A incidência de gastrosquise, no Brasil foi de 7,5 por 10.000 nascidos vivos (NAZER; CIFUENTES, 2011). (QUADRO 1)

QUADRO 1 – Incidências de gastrosquise em diferentes países da América Latina.

GASTROSQUISE EM DIFERENTES PAÍSES DA AMÉRICA LATINA	
PAÍS	**INCIDÊNCIA DE GASTROSQUISE**
Equador	0,8 / 10.000 nascimentos
Bolívia	1,2 / 10.000 nascimentos
Uruguai	1,4 / 10.000 nascimentos
Chile	2,4 / 10.000 nascimentos
Venezuela	2,8 / 10.000 nascimentos
Argentina	4,1 / 10.000 nascimentos
Paraguai	4,5 / 10.000 nascimentos
Colômbia	6,9 / 10.000 nascimentos
Brasil	**7,5 / 10.000 nascimentos**

Fonte: (NAZER; CIFUENTES, 2011).

Existem variações geográficas na incidência de gastrosquise em diferentes regiões do mundo. Na Europa, por exemplo, a incidência varia de 0,71 por cada 10.000 nascimentos em Portugal, a 4,48 por cada 10.000 nascimentos na Alemanha. Foram encontradas diferentes incidências dentro de um mesmo país (LOANE; DOLK; BRADBURY, 2007; BENJAMIN *et al*., 2010; LOANE *et al*., 2011) (QUADRO 2).

O recente crescimento no número de casos de gastrosquise em todo o mundo, também é preocupante do ponto de vista financeiro. Dados americanos revelam um aumento nos gastos com o tratamento de recém-nascidos com gastrosquise, correspondendo a despesas hospitalares anuais de 200 a 240 milhões de dólares (CASTILLA; MASTROIACOVO; ORIOLI, 2008). Na Inglaterra, os custos com tratamento de neonatos com gastrosquise elevaram-se consideravelmente, indo de 3,6 milhões de libras em 1996 para 15 milhões de libras em 2008 (KEYS; DREWETT; BURGE, 2008).

QUADRO 2 – Incidências de gastrosquise em diferentes países da Europa.

GASTROSQUISE EM DIFERENTES PAÍSES DA EUROPA	
PAÍS (Cidade)	**INCIDÊNCIA DE GASTROSQUISE**
Portugal	0,71 / 10.000 nascimentos
Holanda	0,92 / 10.000 nascimentos
Bélgica	1,03 / 10.000 nascimentos
Espanha (Barcelona)	1,09 / 10.000 nascimentos
Dinamarca	1,31 / 10.000 nascimentos
Croácia	1,58 / 10.000 nascimentos
Grã-bretanha (Glasgow)	1,81 / 10.000 nascimentos
Grã-bretanha (País de Gales)	4,29 / 10.000 nascimentos
Alemanha (Mainz)	4,48 / 10.000 nascimentos

Fonte: (LOANE; DOLK; BRADBURY, 2007).

Embora a causa da gastrosquise ainda seja desconhecida, os inúmeros estudos epidemiológicos descreveram vários fatores de risco relacionados com essa malformação. Dados epidemiológicos revelam que mulheres jovens, menores de 20 anos de idade, possuem um maior risco de ter filhos com gastrosquise, especialmente em países desenvolvidos (VU *et*

al., 2008). Os motivos para essa preferência de idade ainda são desconhecidos, existem suspeitas que fatores teratogênicos relacionados ao estilo de vida desse grupo etário estejam envolvidos. Os registros da EUROCAT observaram que a elevação da incidência nos últimos anos ocorreu em todas as faixas etárias, não estando limitada às gestantes jovens (LOANE; DOLK; BRADBURY, 2007).

Estudos demonstraram que a raça também pode ser fator de risco, sendo mais freqüente, os casos de gastrosquise, em mulheres caucasianas e hispânicas (CANFIELD *et al*., 2006). Mães brancas não-hispânicas e hispânicas nascidas nos Estados Unidos apresentaram maior número de casos de gastrosquises do que as mães negras e hispânicas estrangeiras (ABDULLAH *et al*., 2007; ARNOLD *et al*., 2007).

Além do fator geográfico, etário e racial, outros fatores de risco estão relacionados com um maior risco para gastrosquise, como: tabagismo, alcoolismo, com baixo nível socioeconômico, uso de aspirina, drogas ilícitas (anfetamina, maconha, cocaína e *ecstasy*), dieta materna inadequada, infecções urinárias no início da gestação e baixo índice de massa corpórea (RASMUSSEN; FRÍAS, 2008).

O envolvimento de fatores genéticos na etiologia da gastrosquise é muito discutido. Apesar de serem descritos casos de ocorrência familiar, essa não é a regra. Em um grande estudo internacional, que avaliou a causa genética de 24 defeitos congênitos, as anormalidades cromossômicas foram observadas em apenas 1,2% dos casos de gastrosquise, principalmente as trissomias (VALDEZ; COYOTL; VEGA, 2011).

A ocorrência familiar de casos de gastrosquise tem sido descrita. Porém, entre os indivíduos afetados pela gastrosquise, a história familiar de um parente acometido só ocorre em 4,7% dos casos. O risco de recorrência da gastrosquise entre irmãos está entre 3% a 5% (VALDEZ; COYOTL; VEJA, 2011).

Alguns trabalhos mostram uma maior incidência da gastrosquise entre os fetos do sexo masculino, porém não é um dado de consenso na literatura, visto que a maioria das publicações revelou não haver predileção por sexo (SBRAGIA *et al.*, 1999; PATRONI *et al.*, 2000; RASMUSSEN; FRÍAS, 2008).

A duas principais malformações congênitas de parede abdominal são gastrosquise e onfalocele. O diagnóstico preciso entre as duas é importante, pois são patologias com

complicações e prognósticos distintos. A principal diferença entre essas malformações é a forma com que as alças intestinais estão expostas na cavidade amniótica. Nos casos de gastrosquise, as alças ficam em contato direto com o líquido amniótico, o que não ocorre nos casos de onfalocele, devido à existência de uma membrana que envolve os órgãos extrusados (LEDBETTER, 2006; LEDBETTER, 2012) (QUADRO 3).

QUADRO 3 – Principais diferenças entre gastrosquise e onfalocele.

DIFERENÇAS ENTRE GASTROSQUISE E ONFALOCELE		
	GASTROSQUISE	**ONFALOCELE**
Membrana recobrindo órgãos extrusados	Não	Sim
Localização do defeito na parede abdominal	A direita do umbigo (não inclui o umbigo)	Linha mediana (inclui o umbigo)
Inserção do cordão umbilical	Normal	Alterada
Órgão comumente herniados	Intestino	Intestino e fígado
Anomalias associadas	Incomum	Comum
Prognóstico	Depende da condição intestinal	Depende da anomalia associada

Fonte: (LEDBETTER, 2012), adaptado.

A existência de malformações associadas, intestinais ou não intestinais, é pouco freqüente nos casos de gastrosquise, mas muito freqüente nos casos de onfalocele. O prognóstico nos casos de gastrosquise depende do grau de acometimento das alças intestinais, enquanto que nos casos de onfalocele depende das outras anomalias associadas (LEDBETTER, 2006; LEDBETTER, 2012).

1.3 Patogênese da gastrosquise em humanos

A gastrosquise é um defeito isolado da parede abdominal, ocorre esporadicamente sendo de etiologia multifatorial. Ao longo das últimas décadas, vários autores propuseram diferentes teorias para explicar a fisiopatologia da gastrosquise.

Duhamel, em 1963, sugeriu que a exposição a agentes teratogênicos, durante a quarta semana de gestação, provocaria uma falha na diferenciação do mesênquima embrionário, causando defeitos no crescimento da parede abdominal lateral e, consequentemente, ocorreria a herniação do intestino. Porém, a teoria de Duhamel não especifiou os agentes teratogênicos, nem explicou o mecanismo envolvido na falha embrionária (DUHAMEL, 1963).

Shaw, em 1975, sugeriu que a falha na parede abdominal ocorre por rotura da membrana amniótica na base do cordão umbilical ou retardo do anel umbilical, durante uma herniação fisiológica do intestino. A teoria de Shaw é criticada porque não descreveu a causa da rotura da membrana e não explicou a presença de pele saudável entre o cordão umbilical e o defeito da parede abdominal (SHAW, 1975).

DeVries, em 1980, sugeriu que o defeito na parede abdominal é devido a uma involução anormal da veia umbilical direita (DEVRIES, 1980). Essa teoria é pouco provável porque a involução da veia umbilical ocorre somente após o segundo mês de desenvolvimento embrionário, após o fechamento da parede abdominal, e a veia umbilical não é responsável pela drenagem do mesoderma da região umbilical (CHRISTISON-LAGAY; KELLEHER; LANGER, 2011).

Hoyme, Higginbottom e Jones, em 1981, formularam uma teoria onde ocorre uma interrupção ao fluxo da artéria vitelina direita (onfalomesentérica) na região umbilical. O fluxo ausente ocasionaria infarto e necrose na base do cordão umbilical, com lesão na parede abdominal e exteriorização das alças intestinais (HOYME; HIGGINBOTTOM; JONES, 1981). Porém, posteriormente, foi descrito que a artéria vitelina não é responsável pela vascularização da parede abdominal (FELDKAMP; CAREY; SADLER, 2007).

As teorias propostas discutem a causa primária do defeito da parede abdominal. O resultado dessa malformação congênita é a exteriorização de estruturas abdominais fetais, na grande maioria dos casos, somente alças intestinais e, eventualmente, outros órgãos como

estômago, fígado e bexiga. As alças intestinais expostas, no momento do nascimento, apresentam intenso processo inflamatório, caracterizado por edema e presença de fibrina, contribuindo para as complicações neonatais, como atresias intestinais e enterocolite necrotizante (CHRISTISON-LAGAY; KELLEHER; LANGER, 2011).

Os recentes estudos em humanos e animais sugerem que as complicações no período neonatal não são limitadas às alterações estruturais ou mecânicas, se devem também a modificações funcionais, principalmente alterações na motilidade intestinal, decorrentes ao prolongado contato direto das alças intestinais com líquido amniótico (LA) (OYACHI *et al.*, 2004; MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006; FRANÇA *et al*., 2008; PHILLIPS *et al.*, 2008; HOLLAND; WALKER; BADAWI, 2010). Portanto, compreender os mecanismos inflamatórios e propor terapias capazes de reduzir as complicações intestinais no recém nascido é a forma mais rápida de diminuir a morbidade neonatal. Evitar o defeito embrionário da falha abdominal é uma tarefa árdua, principalmente devido a sua etiologia multifatorial e pouco dependente de um fator genético.

1.4 Importância do diagnóstico pré-natal, preditores, conduta pré-natal e neonatal

Os exames comumente realizados para diagnóstico pré-natal da gastrosquise são a dosagem da alfa-fetoproteína (AFP), ultrassonografia e, recentemente, ressonância nuclear magnética (BRUGGER; PRAYER, 2011). O estudo dos níveis de AFP no soro materno, inicialmente proposto para rastreamento de cromossomopatias e doenças de fechamento do tubo neural, é também utilizado para detecção de malformações de parede abdominal (SALLER, *et al*.,1994). A elevação dos níveis de AFP materna nos casos de gastrosquise é bem mais acentuada, em torno de nove vezes maior que o normal, enquanto nos casos de onfalocele, essa elevação é de cerca de quatro vezes. A avaliação da AFP materna é pouco utilizada em nosso meio (PALOMAKI *et al*., 1988; SALLER, *et al*.,1994; LEDBETTER, 2006; HOLLAND; WALKER; BADAWI, 2010; LEDBETTER, 2012).

O diagnóstico pré-natal ultrassonográfico da gastrosquise é muito variável, com sensibilidade variando entre 20 a 90% das gestantes acometidas, mesmo já sendo possível a partir da 12ª semana de gestação (MORTELLARO *et al*., 2011; CEREKJA; PIAZZE; COZZI, 2012). Na grande maioria dos casos, essa malformação só é descrita entre a 18ª e a 22ª semana de gravidez. A acurácia do exame ultrassonográfico depende do tempo de gestação, da

posição fetal e da experiência do examinador.

A imagem ultrassonográfica típica de um feto com gastrosquise é de múltiplas alças intestinais (eventualmente outros órgãos) flutuando livremente no líquido amniótico (LA), sem nenhuma membrana recobrindo as estruturas herniadas e com o cordão umbilical de aspecto normal, geralmente inserido à esquerda da lesão abdominal. O diagnóstico diferencial deve ser realizado, principalmente, com onfalocele e outras malformações de parede abdominal (LEDBETTER, 2006; LEDBETTER, 2012).

Durante o exame ultrassonográfico de um feto com gastrosquise devem ser observados e acompanhados aspectos, como: crescimento fetal, diâmetro e perfusão das alças intestinais expostas ao LA, espessamento da parede intestinal, peristaltismo intestinal, volume e aspecto do LA, medida do tamanho e da abertura da cavidade abdominal e aspecto do intestino e demais vísceras intra-abdominais (VEGUNTA *et al*., 2005). Diferentes autores investigam a relação de achados ecográficos no período gestacional com o prognóstico neonatal (PATRONI *et al.*, 2000; BADILLO *et al*., 2008; HUH; HIROSE; GOLDSTEIN, 2010; GARCIA *et al.*,2010; KULEVA *et al.*, 2012).

Bond *et al*., em 1988, foram os primeiros a relacionar o aspecto das alças intestinais com o prognóstico neonatal de fetos com gastrosquise. Esses autores observaram que fetos, com gastrosquise que apresentaram achados ultrassonográficos de dilatação e espessamento da parede de alças intestinais em contato com o líquido amniótico, apresentavam um pior prognóstico neonatal (BOND *et al*., 1988). Posteriormente, outros autores investigaram a importância do estudo das alças intestinais para a predição de complicações neonatais. Os dados da literatura ainda não são contundentes, possivelmente por não haver uma padronização na forma de diagnóstico ultrassonográfico e por uma falta de definição de valores de referência para a dilatação e espessamento da parede das alças extrusas (BAHLMANN *et al.*, 1996; PATRONI *et al.*, 2000; BADILLO *et al.*, 2008; DAVIS *et al.*, 2009; HUH; HIROSE; GOLDSTEIN, 2010; MEARS *et al*., 2010; KASSA; LILJA, 2011; WILSON *et al*., 2012). Os mecanismos que justificariam o surgimento das alterações ultrassonográficas nas alças intestinais estariam diretamente relacionados com o processo inflamatório provocado pela exposição ao líquido amniótico, gerando complicações estruturais e funcionais (OYACHI *et al*., 2004; MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006; FRANÇA *et al.*, 2008; GHIONZOLI *et al.*, 2012).

Nos fetos com gastrosquise, parece que as alterações inflamatórias estão limitadas aos órgãos expostos ao líquido amniótico (ALBERT *et al*., 2001). Apesar do estômago raramente ficar em contato com o LA e não ter um envolvimento direto com as complicações neonatais, alguns autores discutem se a sua avaliação ultrassonográfica pode ser um marcador pré-natal de morbidade neonatal. A dilatação do estômago fetal durante a gravidez seria um marcador de mau prognóstico neonatal (BADILLO *et al*., 2008; ALFARAJ *et al*., 2011). Existem descritas relações entre dilatação gástrica fetal com presença de mecônio no momento do parto e com elevada morbimortalidade neonatal (AINA-MUMUNEY *et al*., 2004; ALFARAJ *et al*., 2011). Porém, o motivo dessa dilatação gástrica é desconhecido, se é devido a uma lesão direta do estômago ou se é secundária a uma obstrução intestinal.

Goldstein *et al.*, em 1987, descreveu a curva de normalidade das medidas gástricas em fetos humanos de uma gestação normal, avaliando os diâmetros ântero-posterior e longitudinal. A maioria dos estudos, que avaliam a imagem ultrassonográfica do estômago fetal, utilizam como referência de normalidade a curva de Goldstein, sendo considerados valores alterados as medidas além de dois desvios padrão (BADILLO *et al*., 2008; ALFARAJ *et al*., 2011).

A restrição de crescimento intrauterino (RCIU) na ecografia é um achado bastante variável, de 38-77%, secundário a perda de nutrientes através das alças intestinais expostas. Cerca de metade dos recém-nascidos portadores de gastrosquise são pequenos para idade gestacional. O tipo de restrição RCIU, em fetos com gastrosquise, é simétrico, geralmente, surge já no segundo trimestre. É demonstrado que não apenas a circunferência abdominal é pequena, devido à herniação das alças, mas todos os parâmetros biométricos podem estar abaixo do esperado para a idade gestacional (BADAWI, 2010; PAYNE *et al*., 2011; HOLLAND; WALKER; LEDBETTER, 2012).

Os dados da literatura são controversos sobre a importância do diagnóstico ultrassonográfico pré-natal da gastrosquise. Embora alguns autores sugiram que o diagnóstico antes do parto não modifica o prognóstico neonatal, a identificação da malformação abdominal, ainda durante a gestação, permite o aconselhamento dos pais e facilita a programação do parto, com possível encaminhamento para centros terciários equipados com unidades de terapia intensiva e cirurgiões pediátricos, o que pode ser prescindível no prognóstico, principalmente em países com precariedades em sua saúde pública. A maior acessibilidade a exames ultrassonográficos durante o pré-natal permitiu índices de diagnóstico

de gastrosquise durante a gravidez em torno de 97% dos casos (SBRAGIA *et al.*, 1999; PATRONI *et al.*, 2000; VILELA *et al.*, 2002).

Portanto, em determinados contextos de assistência obstétrica e neonatal, alguns autores demonstraram que o diagnóstico da gastrosquise no período gestacional reduz significantemente a morbimortalidade neonatal (SBRAGIA *et al.*, 1999; NICHOL *et al*., 2008).

Os partos espontâneos de fetos com gastrosquise ocorrem, com maior freqüência, de forma prematura (LAUSMAN *et al*., 2007; BARSEGHYAN; AGHAJANIAN; MILLER, 2012). Alguns autores defendem o parto prematuro, logo que se torna comprovada a maturidade pulmonar fetal, devido à possibilidade de as alças apresentarem menos edema e espessamento, em decorrência de uma menor exposição das mesmas ao LA ao longo do terceiro trimestre (LANGER *et al*., 1993; MOORE *et al.*, 1999; MOIR *et al.*, 2005).

Entretanto, muitos outros autores não observaram benefícios significativos na indicação do parto prematuro. Em 2001, Segel, Marder e Parry, em um trabalho de metanálise, concluíram que não existiam dados que apoiassem a indicação sistemática do parto cesariano para interrupção precoce dessas gestações (SEGEL *et al.*, 2001). Avaliando os casos de gastrosquise em um período de 10 anos, 1992 a 2002, Ergun *et al.* observaram um maior período de internação entre os neonatos com gastrosquise que tiveram o parto antes de 36 semanas, não havendo redução na morbidade entre os casos em que os partos foram antecipados (ERGUN *et al*., 2005).

Outra discussão existente no seguimento pré-natal de gestantes com fetos acometidos por gastrosquise é em relação à via de parto. Os fatores que justificam a cesariana como a melhor via de parto seriam: menor compressão da circulação mesentérica das alças intestinais pelo canal de parto, menor risco de torção durante as contrações uterinas e menor contaminação dos segmentos intestinais expostos. O parto cesariano permitiria, ainda, uma melhor programação da equipe cirúrgica e o tratamento mais precoce (FITZSIMMONS *et al*., 1988; SWIFT *et al*., 1992; SAKALA; ERHARD; WHITE, 1993; MOORE *et al*., 1999).

No entanto, embora as razões aventadas para a indicação do parto cesariano façam sentido na teoria, estas não foram definitivamente comprovadas por muitos outros autores, que publicaram trabalhos comparando os dois tipos de parto nestes pacientes e não detectaram vantagens significativas na indicação do parto cesariano (KIRK; WAH, 1983; BETHEL;

SEASHORE; TOULOUKIAN, 1989; MORETTI *et al*., 1990; LEWIS *et al*., 1990; STRINGER; BRERETON; WRIGHT, 1991; COUGHLIN *et al*., 1993; QUIRK *et al*., 1996; FASHING; MAYR; SAUER, 1996; BLAKELOCK *et al*., 1997; KITCHANAN *et al*., 2000; ANTEBY; YAGEL, 2003; SNYDER *et al*., 2011). Uma metanálise de quinze estudos clínicos não demonstrou diferença significante nas taxas de mortalidade ou de morbidade nas crianças com gastrosquise nascidas por parto normal ou cesariano (SEGEL *et al*., 2001).

1.5 Evolução natural, mortalidade e morbidade

O defeito primário que ocorre nos casos de gastrosquise, como na grande maioria das malformações congênitas, é simples, mas o impacto no desenvolvimento de outros órgãos é muito complexo. Os defeitos secundários, principalmente, envolvendo as alças intestinais, decorrentes da falha de fechamento da parede abdominal são os desafios no acompanhamento de recém-nascidos com gastrosquise (HOLLAND; WALKER; BADAWI, 2010).

O interesse mundial pelo tema é notável a partir dos anos 1960, quando houve um aumento exponencial nas publicações médicas e uma elevação substancial na taxa de sobrevida dos neonatos com gastrosquise, passando de 10 a 20% no início dos anos 1960 para mais de 90% nos dias atuais. Porém, a redução no número de mortes neonatais se deu à custa de grandes investimentos para melhorias nas técnicas cirúrgicas, no suporte nutricional e na qualidade das maternidades e dos serviços neonatais terciários. Nos países em desenvolvimento, essa realidade é um pouco diferente, a taxa de sobrevida neonatal é em torno de 50% (KEYS; DREWETT; BURGE, 2008; HOLLAND; WALKER; BADAWI, 2010).

A baixa mortalidade entre neonatos com gastrosquise é contrastada com a elevada morbidade, principalmente devido ao baixo peso ao nascimento, à prematuridade, ao sofrimento fetal, à presença de malformações intestinais ou não intestinais associadas e aos longos períodos de nutrição parenteral. As condições intestinais ao nascimento, o hipoperistaltismo, múltiplas intervenções cirúrgicas, síndrome do intestino curto e presença de infecção são condições relacionadas a um mau prognóstico neonatal (JAGER; HEIJ, 2007; HENRICH *et al.*, 2008; TANNURI *et al.*, 2011).

Nos Estados Unidos estima-se que a cada ano nascem em torno de 1.500 crianças

com gastrosquise, com uma taxa de sobrevida entre 90-96%, e um custo médio de internação para cada criança de 150.000 dólares, gerando um custo total anual de cuidados médicos e hospitalares em torno de 240 milhões de dólares (NICHOL *et al*., 2008). Os custos são decorrentes de longos períodos de internação (média de 46 dias), de intervenções cirúrgicas realizadas durante a internação (média de 2,3), do número de dias em ventilação mecânica (média 12,75 dias) e do tempo de retorno a motilidade intestinal normal (média de 33 dias) (NICHOL *et al.*, 2008; LAO *et al.*, 2010; TANNURI *et al*., 2011).

Dados de uma série de casos nos Estados Unidos, no período de 2003 a 2008, avaliando 2.490 casos de recém nascidos com gastrosquise, revelaram apenas 90 óbitos (mortalidade de 3,6%). Nesse mesmo estudo, ventilação mecânica foi necessária em 73% dos neonatos e outras comorbidades circulatórias, pulmonares e cardíacas estiveram presentes em 13%, 5% e 2% dos casos, respectivamente (LAO *et al.*, 2010).

Em uma série de casos de um hospital terciário no Brasil, avaliando 163 recém nascidos entre 2003 a 2009, foi encontrada uma mortalidade de 14,1% (23/163) e as comorbidades foram semelhantes das encontradas na literatura. O tempo de internação médio foi 41 dias, 66 (40,5%) dos neonatos apresentaram quadro de infecção e 22 (13,5%) complicaram com atresia e perfuração intestinal (gastrosquise complexa) (TANNURI *et al*., 2011).

Em anos anteriores, entre 1995 a 2011, avaliando-se uma série de 46 casos de gastrosquise no estado de Pernambuco, a mortalidade foi de 53% (26/49 casos). A ausência de pré-natal, prematuridade, baixo peso ao nascer, parto fora de hospitais terciários, longos intervalos entre parto e cirurgia e necessidade de ventilação mecânica foram os fatores relacionados a elevada mortalidade (VILELA *et al*., 2002).

As anomalias associadas à gastrosquise, em sua grande maioria, são de origem intestinal, presentes em 20 a 40% dos casos. Essas anomalias incluem: atresia intestinal, volvo e infartos mesentéricos (PATRONI *et al*., 2000). As outras malformações não intestinais associadas são menos freqüentes, mas não desprezíveis. As cromossomopatias ocorrem em menos de 3% dos casos (HUNTER; STEVENSON, 2008), a criptorquidia é observada em até 31% dos casos (LAWSON; de LA HUNT, 2001) e as malformações cardíacas são diagnosticadas em até 4% dos casos de gastrosquise, bem mais elevada que na população em geral (0,7%) (KUNZ; GILBERT; TOWNER, 2005).

1.6 Modelos experimentais de gastrosquise em animais

Os estudos de modelos experimentais em animais no período perinatal permitem compreender a etiologia e os mecanismos fisiopatológicos de diversas malformações congênitas, bem como facilita o surgimento de novas técnicas cirúrgicas e outras alternativas de tratamento para as crianças acometidas. Diversas malformações fetais já são investigadas através de modelos animais, entre elas: Associação de VATER (anomalias vertebrais, atresia anal, fístula traqueoesofágica, anomalia do lado radial dos membros superiores), Doença de Hirschsprung, Hérnia Diafragmática e Gastrosquise (MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006).

Os modelos animais para estudo da gastrosquise podem ser classificados em três (03) tipos: criados cirurgicamente, criados por indução de agentes teratogênicos e modelos transgênicos (MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006).

Os primeiros modelos experimentais em animais, criados cirurgicamente, para estudar fetos com gastrosquise foram descritos na década de 1970, utilizando coelhas e ovelhas (SHERMAN *et al*., 1973; HALLER *et al*., 1974). Em seguida, na década de 1980, foi descrito um modelo experimental utilizando ovos de galinhas, caracterizado por simples manipulação. Porém, os dados experimentais obtidos em modelos de aves são de difíceis extrapolação para os humanos, devido a grandes diferenças na embriogênese das espécies (KLUCK *et al*., 1983).

Recentemente, em 2001, foi descrito o mais novo modelo animal para estudos de gastrosquise, que utiliza fetos de ratas grávidas. As vantagens da utilização de ratas são: o baixo custo dos experimentos, o curto período gestacional e a disponibilidade de reagentes e marcadores moleculares (CORREIA-PINTO *et al*., 2001).

Os modelos experimentais criados cirurgicamente envolvem procedimentos cirúrgicos em dois tempos, um inicial para a criação da abertura da parede abdominal (incisão paraumbilical direita) e um segundo tempo para a coleta das amostras dos fetos previamente operados. Os modelos permitem uma melhor compreensão da fisiopatologia das alterações intestinais e testar possibilidades terapêuticas.

Estudando os fetos de coelhos com gastrosquise já foi possível identificar uma redução na absorção de nutrientes (prolina e glicose) (SHAW *et al*., 1994), níveis elevados

(2,5x) de óxido nítrico no intestino delgado dos fetos com gastrosquise induzida (BEALER *et al.*, 1996), bem como redução na motilidade intestinal (OYACHI *et al*., 2004). Estudando coelhos, também já foi possível observar uma melhora da hipomotilidade intestinal com o uso de Cisaprida (LANGER; BRAMLETT, 1997).

O modelo utilizando ovelhas permite uma maior avaliação de técnicas cirúrgicas invasivas, devido ao tamanho do animal. A realização de fetoscopia com ligadura do esôfago fetal, impedindo a passagem do líquido amniótico pelo trato digestivo e, possivelmente, evitando a lesão da alça intestinal, não revelou bons resultados (DE LAGAUSIE, *et al.*, 2002).

Estudos avaliando trocas de líquido amniótico que foram realizados com ovos de galinha, sugeriram que a diluição na concentração amniótica de produtos tóxicos (ácidos biliares e bilirrubinas) reduz o dano na estrutura e na contratilidade intestinal (AKTUG *et al.*, 1995; SENCAN *et al.*, 2002).

Estudos em fetos de ratas com gastrosquise já caracterizaram as alterações morfométricas e histopatológicas intestinais, bem como identificaram uma elevação na concentração de óxido nítrico no líquido amniótico (GONÇALVES *et al.*, 2011), imaturidade neuronal nas alças intestinais expostas (FRANÇA *et al.*, 2008), retardo na maturação das células de Cajal e na musculatura lisa dessas alças acometidas (MIDRIO *et al.*, 2004). Nesse modelo também já foi possível realizar teste terapêutico com corticosteroide e observar uso de biomateriais protetores para alças intestinais (BITTENCOURT *et al.*, 2006; VARGUN *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2010).

1.7 Anatomia e fisiologia gastrointestinal

O sistema digestivo fornece ao organismo um suprimento contínuo de água, eletrólitos e nutrientes. Para desempenhar essa função, é necessário: movimento do alimento ao longo do tubo digestivo; digestão dos alimentos, absorção de água, eletrólitos e dos alimentos digeridos; circulação sanguínea ao longo do trato gastrointestinal para transportar os alimentos absorvidos; e controle de todas as funções pelo sistema nervoso e hormonal (ALTAF; SOOD, 2008).

O trato digestivo é um tubo oco que se estende da cavidade oral ao ânus, sendo também chamado de canal alimentar ou trato gastrintestinal. As estruturas do trato digestório

incluem: boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, reto e ânus. O estômago, anatomicamente, é dividido em quatro partes: 1) cárdia, 2) fundo, 3) corpo (antro) e 4) piloro. Um corte histológico típico da parede do tubo digestivo apresenta, da porção mais externa para a luz, as seguintes camadas: serosa, camada muscular longitudinal, camada muscular circular, submucosa e mucosa (ALTAF; SOOD, 2008).

O tubo digestivo possui um sistema nervoso próprio, denominado sistema nervoso entérico. Esse sistema situa-se ao longo de toda a parede intestinal, começando no esôfago e terminado no ânus. O número de neurônios nesse sistema entérico é da ordem de cerca de 500 milhões, quase o mesmo número de neurônios de toda a medula espinhal. O sistema nervoso entérico é formado principalmente por dois plexos: um plexo externo, localizado entre as camadas musculares longitudinal e circular, denominado plexo mioentérico ou plexo de *Auerbach*; e um plexo interno, denominado plexo submucoso ou plexo de *Meissner*. O plexo mioentérico controla principalmente os movimentos gastrointestinais, enquanto o plexo submucoso controla a secreção gastrointestinal e o fluxo sanguíneo (ALTAF; SOOD, 2008).

Ocorrem dois movimentos básicos no sistema digestivo: movimentos propulsivos, conhecido como peristaltismo, responsável por impelir o alimento pelo tubo digestivo; e movimentos de mistura. O esvaziamento gástrico requer uma coordenação entre neurônios extrínsecos, o sistema nervoso entérico, células intersticiais de Cajal (células especializadas localizadas entre o sistema nervoso entérico e musculatura lisa da parede do estômago) e a camada muscular (STREUTKER *et al.*, 2007; RADENKOVIC *et al.*, 2010).

O movimento direcional das ondas peristálticas gástricas exige uma coordenação entre o estômago (antro gástrico) e duodeno. Quando um segmento do tubo digestivo é excitado por distensão e, por conseguinte inicia o peristaltismo, o anel contrátil que o provoca surge pouco acima no lado oral do segmento distendido, empurrando, assim, o conteúdo na direção anal. Ao mesmo tempo, o intestino se relaxa por vários centímetros distalmente em direção ao ânus (“reflexo receptivo”). Esse padrão complexo não ocorre na ausência do plexo mioentérico (ALTAF; SOOD, 2008).

O controle da motilidade do trato gastrointestinal depende, principalmente, do sistema nervoso autônomo, através dos mediadores clássicos, acetilcolina (sistema nervoso parassimpático) e noradrenalina (sistema nervoso simpático), e também de vários outros neurotransmissores conhecidos como mediadores não adrenérgicos e não colinérgicos

(NANC) (MITIKO; OLIVEIRA, 2008; ALTAF; SOOD, 2008). Várias substâncias identificadas no sistema nervoso entérico de mamíferos podem ser liberadas e participar do controle da motilidade gastrointestinal por agir diretamente sobre o músculo liso gastrointestinal, causando contração ou relaxamento, ou indiretamente, modulando a liberação do mediador inibitório ou excitatório (MITIKO; OLIVEIRA, 2008; ALTAF; SOOD, 2008).

Os sistemas parassimpático e simpático exercem, em algumas ocasiões, ações opostas. O sistema parassimpático exerce sua função através da ligação da acetilcolina em receptores nicotínicos (tipo musculares-Nm e tipo neuronais-Nn) e muscarínicos (tipos M1, M2 e M3). No trato digestivo, o sistema parassimpático provoca aumento da motilidade e tônus da musculatura lisa (ALTAF; SOOD, 2008).

Os primeiros sinais de motilidade gástrica em fetos humanos surgem por volta de 25 semanas de gravidez, quando se inicia a interação entre o sistema nervoso entérico e as células efetoras. Ao longo da gestação surgem, após 32 semanas, as contrações cíclicas observadas no estômago e duodeno, denominadas Complexo Motor Migratório, bem como as células de Cajal (RADENKOVIC *et al.*, 2010). O processo de maturidade funcional do sistema digestivo ocorre durante toda a gestação e nos primeiros meses após o nascimento (MEI *et al*., 2009).

Pesquisas recentes têm demonstrado que as alterações das células de Cajal são associadas a diversas doenças intestinais: estenose pilórica infantil hipertrófica, dilatação gástrica idiopática e perfuração (ausência ou diminuição do número de células de Cajal na musculatura longitudinal, circular e mucosa), doença de Hirschsprung (diminuição do número de células de Cajal no plexo mioentérico), doença de Chagas, pseudo-obstrução e colite ulcerativa (STREUTKER *et al.*, 2007; RADENKOVIC *et al.*, 2010).

A gastrosquise em humanos apresenta um quadro de dismotilidade intestinal importante, responsável por complicações neonatais, por exemplo, enterocolite necrotizante. Estudos com modelos experimentais de fetos com gastrosquise observaram uma imaturidade do plexo mioentérico e no desenvolvimento das células intersticiais de Cajal (STREUTKER *et al.*, 2007). Régis *et al.*, em 2011, observaram redução na frequência e amplitude da contração ileal em fetos de ratas com gastrosquise. Porém, houve uma maior responsividade intestinal a metacolina, um agonista colinérgico, secundário a uma maior concentração de

receptores muscarínicos M3, um possível fenômeno adaptativo ao nível ileal em fetos com gastrosquise.

Um estudo animal, utilizando coelhos, disponível na literatura, observou uma baixa resposta da musculatura gástrica a um agente colinérgico, betanecol, sugerindo uma lesão ao nível de receptores muscarínicos do estômago (OYACHI *et al.*, 2004). Porém, melhores avaliações são necessárias para compreender esse mecanismo.

1.8 Lesão intestinal e gástrica na gastrosquise

A elevada morbidade ainda observada nos recém-nascidos com gastrosquise se deve às complicações intestinais e outras comorbidades. A causa da lesão intestinal na gastrosquise ainda é motivo de discussão. Atualmente, acredita-se que o LA é o principal responsável, a depender de sua composição, pelo processo inflamatório intestinal observado nos casos de gastrosquise. Outros fatores agressores das alças intestinais, como tamanho da falha na parede abdominal e torção intestinal, parecem interferir menos no dano intestinal (ALBERT *et al.*, 2001; CORREIA-PINTO *et al*., 2002; BURC *et al*., 2004)

As alterações estruturais das alças intestinais de neonatos com gastrosquise já foram bem descritas. As características marcantes são: presença grande quantidade de fibrina recobrindo as alças, edema e espessamento de alças. As alças intestinais comprometidas no momento do nascimento podem evoluir com quadros de atresias, necrose e perfurações, muitas vezes, necessitando de cirurgias (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001; NICHOL *et al*., 2008). Os achados histopatológicos encontrados no estudo das alças intestinais de fetos com gastrosquise revelam as seguintes alterações: presença de edema, depósito de fibrina, fibrose, proliferação capilar, infiltração de células epiteliais e de macrófagos na parede intestinal (TIBBOEL *et al.*,1986a; TIBBOEL *et al.*, 1986b).

A presença de dismotilidade intestinal apresentada por neonatos com gastrosquise sugere que a lesão intestinal não fica limitada a desordens estruturais. O longo período de exposição das alças intestinais à cavidade amniótica parece promover alterações funcionais nas alças intestinais. Recentemente, estudo em modelo animal descreveu a presença de alterações na motilidade e em receptores muscarínicos em intestinos de fetos com gastrosquise (RÉGIS *et al.*, 2011). Outras alterações funcionais já foram descritas:

imaturidade neuronal nas alças intestinais expostas (FRANÇA *et al.*, 2008), retardo na maturação das células de Cajal e na musculatura lisa dessas alças acometidas (MIDRIO *et al.*, 2004).

Recentemente, estudos avaliaram formas de reduzir a lesão inflamatória intestinal, através de tratamento materno durante o período gestacional. A terapia com corticóide parece ser uma terapia válida, já sendo demonstrada melhoras intestinais, porém não existe uma dose estabelecida (YU *et al.*, 2003; BITTENCOURT *et al.*, 2006).

A literatura é escassa em relação ao comprometimento do estômago de fetos com gastrosquise. A suspeita é que não haja dano a esse órgão, já que não existe um contato direto com o LA. Porém, é possível a ocorrência de um quadro de dismotilidade em todo o trato gastrointestinal em decorrência de um processo inflamtório local (SCHWARZ *et al.,* 2004). Estudando coelhos, Oyachi *et al.* relataram redução da motilidade gástrica em fetos com gastrosquise (OYACHI *et al.*, 2004).

Diante desses dados experimentais e de observações, de alguns autores, que a dilatação gástrica evidenciada em exame ultrassonográfico no período pré-natal está relacionada com um pior prognóstico neonatal, é necessária uma melhor compreensão do envolvimento do estômago fetal nos casos de gastrosquise.

Estudos clínicos em humanos correlacionam a presença de dilatação gástrica, em ecografia pré-natal, com um pior prognóstico neonatal. O motivo desse achado ecográfico ainda é desconhecido. Os dois possíveis mecanismos seriam: 1) desordens na motilidade gástrica, devido à imaturidade do plexo mioentérico ou outras alterações funcionais, semelhantes às observadas a nível intestinal; e 2) a dilatação gástrica ser devido apenas a uma obstrução mecânica a nível intestinal, impedindo o bom esvaziamento gástrico.

Drogas colinérgicas (metacolina, betanecol e carbacol), com ação semelhante à acetilcolina (sistema nervoso parassimpático) são utilizadas em estudos de contratilidade gástrica, devido a sua capacidade de estimular a motilidade gastrointestinal pelo mecanismo colinérgico (OYACHI *et al.*, 2004; RÉGIS *et al.*, 2011). Dessa forma é possível avaliar se o estômago de fetos com gastrosquise apresenta alterações funcionais, como as encontradas a nível ileal.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações do trato gastrointestinal decorrentes da exposição de alças intestinais ao líquido amniótico em modelo experimental de gastrosquise em fetos de ratas.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, através de alterações morfométricas em intestinos, o período gestacional mais adequado para realização da gastrosquise experimental, se com 19,5 ou 18,5 dias de gestação, resultando em dois ou três dias, respectivamente, de exposição das alças intestinais ao líquido amniótico.

Avaliar o efeito da dexametasona sobre os parâmetros morfométricos de intestinos de fetos com gastrosquise de ratas submetidas à cirurgia experimental com 18,5 dias de gestação, após três dias de exposição de alças ao líquido amniótico.

Avaliar a presença de processo inflamatório intestinal e gástrico, através da atividade da enzima Mieloperoxidase, de fetos com gastrosquise experimental, após três dias de exposição de alças ao líquido amniótico.

Avaliar a contratilidade de tiras isoladas de estômago de fetos com gastrosquise, de ratas submetidas à cirurgia experimental com 18,5 dias de gestação, após três dias de exposição de alças ao líquido amniótico.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animal

Foram utilizados ratos (*Rattus norvergicus*, variedade albina) Wistar, machos e fêmeas maduros, de fertilidade comprovada, com peso médio de 200 gramas. 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 33/2008, aprovado em 27/08/2008 (ANEXO A).

3.2 Modelo experimental

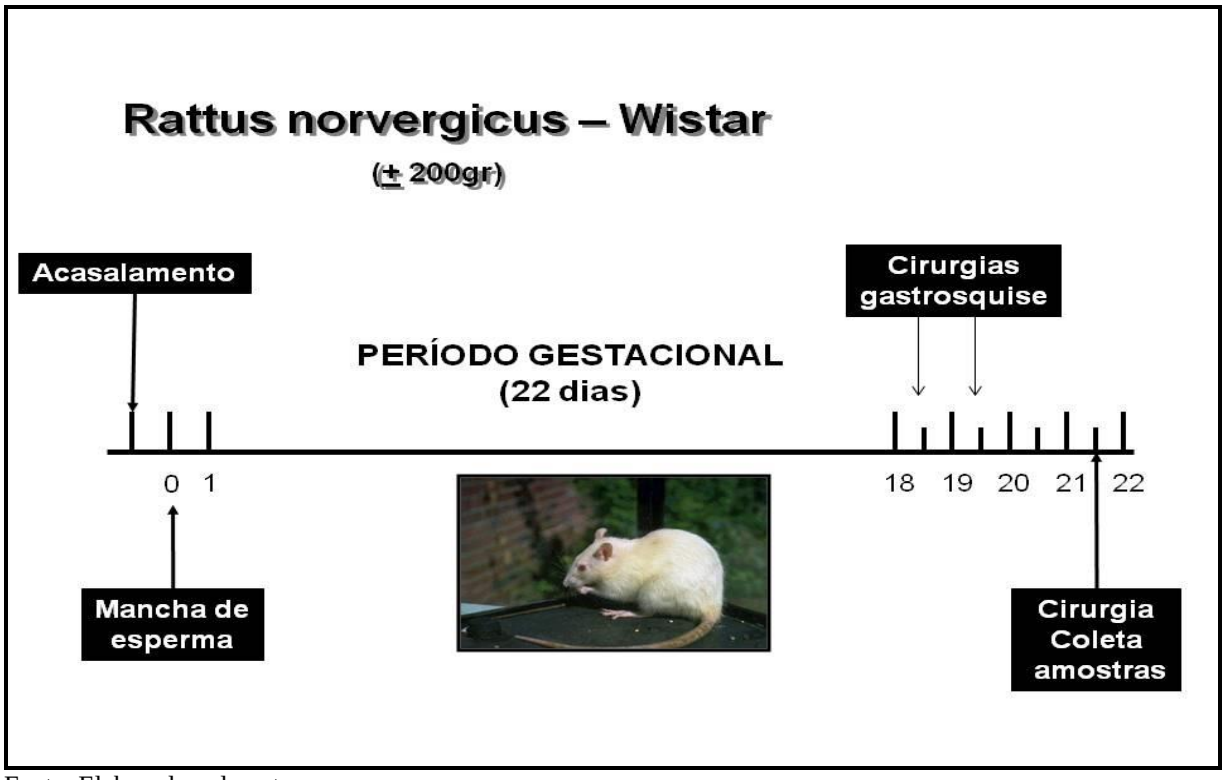
Ratas em estro ou proestro foram divididas aleatoriamente e transferidas para gaiolas individuais e acasaladas com machos na proporção de três fêmeas e dois machos por gaiola, durante o período noturno. Na manhã seguinte, as fêmeas foram submetidas a um lavado vaginal, com soro fisiológico e pipeta plástica descartável, e preparo de uma lâmina e visualização em microscópico ótico (aumento 40x). O acasalamento foi confirmado pela presença de espermatozóides nesse esfregaço vaginal, e este dia foi considerado dia zero de gravidez (termo = 22 dias). Os experimentos foram realizados com 18,5 (cirurgia para gastrosquise experimental), 19,5 (cirurgia para gastrosquise experimental) e 21,5 (cirurgia para coleta de dados) dias de gestação (FIGURA 1).

Durante o período gestacional, as ratas grávidas foram mantidas em gaiolas, com oferecimento de ração específica e água *ad libitum.* Foi adotado o modelo de gastrosquise experimental descrito por Correia-Pinto *et al.* (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001). Os procedimentos cirúrgicos para a realização da gastrosquise experimental, foram realizados em fetos com idade gestacional de 19,5 dias e 18,5 dias. A coleta das amostras ocorreu com 21,5 dias de gestação, realizada no período da manhã.

Após aclimatação no laboratório, as ratas Wistar grávidas foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina base- 50mg/ml (Ketamina® - Pfizzer do Brasil) associada com xilazina 10mg/ml (Rompum®- Bayer do Brasil) na dose de 0,6 ml por animal via intramuscular aplicado na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina

e agulha de calibre 20G. Esta composição anestésica (180mg/kg de ketamina/ 1,25 mg/kg de xilazina) mantém o animal sob anestesia profunda durante um período médio de três horas e o pós-operatório transcorre de maneira indolor durante o período compreendido entre 6 e 12 horas.

FIGURA 1 – Cronologia do período gestacional e procedimentos experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O abdome foi submetido à raspagem dos pêlos com tosquiadeira elétrica com cuidado para não ferir os mamilos. Os animais foram colocados sobre manta aquecida por resistência elétrica e previamente regulada na temperatura de 37 graus Celsius. Após assepsia com álcool iodado e colocação dos campos estéreis, o animal foi submetido à laparotomia mediana em dois planos (pele e aponeurose/peritôneo).

O útero bicorno foi delicadamente exposto e protegido com gaze estéril embebidas em solução salina fisiológica aquecida a 38 graus Celsius (FIGURA 2A). Os fetos foram contados da região proximal para distal em relação ao colo uterino, iniciando-se a contagem pelo corno direito. O primeiro e o último feto de cada corno não foram utilizados

nos experimentos pelo risco de abortamento relacionado à manipulação desses animais. O segundo feto, contado a partir do istmo uterino direito, foi considerado o primeiro feto da numeração, sendo submetido à gastrosquise (G), o feto seguinte não foi manipulado cirurgicamente, sendo considerado como controle (C) e o subsequente foi manipulado cirurgicamente, sem realização da gastrosquise, sendo considerado sham (Sh). Esta sequência foi sucessivamente repetida, do corno direito para o corno esquerdo.

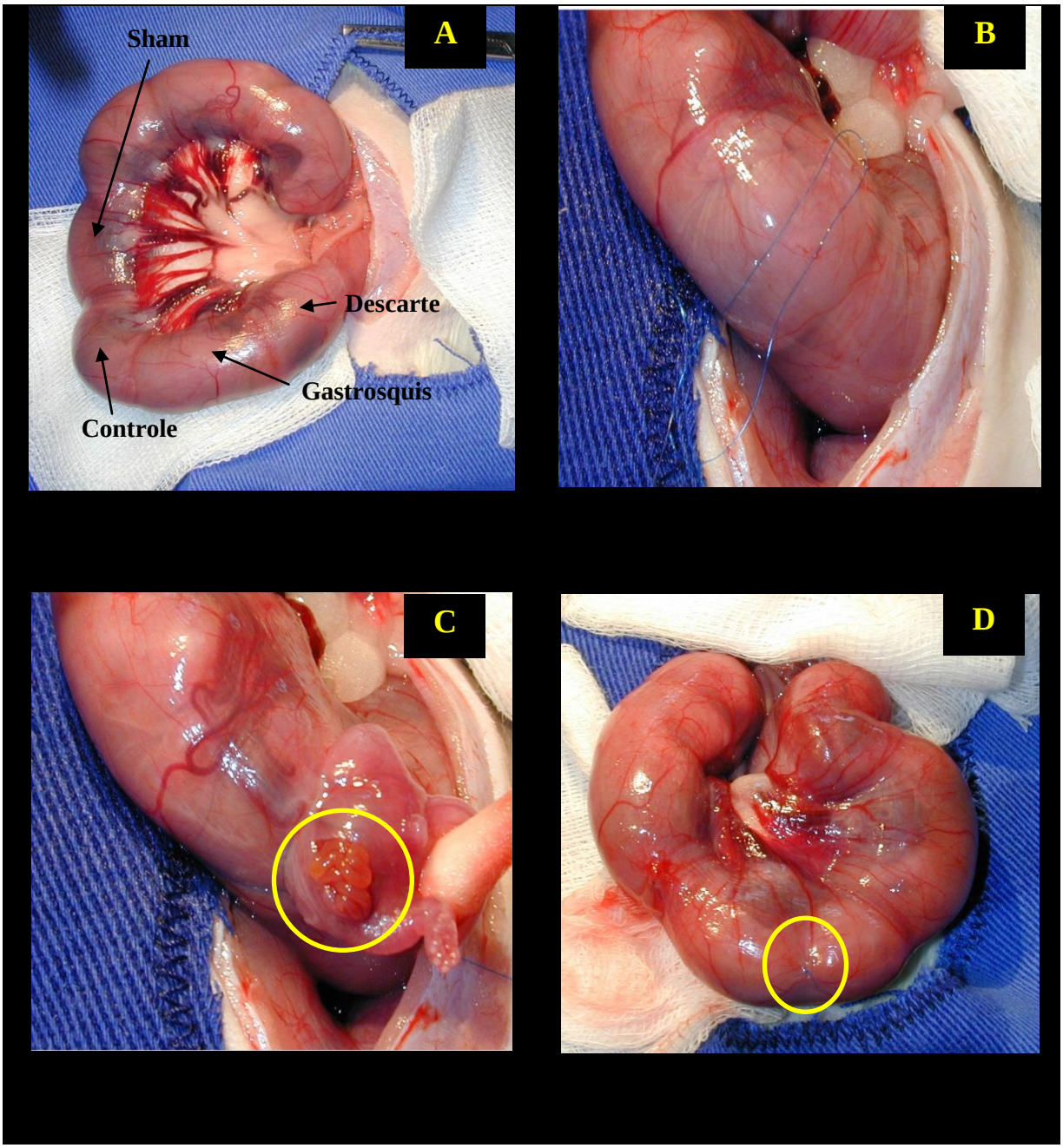
Sob a utilização de uma lupa cirúrgica, uma sutura em bolsa com fio de Prolene® calibre 6-0 foi realizada na parede uterina (FIGURA 2B). Em seguida, o útero foi aberto em suas duas camadas, muscular e membrana amniótica. O feto foi exposto pela incisão uterina até a altura da inserção do cordão umbilical e mantido com o abdome superior e o tórax no interior do útero materno. Foi realizada a retirada parcial do membro inferior direito e do membro inferior esquerdo, para facilitar a exposição da região abdominal a ser incisada. Esta manobra técnica diminui o risco de lesão da vasculatura umbilical durante o procedimento da gastrosquise.

Para a realização da gastrosquise, uma incisão de laparotomia paraumbilical direita, com extensão padronizada em 5mm (utilizando lâmina de bisturi número 11), abriu a cavidade abdominal fetal, com o cuidado de não lesar os vasos umbilicais e o fígado (FIGURA 2C). As alças intestinais foram expostas com facilidade pela compressão delicada do abdome fetal com hastes de algodão esterilizadas (Cotonetes® -*Johnson & Johnson* do Brasil). Após a realização da gastrosquise, o feto foi, cuidadosamente, recolocado na cavidade uterina e o útero foi fechado pela sutura em bolsa previamente realizada (FIGURA 2D). Antes do fechamento da bolsa, 0,5 ml de solução fisiológica aquecida foi reposta no interior da cavidade uterina. Durante o procedimento, a porção exposta do feto foi mantida aquecida com solução salina (NaCl 0,9%) a 38 graus Celsius gotejada com seringa de 5 ml.

O feto seguinte, denominado feto controle (controle não manipulado), não foi submetido à cirurgia nem tampouco retirado do útero. O feto subseqüente, denominado *Sham* (controle manipulado), foi exposto fora da cavidade uterina até a altura da inserção do cordão umbilical, foi submetido a uma leve compressão do flanco direito com hastes flexíveis de algodão, mas não foi submetido a nenhum procedimento cirúrgico. Em seguida, foi recolocado na cavidade uterina.

Ao final da realização do procedimento nos fetos disponíveis, a parede abdominal da rata mãe foi fechada em dois planos, com utilização de fio mononylon 2-0, sutura contínua. O período pós-operatório se deu em gaiolas individuais, com água e ração oferecidas *ad libitum*.

FIGURA 2 - Modelo experimental de gastrosquise: (A) exposição do corno uterino direito e sequência da classificação fetal; (B) sutura em bolsa com fio Prolene 6.0; (C) abertura da cavidade uterina e criação da gastrosquise; (D) fechamento da parede uterina.



Fonte: Fotos cedidas pelo Prof. Lourenço Sbragia Neto.

3.3 Delineamento experimental

3.3.1 Tempo de exposição intestinal - Análise morfométrica

Na primeira fase do estudo, para investigar a influência do tempo de exposição das alças intestinais ao líquido amniótico (LA), os experimentos foram realizados em dois momentos diferentes, com 18,5 dias e 19,5 dias de gestação. Dessa forma, as alças intestinais foram expostas ao LA durante três e dois dias. Nesse momento, houve a divisão em dois (02) grupos: Grupo – 18,5 dias e Grupo – 19,5 dias. Cada grupo era constituído por três subgrupos, da seguinte maneira: gastrosquise (G), controle (C) e *sham* (Sh) (FLUXOGRAMA 1).

Grupo – 18,5 dias: fetos submetidos à cirurgia experimental com 18,5 dias de gestação.

G (n=11): Fetos submetidos à gastrosquise.

C (n=11): Fetos normais (controle).

Sh (n=11): Fetos apenas manipulados fora do útero (sham).

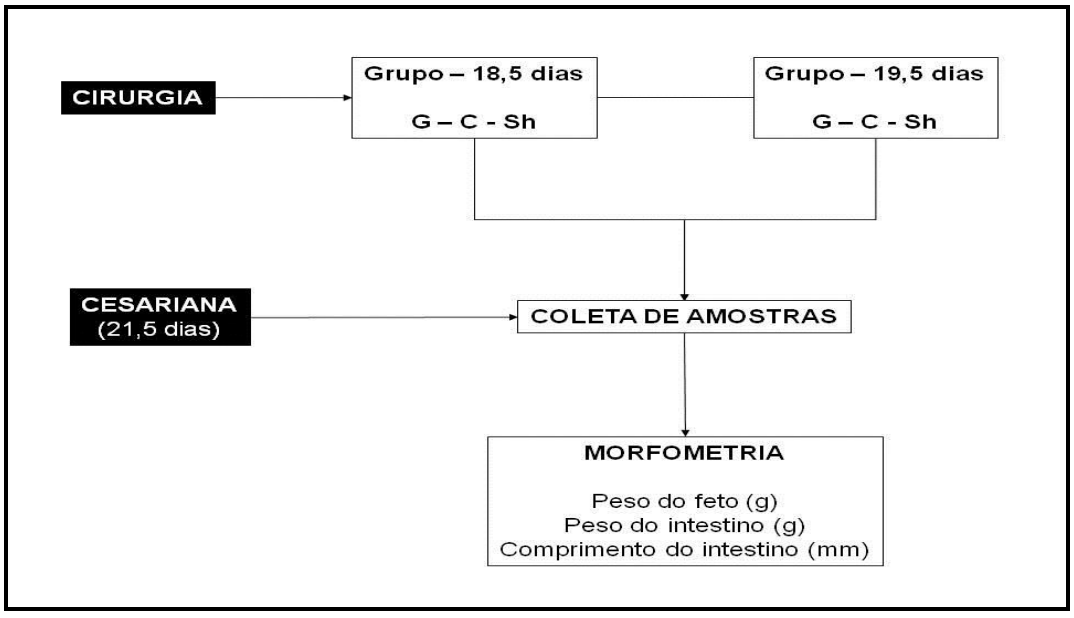
Grupo – 19,5 dias: fetos submetidos à cirurgia experimental com 19,5 dias de gestação.

G (n=6): Fetos submetidos à gastrosquise.

C (n=6): Fetos normais (controle).

Sh (n=6): Fetos apenas manipulados fora do útero (sham).

FLUXOGRAMA 1 – Delineamento experimental para estudo da morfometria em diferentes tempos cirúrgicos.



3.3.2 Tratamento com dexametasona - Análise morfométrica

O efeito da administração materna de dexametasona, nos parâmetros morfométricos, foi avaliado após a determinação do momento ideal para a indução da gastrosquise. Nesse momento, houve a divisão em dois (02) grupos: Grupo sem dexametasona e Grupo com dexametasona. Cada grupo era constituído por três subgrupos, da seguinte maneira: gastrosquise (G), controle (C) e *sham* (Sh) (FLUXOGRAMA 2).

Grupo sem dexametasona: fetos submetidos à cirurgia experimental com 18,5 dias de gestação e não tratados com dexametasona.

G (n=11): Fetos submetidos à gastrosquise.

C (n=11): Fetos normais (controle).

Sh (n=11): Fetos apenas manipulados fora do útero (sham).

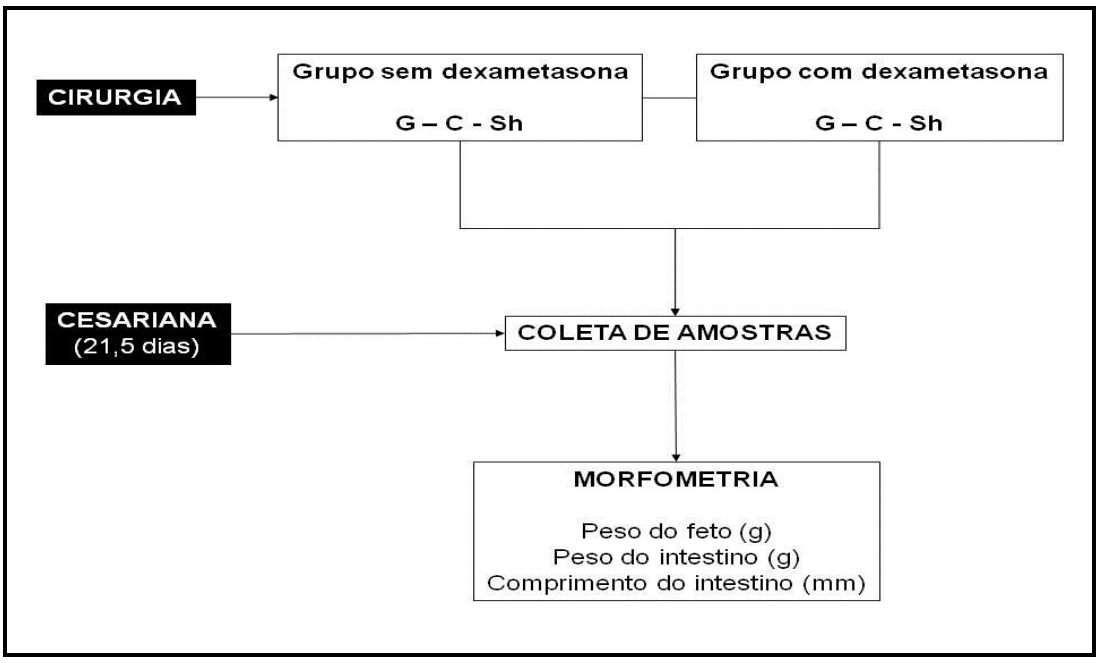
Grupo com dexametasona: fetos submetidos à cirurgia experimental com 18,5 dias de gestação e tratados com dexametasona.

G-Dx (n=5): Fetos submetidos à gastrosquise.

C-Dx (n=5): Fetos normais (controle).

Sh-Dx (n=5): Fetos apenas manipulados fora do útero (sham).

FLUXOGRAMA 2 – Delineamento experimental para estudo da morfometria no tratamento com dexametasona.



O grupo de ratas tratadas com dexametasona recebeu uma dose de 0,4 mg/kg da droga diluída para 2 ml de solução salina fisiológica, nos 18,5º (no momento da cirurgia experimental), 19,5º e 20,5º dia de gestação. A administração foi efetuada de forma randomizada, sempre na região intraperitoneal perihepática.

3.3.3 Estudo Mieloperoxidase e contratilidade gástrica – Definição de grupos

Para as análises da MPO foram operadas 05 ratas e estudo da contratilidade gástrica foram operadas 09 ratas. Os procedimentos para cirurgia da gastrosquise experimental foram realizados com 18,5 dias de gestação.

Os fetos das ratas grávidas foram divididos em grupos de acordo com o procedimento cirúrgico realizado (FLUXOGRAMA 3):

Análise da MPO de intestino e estômago:

G (n=9, intestino; n=6, estômago): Fetos submetidos à gastrosquise.

C (n=9, intestino; n=9, estômago): Fetos normais (controle).

Sh (n=9, intestino; n=6, estômago): Fetos manipulados fora do útero (sham).

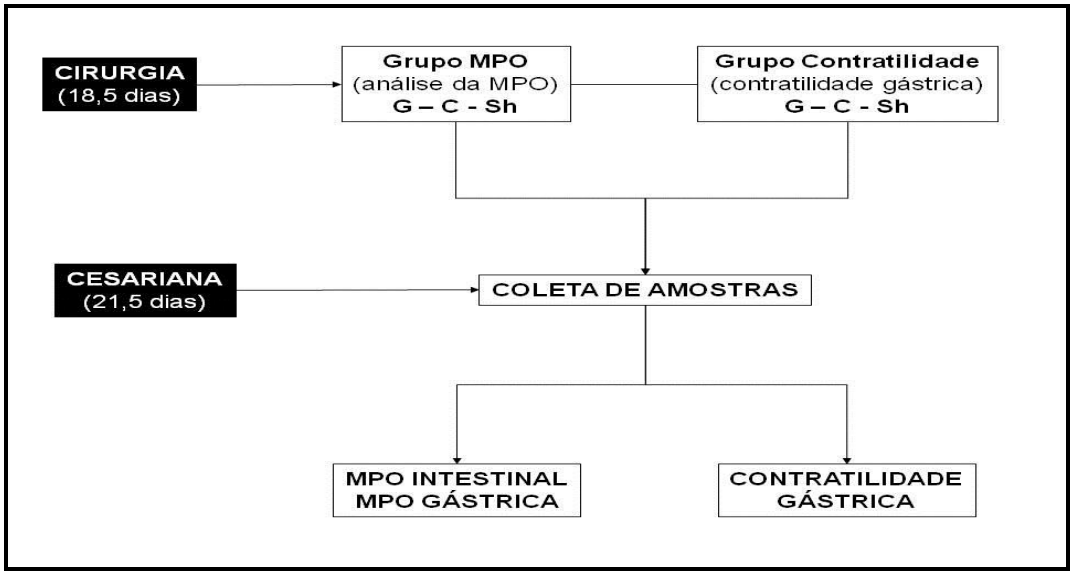
Estudo da contratilidade gástrica (antro e fundo):

G (n=5, antro; n=6, fundo): Fetos submetidos à gastrosquise.

C (n=5, antro; n=7, fundo): Fetos normais (controle).

Sh (n=6, antro; n=8, fundo): Fetos apenas manipulados fora do útero (sham).

FLUXOGRAMA 3 – Delineamento experimental para estudo da MPO e contratilidade gástrica.



3.4 Coleta de amostras

No dia 21,5 de gestação, as ratas foram novamente anestesiadas (mesma dose previamente descrita) e submetidas à operação cesariana, por laparotomia mediana. Os fetos previamente operados e seus controles foram removidos do útero, sacrificados através de injeção letal do mesmo anestésico já descrito e punção occipital, sendo então pesados em balança de precisão. As ratas foram sacrificadas após a cesariana com deslocamento cervical, ainda anestesiadas.

O abdome fetal foi aberto por incisão mediana e dissecado sob foco de luz e com auxílio de lupa, expondo as alças. Para o estudo da morfometria, as alças intestinais foram removidas desde o piloro até a região do reto superior, na reflexão peritoneal. O intestino foi pesado (gramas) e o mesentério dissecado com pinças oftalmológicas. As alças puderam, então, ser retificadas sem tensão em prancha de cortiça para obtenção de seu comprimento (milímetros), com a utilização de régua e paquímetro de precisão (FIGURA 3).

Para o estudo da MPO intestinal, as alças foram removidas desde o piloro até a região do reto superior, na reflexão peritoneal, sendo retirada uma amostra com cerca de 50-100mg da porção central e acondicionada adequadamente. Para o estudo da MPO gástrica, o estômago foi removido, desde o cárdia até o início do duodeno, sendo retirada uma amostra

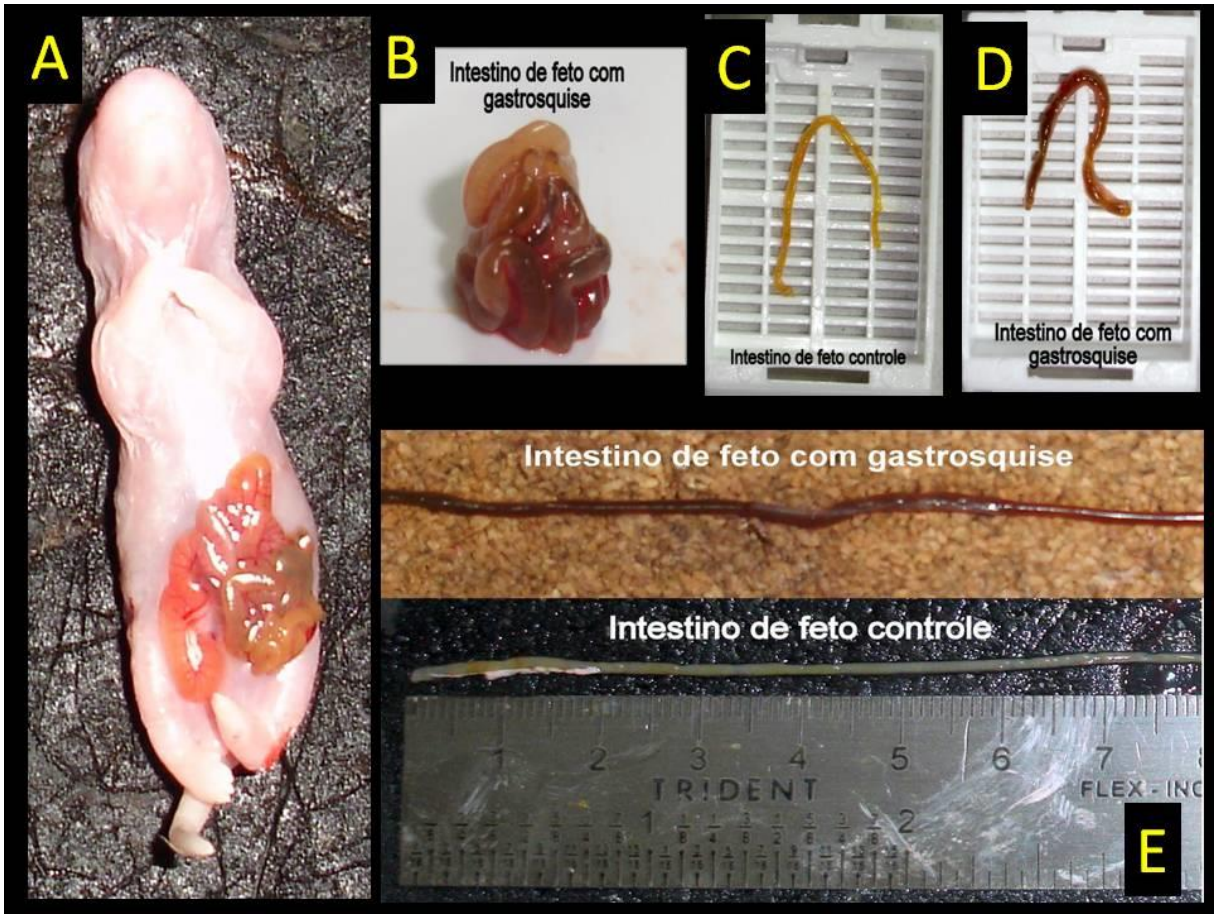
com cerca de 50mg da porção central e acondicionada adequadamente. As amostras de intestino e estômago foram armazenadas em frezzer, com temperatura de -80 graus Celsius, até a realização do ensaio laboratorial.

Para o estudo da contratilidade gástrica, o estômago foi removido, desde o cárdia até o início do duodeno, acondicionado em solução de Tyrode e encaminhado para avaliação.

3.5 Avaliação morfométrica

As variáveis morfométricas avaliadas foram: massa corpórea (MC), massa intestinal (MI) e comprimento intestinal (CI) permitiram o estudo estatístico dessas grandezas nos diversos subgrupos. No entanto, observou-se a necessidade de criar relações entre esses parâmetros, que melhor demonstrassem as diferenças entre os subgrupos. Foram criadas as razões matemáticas: (1) MI/MC, com o objetivo de se excluir a variável da MC sobre a avaliação da MI; (2) MI/CI, possibilitando eliminar as variações do CI sobre a MI, determinando a massa intestinal por cada milímetro de intestino; (3) MC-MI, a qual permite a avaliação da MC real, independente das variações da massa intestinal.

FIGURA 3 – Etapas da coleta de amostras: (A) Coleta fetal; (B) Intestino fetal removido para aferir o peso intestinal, (C) Aspecto alça intestinal normal, (D) Aspecto da alça intestinal de feto com gastrosquise, e (E) mensuração do comprimento intestinal de feto com gastrosquise (acima) e controle (abaixo).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.6 Avaliação da atividade da enzima Mieloperoxidase

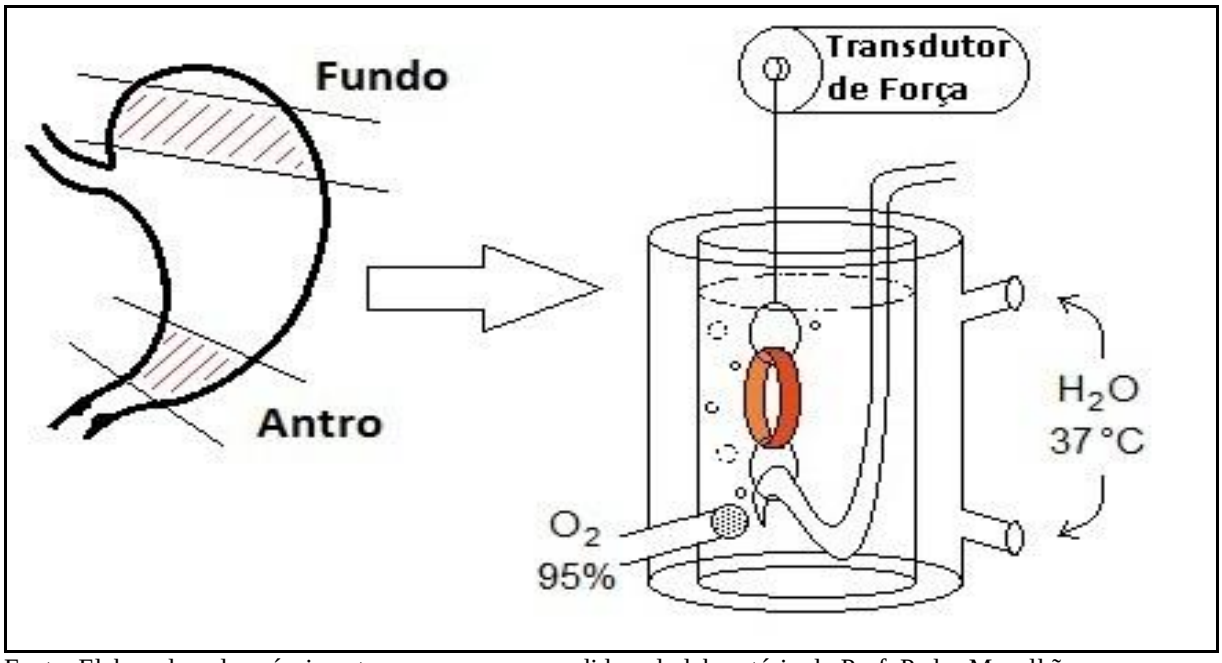
A intensidade do acúmulo de neutrófilos na mucosa gástrica e intestinal foi aferida pelo ensaio da mieloperoxidase como descrito anteriormente, nos grupos G, C e Sh (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). Para tanto, as alças intestinais e estômagos, pesando entre 50-100mg, foram homogeneizados em 01 ml hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer (Sigma) para cada 50mg de tecido, separadamente, em 2 volumes. Posteriormente centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos. Foi realizado então um choque hipotônico no "pellet" com 900µl de NaCl a 0,2% seguido por 900µl de uma solução com NaCl 1,6% e glicose 5%. Depois de uma nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, o "pellet" foi ressuspenso num tampão de NaPO4 (pH 5,4)

contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimethilammonium (HTAB) buffer (Sigma) e novamente homogeneizado. A seguir, este homogeneizado foi congelado e descongelado três vezes e novamente centrifugado por 10.000 rpm por 15 minutos a 4ºC. A atividade da MPO no "pellet" ressuspenso foi realizada através da mudança na densidade óptica (DO) a 450 nm usando o tetramethilbenzidine (1,6mM) e a H_2O_2 (0,5 mM), sendo o resultado expresso em unidades/mg de tecido (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

3.7 Análise da contratilidade gástrica

Segmentos de estômago de fetos de cada grupo, G - C - Sh, foram isolados para estudos *in vitro*. O fundo e o antro de cada amostra do estômago (seccionados em forma de anel) foram isolados e suspensos, utilizando um fio de algodão não extensível, a um transdutor de força (ML870B60/CV, AD Instruments, Austrália), conectado a um sistema digital de aquisição de dados (PowerLab ™ 8/30 Instruments, AD) (FIGURA 4).

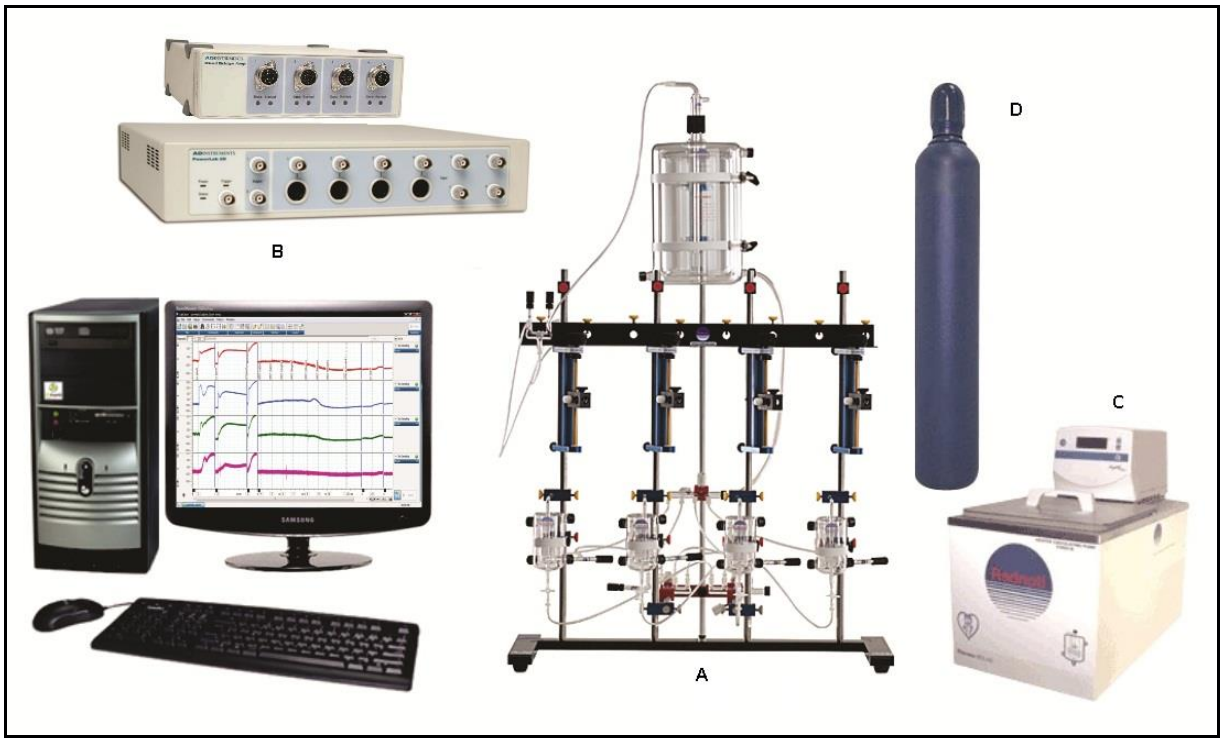
FIGURA 4 – Esquema mostrando segmentos de fundo e o antro de cada amostra do estômago (seccionados em forma de anel), isolados e suspensos, utilizando um fio de algodão não extensível, a um transdutor de força.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, com esquema cedido pelo laboratório do Prof. Pedro Magalhães.

O estudo foi realizado em sistema de banho para órgãos preenchido com Solução de Tyrode (mM: NaCl 136,0; KCl 5,0; $MgCl_2$ 0,98; $CaCl_2$ 2,0; NaH_2PO4 0,36; $NaHCO_3$ 11,9 glicose e 5,5) aquecido a 37° C e oxigenado com 5% de CO_2 e 95% de O_2 (FIGURA 5).

FIGURA 5 – Sistema de avaliação da contratilidade gástrica: (A) Transdutor de força (ML870B60/CV, AD Instruments, Austrália), conectado a um sistema digital de aquisição de dados (B) (PowerLab ™ 8/30 Instruments, AD); (C) Banho Maria mantendo a Solução de Tyrode aquecida a 37° C; (D) CO_2.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor, com fotos cedidas pelo laboratório do Prof. Pedro Magalhães.

O registro das contrações representou a musculatura lisa circular. Uma tensão de repouso de 1g foi inicialmente aplicado sobre cada preparado de tecidua, em seguida, foi respeitado um período de equilíbrio de 1 h. Cada tecido em suspensão foi submetido a concentrações crescentes de carbacol (CCh, 0,01-100 µM), a fim de construir curvas de concentração-efeito. Depois de cada protocolo, segmentos de tecido foram pesadas, de modo a expressar a força desenvolvida após um dado estímulo contrátil como uma relação com a respectiva massa de tecido (mg de força / mg de tecido). A frequência das contrações foi expressa como contrações/min. Segmentos de antro gástrico foram avaliados através da

medição de pico para pico de amplitude das contrações espontâneas. Segmentos de fundo foram avaliados através da medição da amplitude do tônus com os desvios de pico máximo após uma dada concentração de CCh. Os valores de EC50, isto é, a concentração de CCh que alcança 50% do seu efeito máximo, também foram descritas. Pelo menos, cinco fetos foram estudados sobre cada região gástrica entre os grupos (G – C – S).

3.8 Análise estatística

Os dados da análise da morfometria e os relativos à atividade de MPO foram expressos como média ± desvio padrão (número de experimentos) e submetidos à comparação estatística utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de pelo teste de comparação múltipla Newman-Keuls, sendo utilizado o programa de computador PRISMA versão 3.0.

Os dados da contratilidade gástrica foram expressos em média ± erro padrão da média (número de experimentos) e submetidos à comparação estatística utilizando análise de variância (ANOVA) e a realização do teste de Newman-Keuls. Valores da EC_{50} foram descritos através da média geométrica [95% de intervalo de confiança] (número de experimentos). A comparação dos valores da EC_{50} foi realizada através do Mann-Whitney U-test, sendo utilizado o programa de computador SIGMAPLOT versão 12.0. A significância estatística foi determinada com um $p < 0.05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Resultados do procedimento cirúrgico

Em todos os experimentos, foram operadas durante todo o experimento 37 ratas grávidas. O óbito das ratas no pós-operatório não foi um evento comum, ocorrendo em 02 ratas (5,4%). Houve o nascimento prematuro de todos os fetos em dois casos. Entre os fetos ocorreram óbitos e abortos em diferentes proporções, dependendo do grupo de estudo.

O óbito fetal (óbito do feto sem a sua expulsão) e abortamento (expulsão do feto antes da coleta das amostras) ocorreram, respectivamente, em 3,4% e 8,5% dos fetos do grupo de descarte (extremidade dos cornos uterinos e não utilizados nos experimentos), com uma taxa de fetos normais de 88,1%. Entre os fetos do grupo controle, a taxa de nascimento de fetos normais foi de 92%, ocorrendo somente óbito fetal em 8% dos fetos desse grupo.

Os fetos manipulados cirurgicamente apresentaram uma freqüência maior de complicações. O grupo sham apresentou um percentual de fetos nascidos normais de 66,7%, com 3,3% de abortamento e 30% de óbito fetal. Os fetos submetidos à gastrosquise experimental apresentaram uma taxa de óbito fetal de 47,2%, uma taxa de aborto de 2,8% e somente 50% de nascimentos normais.

4.2 Resultados da morfometria: Tempo de exposição intestinal

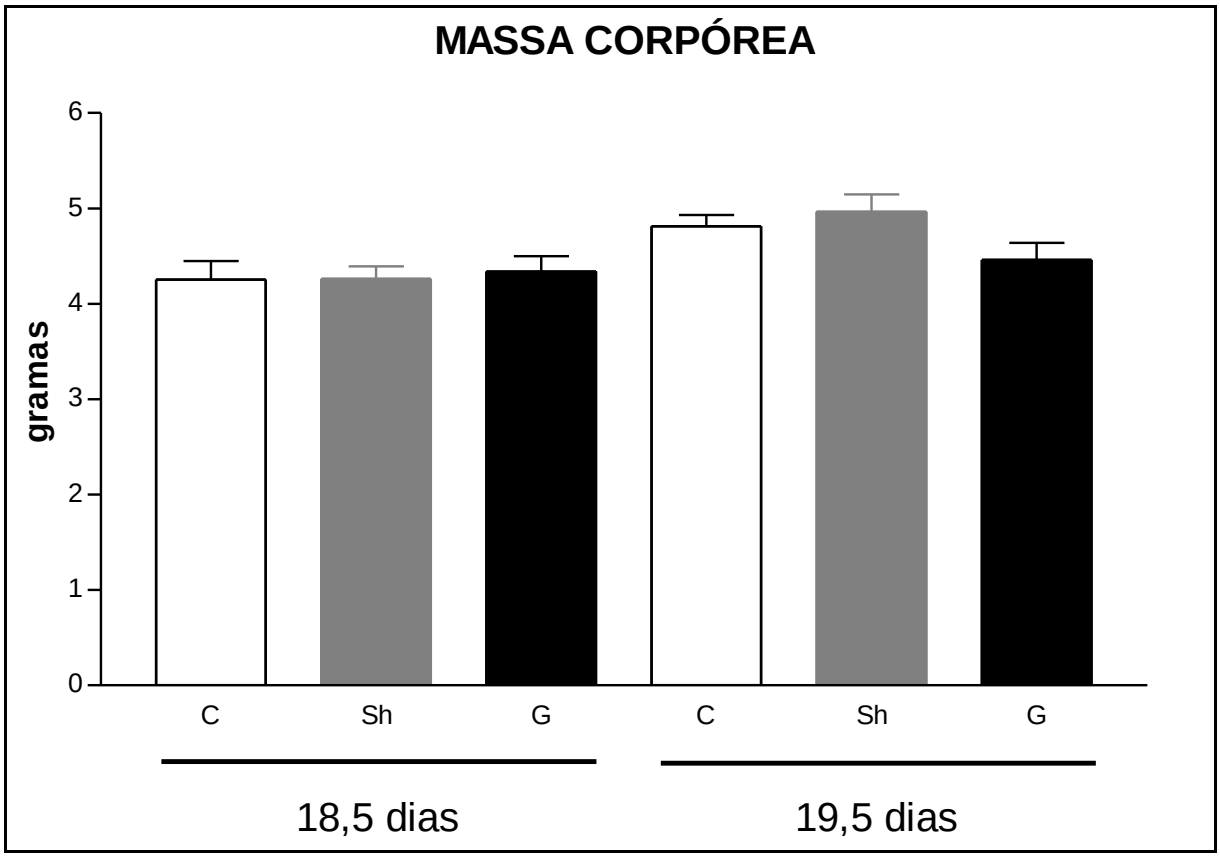
4.2.1 Massa corpórea (MC)

As médias da MC para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação foram: C= 4,25g ± 0,62g, variando de 3,32 a 5,41g; Sh= 4,65 ± 0,42g, variando de 3,54 a 5,29g; e G= 4,34 ± 0,53g, variando de 3,26 a 5,01g.

As médias da MC para os fetos das ratas operadas com 19,5 dias de gestação foram: C= 4,81g ± 0,29g, variando de 4,51 a 5,24g; Sh= 4,96 ± 0,44g, variando de 4,23 a 4,96g; e G= 4,46 ± 0,43g, variando de 3,76 a 5,09g.

A análise estatística da Massa Corpórea entre os subgrupos (C-Sh-G) com o mesmo período de exposição das alças intestinais ao líquido amniótico, bem como períodos diferentes de exposição não revelou diferença significante (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 – Gráfico comparando as medidas da massa corpórea dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP.

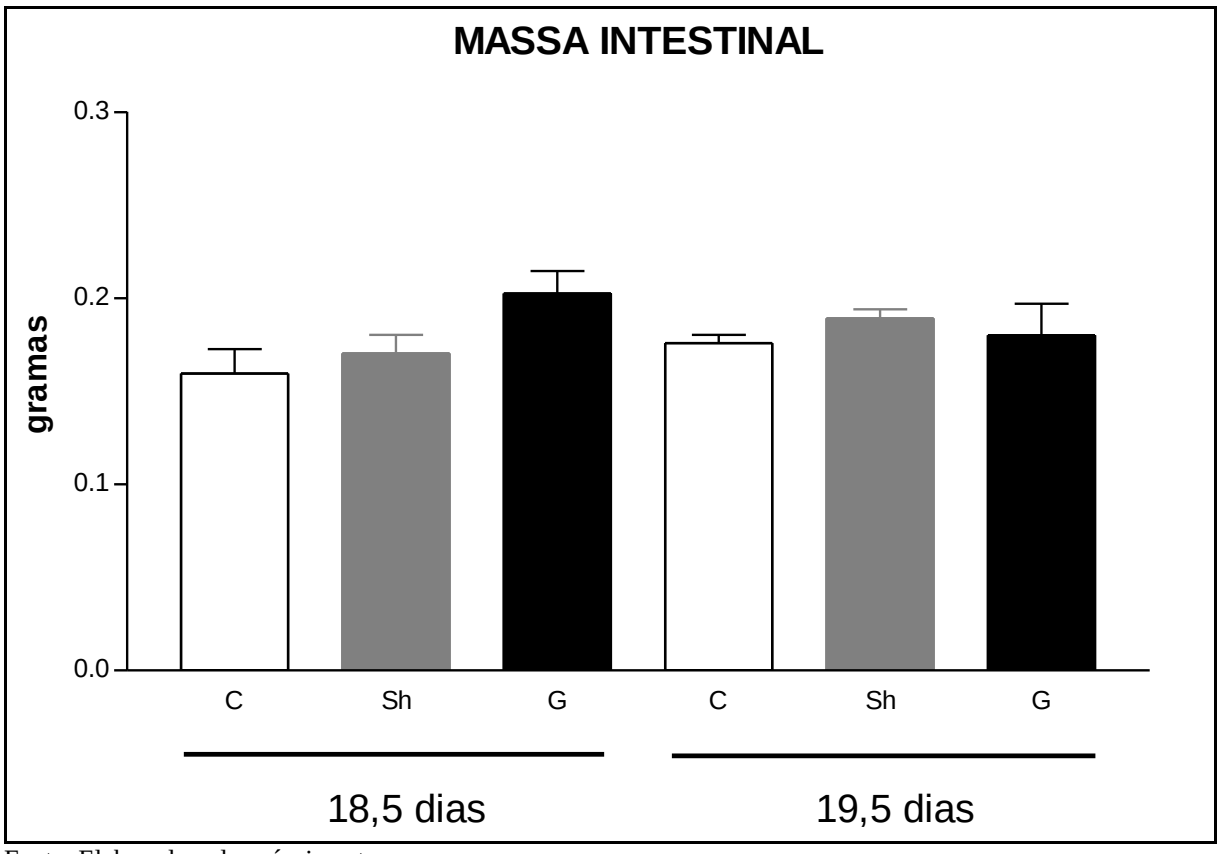
4.2.2 Massa intestinal (MI)

As médias da MI para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação foram: C= 0,16 ± 0,04g, variando de 0,10 a 0,24g; Sh= 0,17g ± 0,03g, variando de 0,11 a 0,22g; e G= 0,20 ± 0,04g, variando de 0,14 a 0,27g.

As médias da MI para os fetos das ratas operadas com 19,5 dias foram: C= 0,18 ± 0,01g, variando de 0,16 a 0,19g; Sh= 0,19g ± 0,01g, variando de 0,18 a 0,20g; e G= 0,18 ± 0,04g, variando de 0,12 a 0,24g.

Não houve diferença significante da massa intestinal entre os subgrupos, quando comparados no mesmo grupo ou em grupos diferentes (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2 – Gráfico comparando as medidas da massa intestinal dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP.

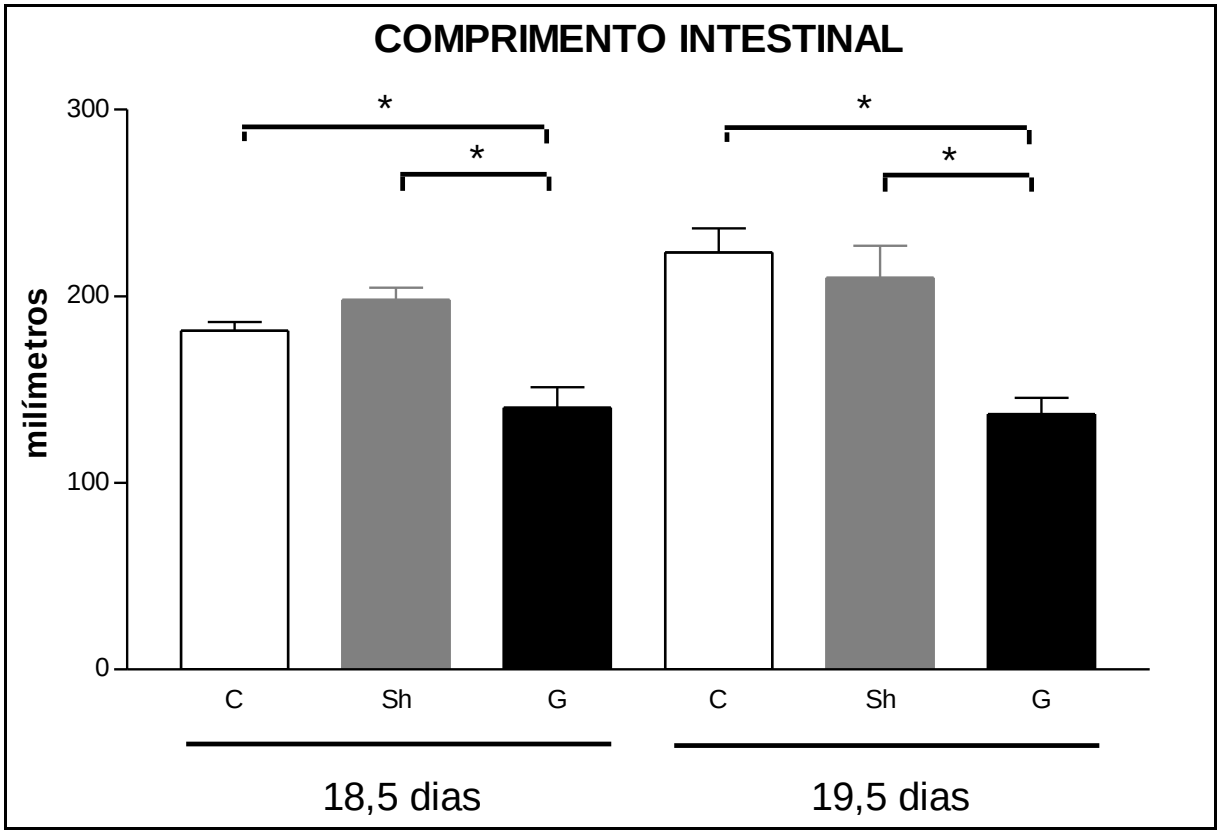
4.2.3 Comprimento intestinal (CI)

As médias dos CI para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação foram: C= 181,5 ± 15,7mm, variando de 156 a 200mm; Sh= 198 ± 22,2mm, variando de 158 a 230mm; e G= 140,4 ± 36,4mm, variando de 85 a 201mm.

As médias dos CI para os fetos das ratas operadas com 19,5 dias de gestação foram: C= 223,5 ± 31,5mm, variando de 178 a 275mm; Sh= 210 ± 34,2mm, variando de 168 a 248mm; e G= 136,8 ± 21,6mm, variando de 105 a 156mm.

Na avaliação de cada grupo isolado, o CI foi estatisticamente menor no subgrupo com gastrosquise quando comparado ao grupo controle ($p<0,001$) e ao sham ($p<0,01$). Não houve diferença estatística na comparação do CI entre o subgrupo com gastrosquise, operado com 18,5 e com 19,5 dias (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 – Gráfico comparando as medidas do comprimento intestinal dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP (* $p<0,05$).

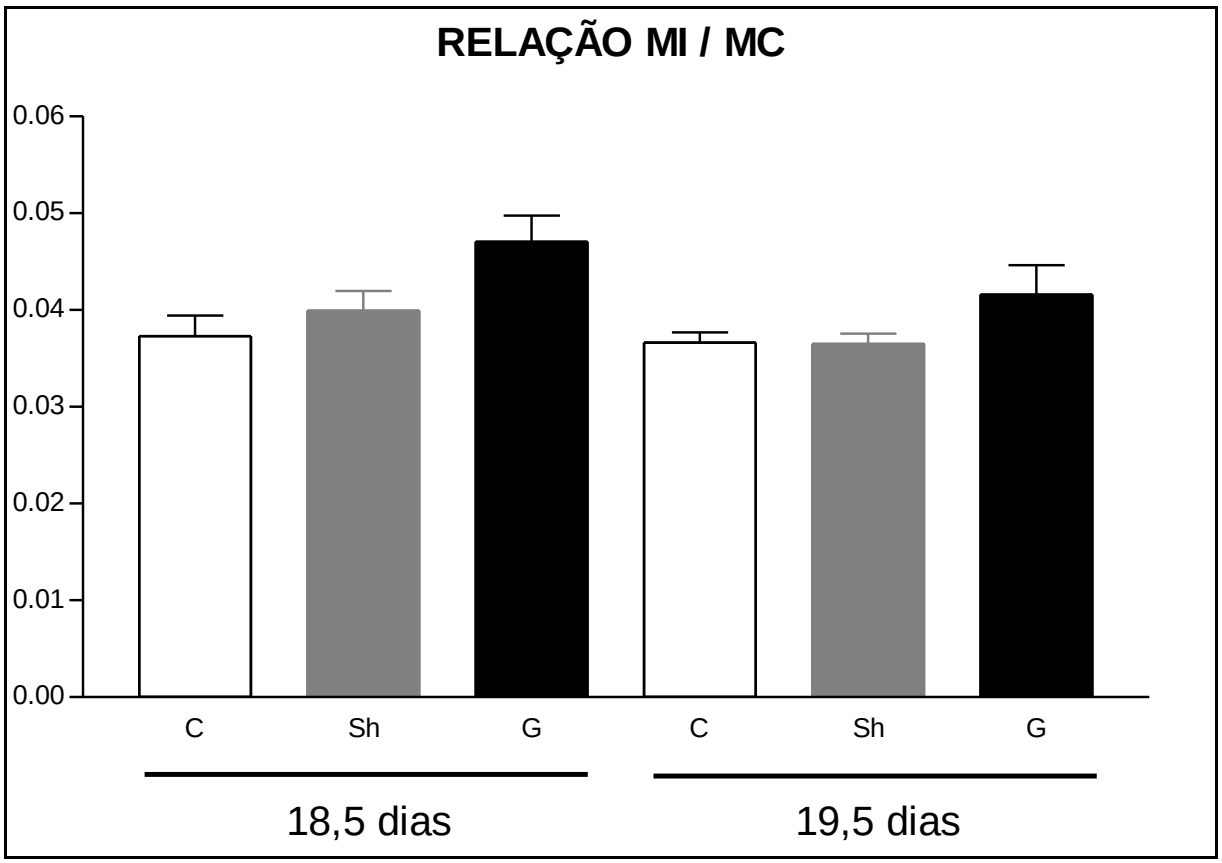
4.2.4 Relação Massa Intestinal / Massa Corpórea (MI/MC)

As médias das relações MI/MC para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação foram: C= 0,037 ± 0,007, variando de 0,030 a 0,053; Sh= 0,039 ± 0,007, variando de 0,031 a 0,052; e G= 0,047 ± 0,009, variando de 0,031 a 0,055.

As médias das relações MI/MC para os fetos das ratas operadas com 19,5 dias de gestação foram: C= 0,037 ± 0,002, variando de 0,033 a 0,041; Sh= 0,036 ± 0,002, variando de 0,034 a 0,039; e G= 0,042 ± 0,007, variando de 0,033 a 0,052.

Não houve diferença significante da massa intestinal entre os subgrupos, quando comparados no mesmo grupo ou em grupos diferentes (GRÁFICO 4).

GRÁFICO 4 – Gráfico comparando as medidas da relação MI/MC dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.



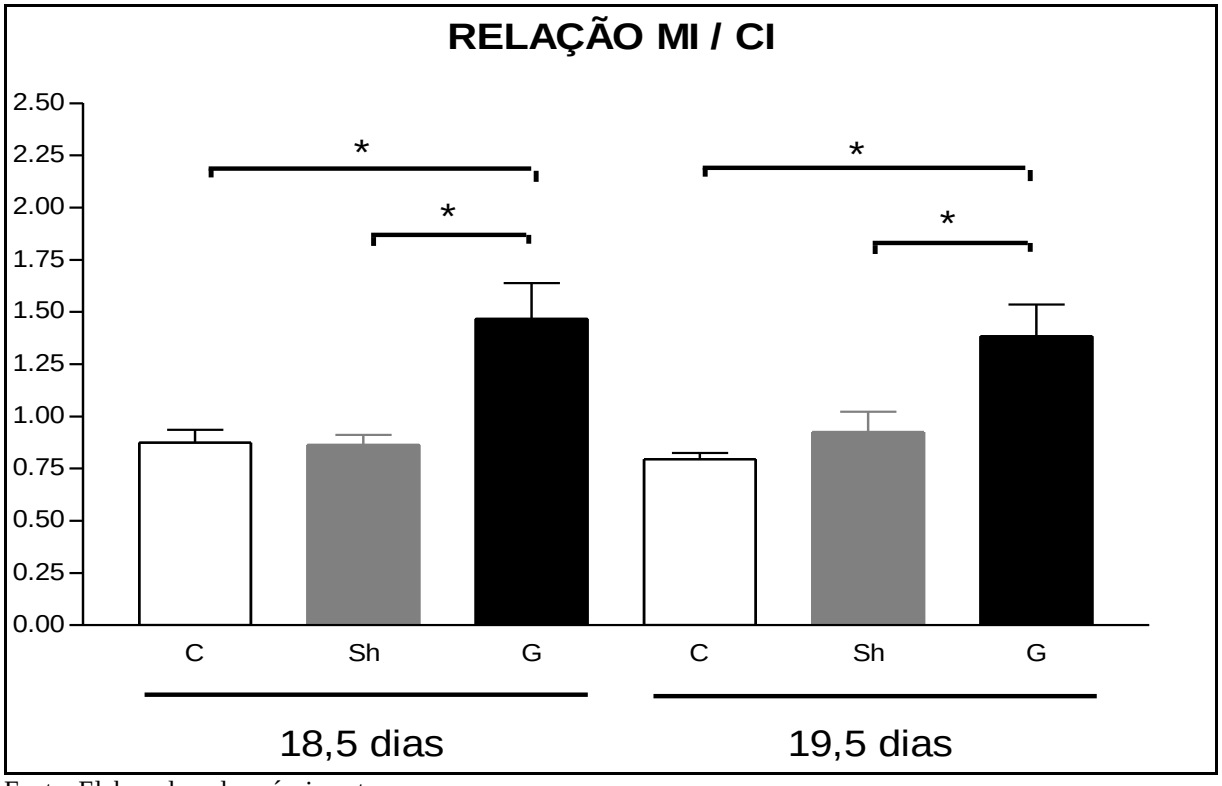
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP.

4.2.5 Relação Massa Intestinal / Comprimento Intestinal (MI/CI)

As médias das relações MI/CI para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação foram: C= 0,87 ± 0,20 mg/mm, variando de 0,64 a 1,26 mg/mm; Sh= 0,86 ± 0,16 mg/mm, variando de 0,67 a 1,17 mg/mm; e G= 1,47 ± 0,57 mg/mm, variando de 0,78 a 2,61 mg/mm. A relação MI/CI foi mais elevada no subgrupo de fetos que foi submetido à gastrosquise experimental com 18,5 dias de gestação ($p<0,001$ ANOVA entre G x C e G x Sh).

As médias das relações MI/CI para os fetos das ratas operadas com 19,5 dias de gestação foram: C= 0,79 ± 0,07 mg/mm, variando de 0,70 a 0,92 mg/mm; Sh= 0,92 ± 0,19 mg/mm, variando de 0,71 a 1,16 mg/mm; e G= 1,39 ± 0,37 mg/mm, variando de 0,77 a 1,69 mg/mm. A relação MI/CI também foi mais elevada no subgrupo de fetos que foi submetido à gastrosquise experimental com 19,5 dias de gestação ($p<0,05$ ANOVA entre G x C e G x Sh). Não houve diferença estatística quando comparado os dois subgrupos de fetos submetidos a gastrosquise em diferentes momentos (GRÁFICO 5).

GRÁFICO 5 – Gráfico comparando as medidas da relação MI/CI dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP (* $p<0,05$).

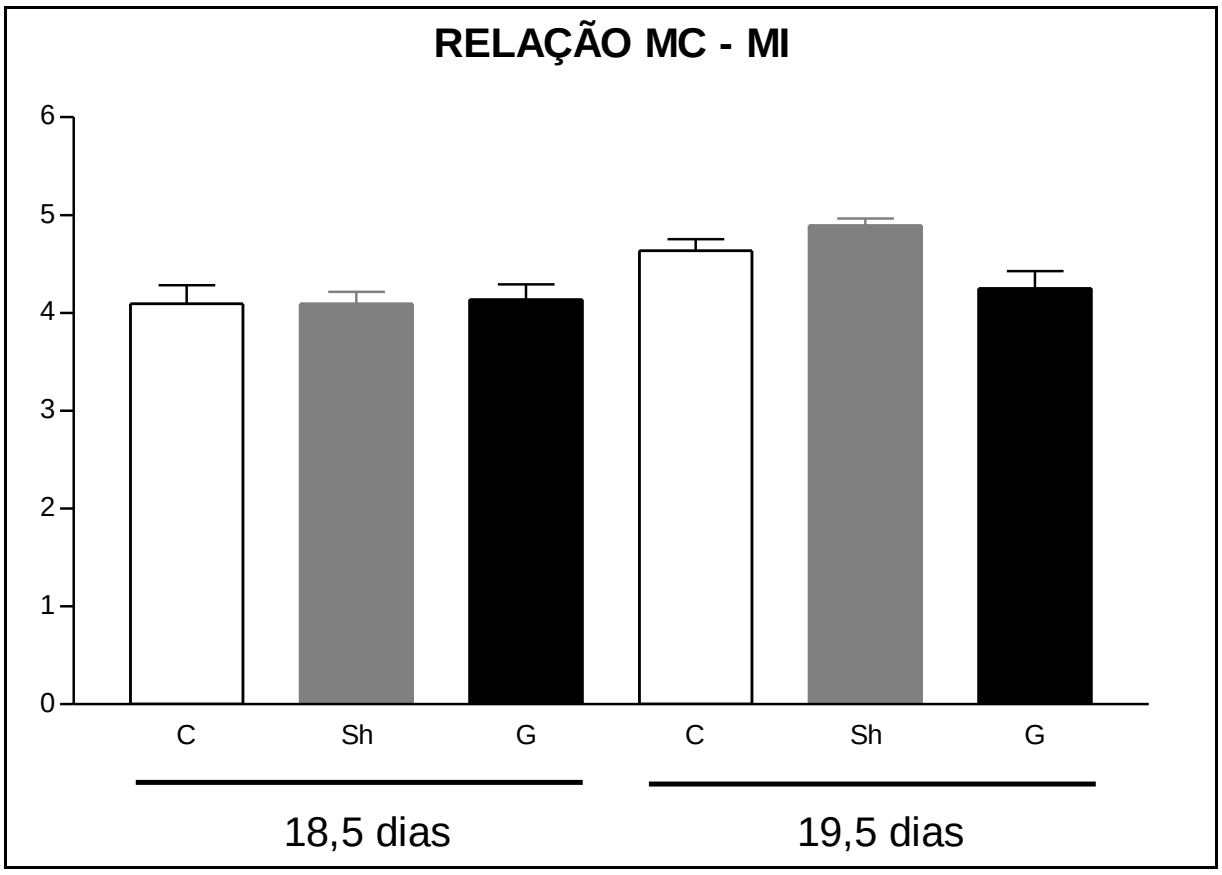
4.2.6 Diferença Massa Corpórea-Massa Intestinal (MC-MI)

As médias das diferenças entre a massa corpórea e massa intestinal dos fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação foram: C= 4,09 ± 0,62g, variando de 3,19 a 5,23g; Sh= 4,09 ± 0,41g, variando de 3,43 a 5,12g; e G= 4,14 ± 0,52g, variando de 3,09 a 4,80g.

As médias das diferenças entre a massa corpórea e massa intestinal dos fetos das ratas operadas com 19,5 dias de gestação foram: C= 4,63 ± 0,29g, variando de 4,32 a 5,04g; Sh= 4,89 ± 0,12g, variando de 4,82 a 5,04g; e G= 4,25 ± 0,44g, variando de 3,59 a 4,92g.

Não houve diferença significante de MC-MI entre os subgrupos, quando comparados no mesmo grupo ou em grupos diferentes (GRÁFICO 6).

GRÁFICO 6 – Gráfico comparando as medidas da relação MC-MI dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP.

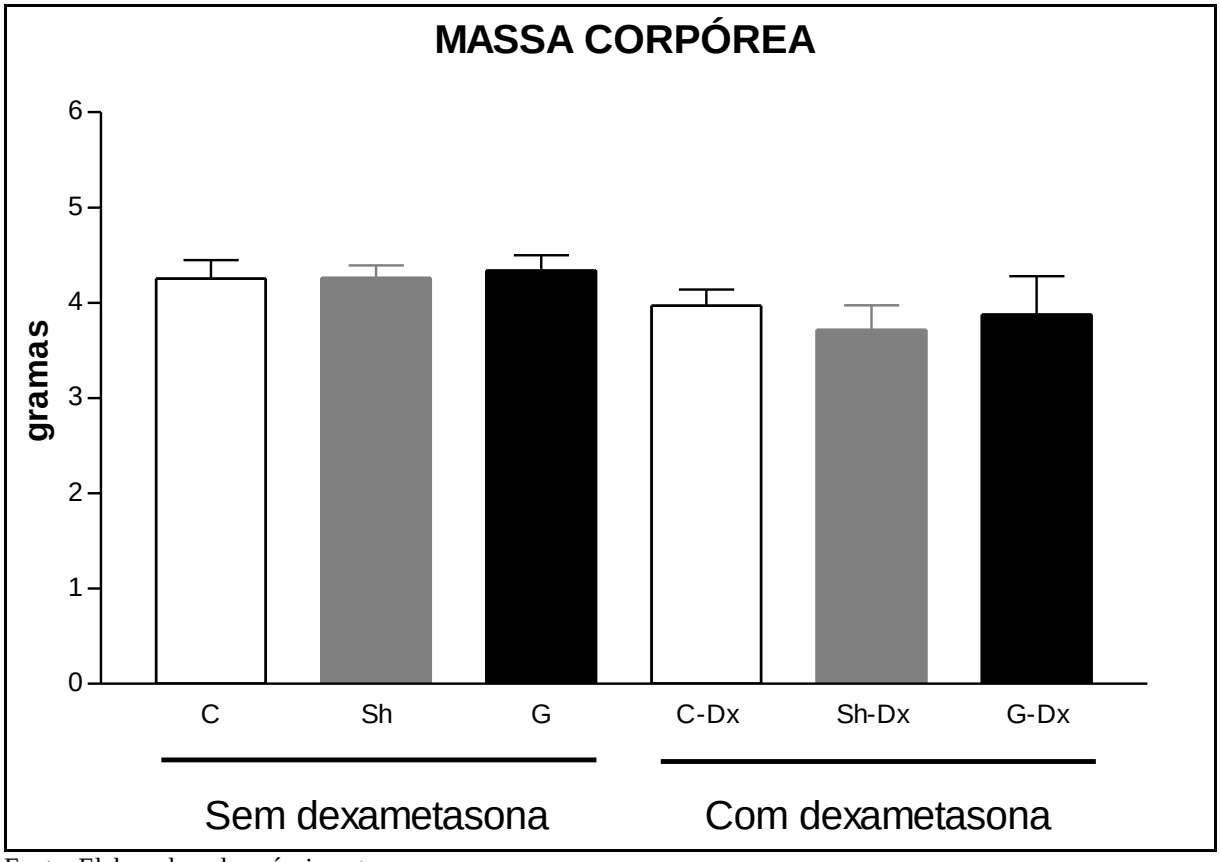
4.3 Resultados da morfometria: Efeito do tratamento com dexametasona

4.3.1 Massa corpórea (MC)

As médias da MC para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação e sem tratamento com dexametasona foram: C= 4,25g ± 0,62g, variando de 3,32 a 5,41g; Sh= 4,65 ± 0,42g, variando de 3,54 a 5,29g; e G= 4,34 ± 0,53g, variando de 3,26 a 5,01g.

Para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação e submetidas a tratamento com dexametasona, os resultados da massa corpórea foram: C-Dx= 3,97 ± 0,38g, variando de 3,43 a 4,36g; Sh-Dx= 3,71 ± 0,58g, variando de 3,03 a 4,51g; e G-Dx= 3,87 ± 0,81g, variando de 2,88 a 4,87g. Não houve diferença significante da MC entre os subgrupos tratados ou não com dexametasona (GRÁFICO 7).

GRÁFICO 7 – Gráfico comparando as medidas da massa corpórea dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona.



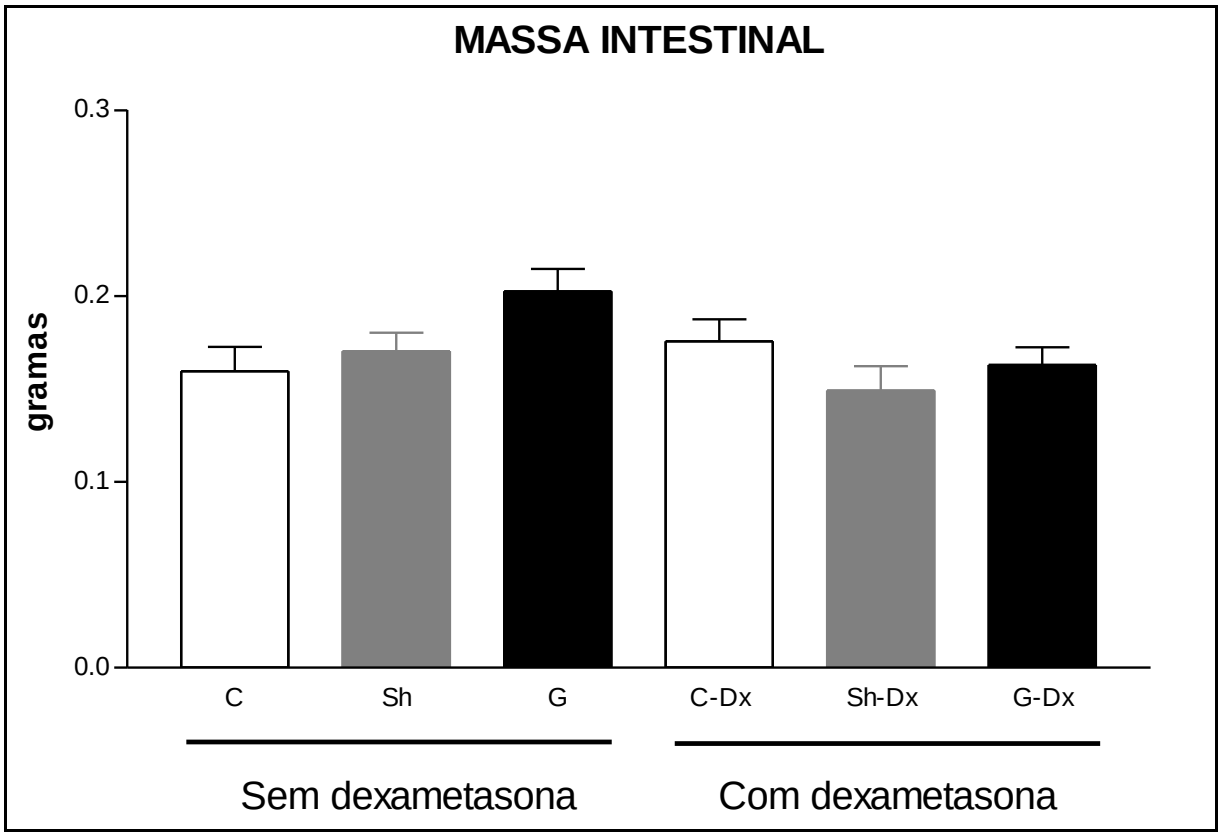
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP.

4.3.2 Massa intestinal (MI)

As médias da MI para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação, sem tratamento com dexametasona, foram: C= 0,16 ± 0,04g, variando de 0,10 a 0,24g; Sh= 0,17g ± 0,03g, variando de 0,11 a 0,22g; e G= 0,20 ± 0,04g, variando de 0,14 a 0,27g.

Para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação e submetidas a tratamento com dexametasona os resultados da MI foram: C-Dx= 0,17 ± 0,03g, variando de 0,14 a 0,22g; Sh-Dx= 0,15 ± 0,03, variando de 0,12 a 0,20g; G-Dx= 0,16 ± 0,02g, variando de 0,14 a 0,18g. Não houve diferença significante da massa intestinal entre os subgrupos, quando comparados no mesmo grupo ou em grupos diferentes (GRÁFICO 8).

GRÁFICO 8 – Gráfico comparando as medidas da massa intestinal dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP.

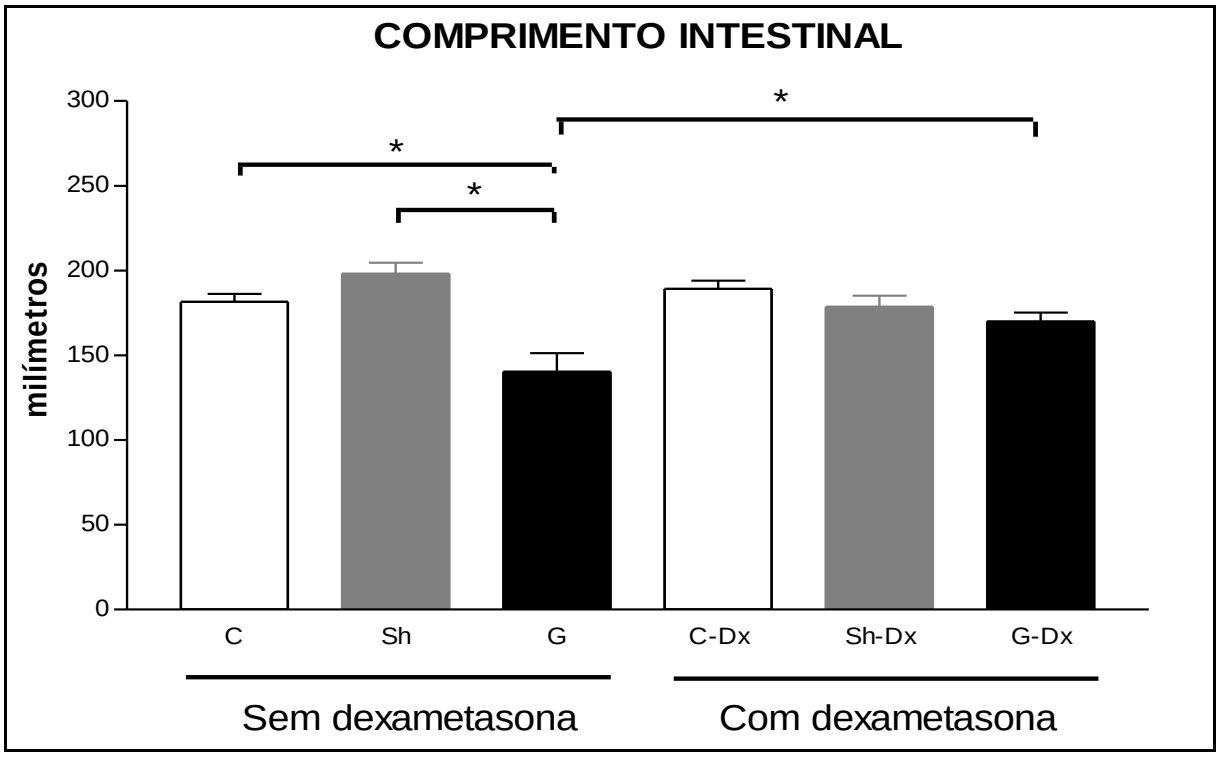
4.3.3 Comprimento intestinal (CI)

As médias dos CI para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação, sem tratamento com dexametasona, foram: C= 181,5 ± 15,7mm, variando de 156 a 200mm; Sh= 198 ± 22,2mm, variando de 158 a 230mm; e G= 140,4 ± 36,4mm, variando de 85 a 201mm.

Para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação e submetidas a tratamento com dexametasona os resultados do comprimento intestinal foram: C-Dx= 189,2 ± 10,9mm, variando de 170 a 197mm; Sh-Dx= 178,6 ± 14,6mm, variando de 160 a 192mm; G-Dx= 169,8 ± 12,3mm, variando de 150 a 180mm.

No grupo sem tratamento, o CI foi estatisticamente menor no subgrupo com gastrosquise quando comparado aos subgrupos controle e ao sham ($p<0,001$). Não houve diferença estatística na comparação do CI entre os subgrupos tratados com dexametasona. O subgrupo de gastrosquise das ratas tratadas com dexametasona apresentou um CI maior que o subgrupo de gastrosquise das ratas não tratadas ($p<0,05$) (GRÁFICO 9).

GRÁFICO 9 – Gráfico comparando as medidas do comprimento intestinal dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona.



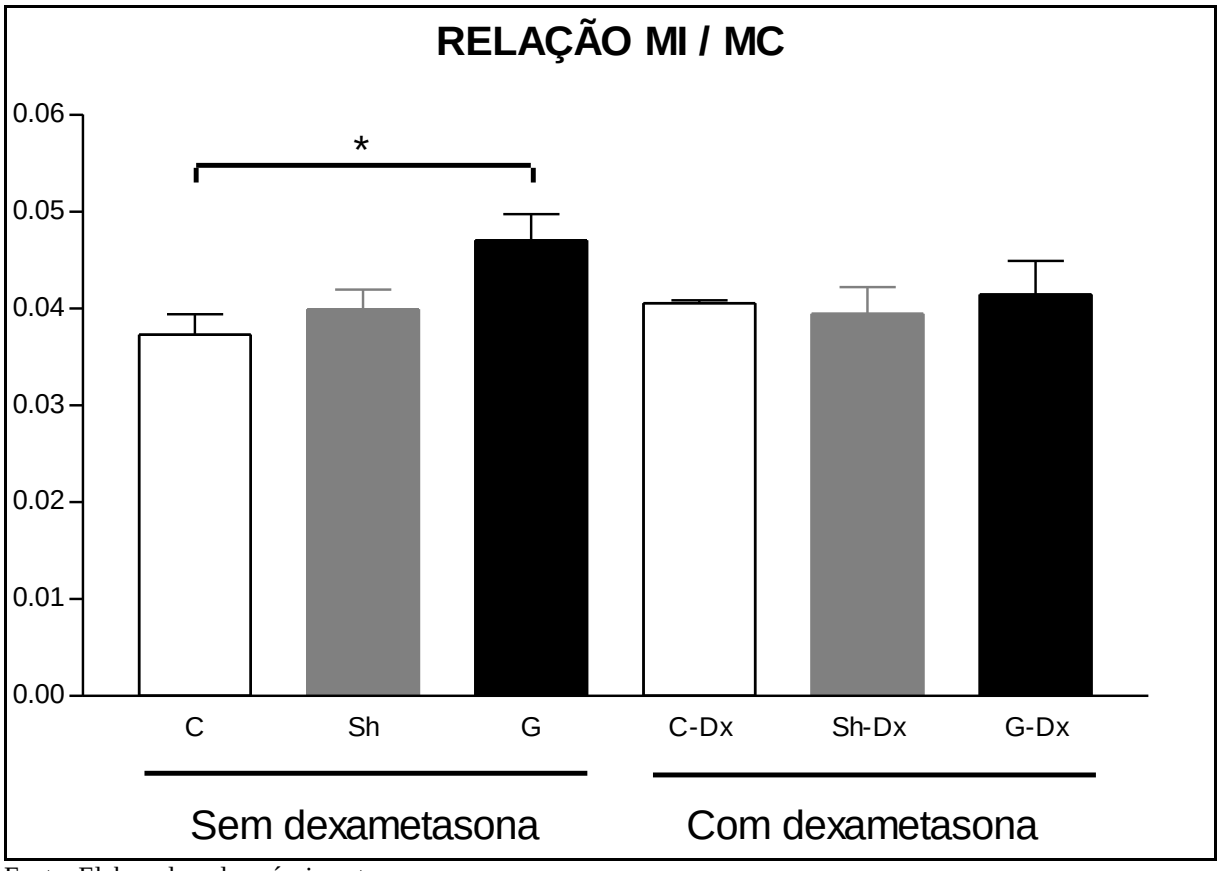
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP (* p<0,05).

4.3.4 Relação Massa Intestinal / Massa Corpórea (MI/MC)

As médias das relações MI/MC para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação, sem tratamento com dexametasona, foram: C= 0,037 ± 0,007, variando de 0,030 a 0,053; Sh= 0,039 ± 0,007, variando de 0,031 a 0,052; e G= 0,047 ± 0,009, variando de 0,031 a 0,055. No grupo de ratas não tratadas, a relação MI/MC foi significativamente maior no subgrupo submetido a gastrosquise, quando comparado com o grupo controle.

Para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação e submetidas a tratamento com dexametasona os resultados das relações MI/MC foram: C-Dx= 0,040 ± 0,001, variando de 0,040 a 0,041; Sh-Dx= 0,039 ± 0,004, variando de 0,034 a 0,043; e G-Dx= 0,041 ± 0,006, variando de 0,034 a 0,046. Não houve diferença significativa na relação MI/MC, entre os subgrupos, quando tratados com dexametasona (GRÁFICO 10).

GRÁFICO 10 – Gráfico comparando as medidas da relação MI/MC dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP. (* p<0,05).

4.3.5 Relação Massa Intestinal / Comprimento Intestinal (MI/CI)

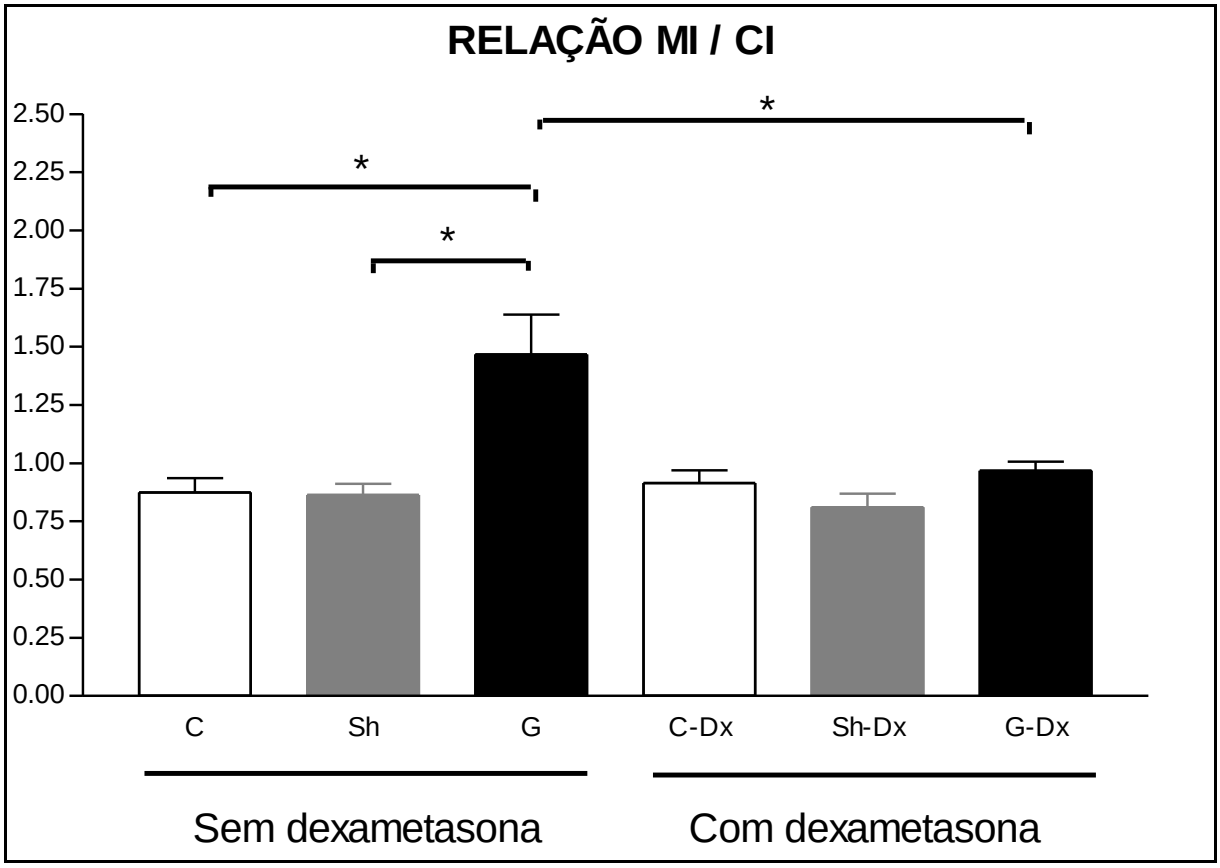
As médias das relações MI/CI para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação, sem tratamento com dexametasona, foram: C= 0,87 ± 0,20 mg/mm, variando de 0,64 a 1,26 mg/mm; Sh= 0,86 ± 0,16 mg/mm, variando de 0,67 a 1,17 mg/mm; e G= 1,47 ± 0,57 mg/mm, variando de 0,78 a 2,61 mg/mm.

A média das relações MI/CI para os fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação e submetidas a tratamento com dexametasona foram: C-Dx= 0,91 ± 0,12 mg/mm,

variando de 0,82 a 1,12 mg/mm; Sh-Dx= 0,81 ± 0,13 mg/mm, variando de 0,71 a 1,03 mg/mm; G-Dx= 0,97 ± 0,08 mg/mm, variando de 0,91 a 1,08 mg/mm.

A relação MI/CI foi mais elevada no subgrupo de fetos que foi submetido à gastrosquise experimental com 18,5 dias de gestação, sem tratamento com dexametasona, quando comparado com fetos controle e sham (p<0,01). Não houve diferença significativa na relação MI/CI, entre os subgrupos, quando tratados com dexametasona. A relação MI/CI foi estatisticamente menor nos fetos com gastrosquise, quando tratados com dexameasona, comparando com os fetos com gastrosquise não tratasos (p<0,01) (GRÁFICO 11).

GRÁFICO 11 – Gráfico comparando as medidas da relação MI/CI dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP (* p<0,05).

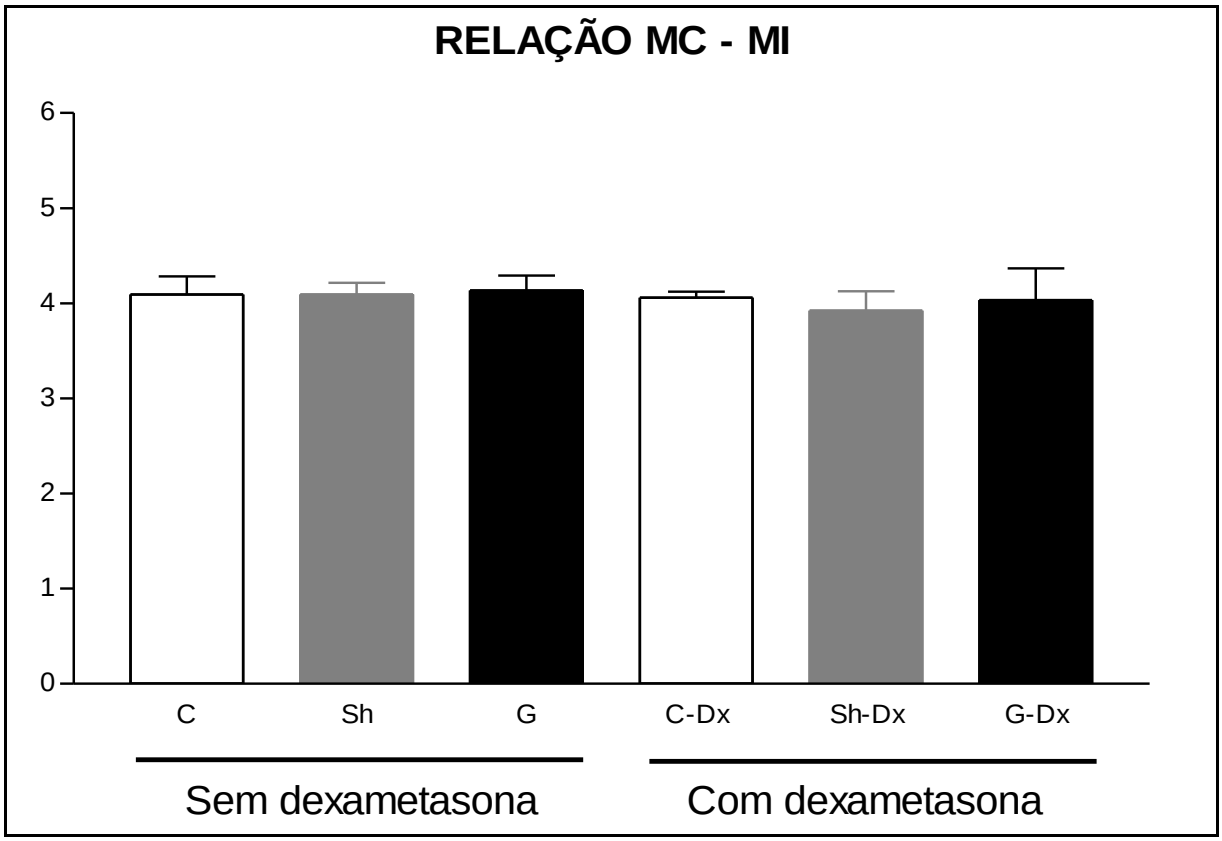
4.3.6 Diferença Massa Corpórea-Massa Intestinal (MC-MI)

As médias das diferenças entre a massa corpórea e massa intestinal dos fetos das ratas operadas com 18,5 dias de gestação, sem tratamento com dexametasona, foram: C= 4,09 ± 0,62g, variando de 3,19 a 5,23g; Sh= 4,09 ± 0,41g, variando de 3,43 a 5,12g; e G= 4,14 ± 0,52g, variando de 3,09 a 4,80g.

Para os fetos de ratas tratadas com dexametasona os resultados foram: C-Dx= 4,06 ± 0,11g, variando de 3,97 a 4,18g; Sh-Dx= 3,92 ± 0,35g, variando de 3,64 a 4,32g; e G-Dx= 4,03 ± 0,58g, variando de 3,67g a 4,70g.

Não houve diferença significante de MC-MI entre os subgrupos, quando comparados no mesmo grupo ou em grupos diferentes (GRÁFICO 12).

GRÁFICO 12 – Gráfico comparando as medidas da relação MC-MI dos fetos controle, sham e gastrosquise em ratas operadas com 18,5 dias de gestação, em grupos sem e com tratamento com dexametasona.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP (* p<0,05).

TABELA 1 – Resultados da morfometria nos grupos de ratas operadas com 18,5 e 19,5 dias de gestação.

Medidas	Grupo 18,5 dias			Grupo 19,5 dias		
	C (n=11)	Sh (n=11)	G (n=11)	C (n=06)	Sh (n=06)	G (n=06)
MC (g)	4,25 ± 0,62	4,65 ± 0,42	4,34 ± 0,53	4,81 ± 0,29	4,96 ± 0,44	4,46 ± 0,43
MI (g)	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,04
CI (mm)	181,5 ± 15,7	198 ± 22,2	140,4 ± 36,4[a,b]	223,5 ± 31,5	210 ± 34,2	136,8 ± 21,6[a,b]
MI/MC (g)	0,037 ± 0,007	0,039 ± 0,007	0,047 ± 0,009	0,037 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,042 ± 0,007
MI/CI (mg/mm)	0,87 ± 0,20	0,86 ± 0,16	1,47 ± 0,57[a,b]	0,79 ± 0,07	0,92 ± 0,19	1,39 ± 0,37[a]
MC-MI (g)	4,09 ± 0,62	4,09 ± 0,41	4,14 ± 0,52	4,63 ± 0,29	4,89 ± 0,12	4,25 ± 0,44

Fonte: Elaborado pelo próprio autor. Valores em média ± DP. [a]$p<0,05$, gastrosquise comparado ao controle no mesmo grupo; [b]$p<0,05$, gastrosquise comparado ao sham no mesmo grupo.

TABELA 2 – Resultados da morfometria nos grupos de ratas operadas com 18,5, não tratadas e tratadas com dexametasona.

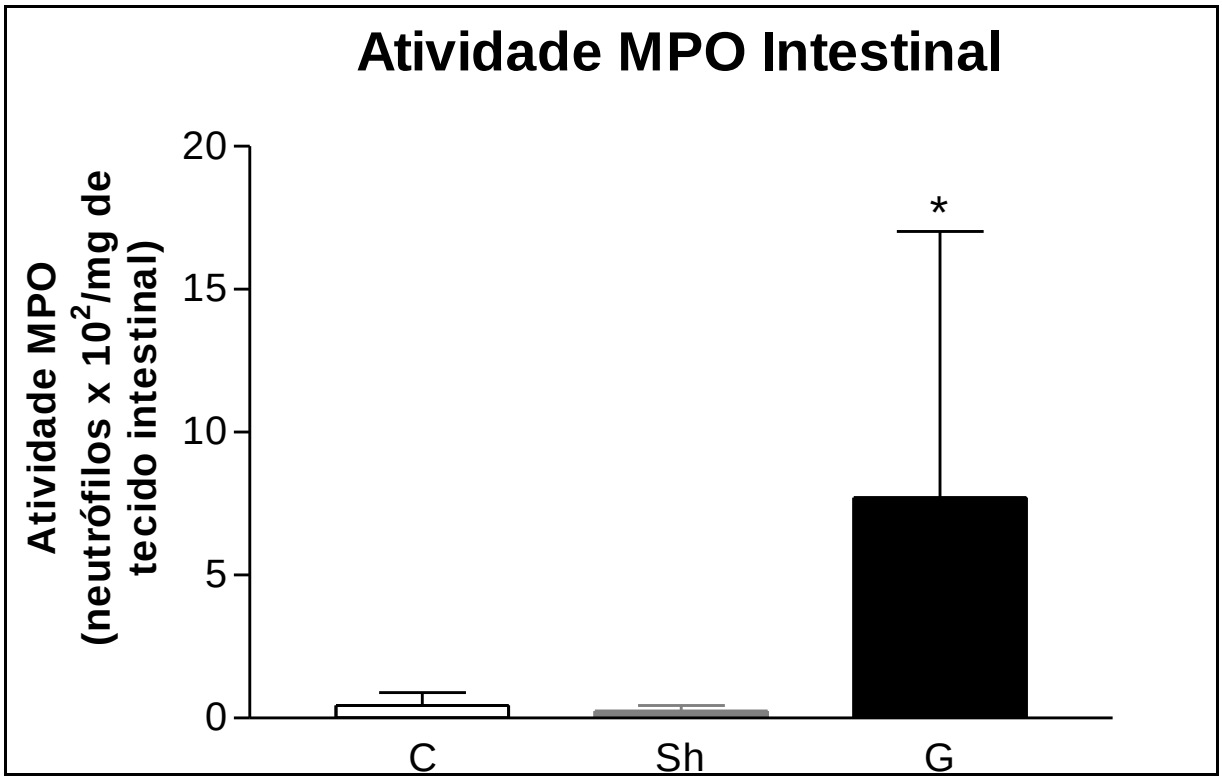
Medidas	Grupo sem dexametasona			Grupo com dexametasona		
	C (n=11)	Sh (n=11)	G (n=11)	C (n=05)	Sh (n=05)	G (n=05)
MC (g)	4,25 ± 0,62	4,65 ± 0,42	4,34 ± 0,53	3,97 ± 0,38	3,71 ± 0,58	3,87 ± 0,81
MI (g)	0,16 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,16 ± 0,02
CI (mm)	181,5 ± 15,7	198 ± 22,2	140,4 ± 36,4[a,b,c]	189,2 ± 10,9	178,6 ± 14,6	169,8 ± 12,3[c]
MI/MC (g)	0,037 ± 0,007	0,039 ± 0,007	0,047 ± 0,009[a]	0,040 ± 0,001	0,039 ± 0,004	0,041 ± 0,006
MI/CI (mg/mm)	0,87 ± 0,20	0,86 ± 0,16	1,47 ± 0,57[a,b,c]	0,91 ± 0,12	0,81 ± 0,13	0,97 ± 0,08[c]
MC-MI (g)	4,09 ± 0,62	4,09 ± 0,41	4,14 ± 0,52	4,06 ± 0,11	3,92 ± 0,35	4,03 ± 0,58

Fonte: Elaborado pelo próprio autor. Valores em média ± DP. [a]$p<0,05$, gastrosquise comparado ao controle no mesmo grupo; [b]$p<0,05$, gastrosquise comparado ao sham no mesmo grupo [c]$p<0,05$, gastrosquise comparado a gastrosquise entre grupos diferentes.

4.4 Resultado do ensaio da MPO

O grupo de fetos das ratas não tratadas com dexametasona e submetidos à gastrosquise com 18,5 dias de gestação apresentaram elevação da atividade da MPO intestinal, quando comparado aos fetos dos grupos controle e sham (GRÁFICO 13).

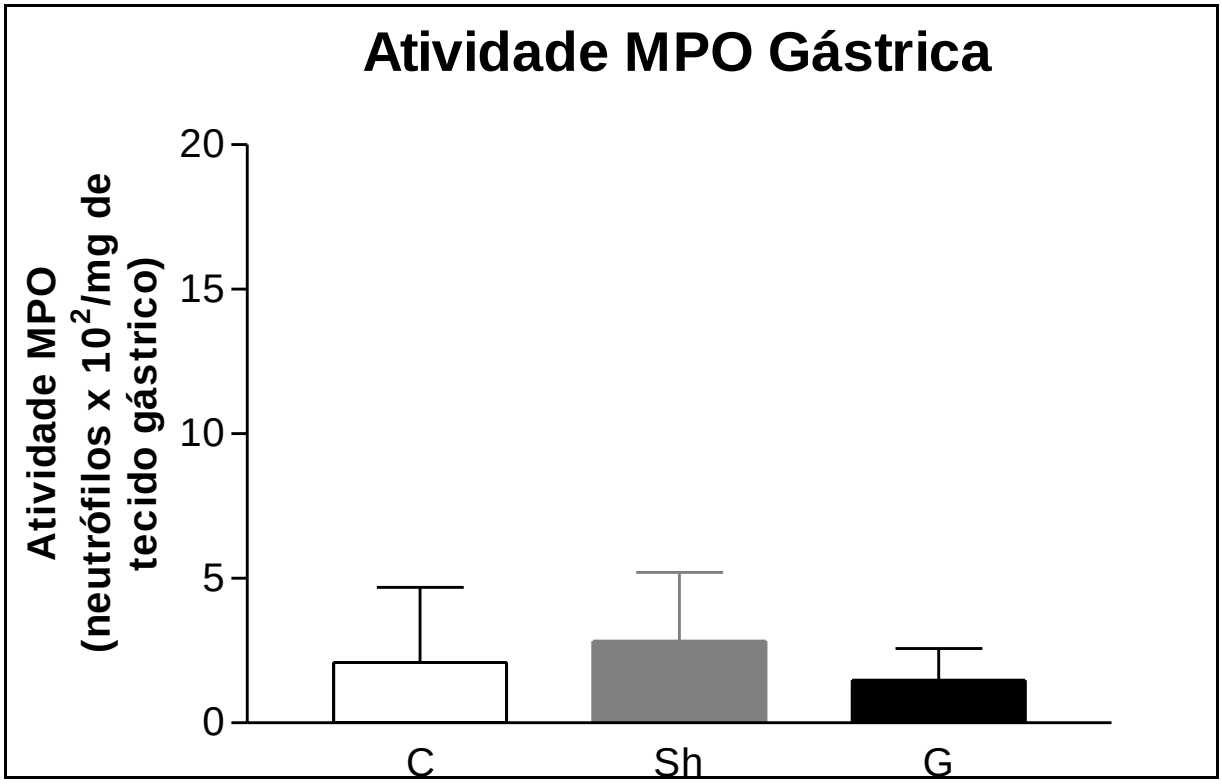
GRÁFICO 13 – Gráfico comparando a atividade da enzima mieloperoxidade intestinal dos fetos controle, sham e com gastrosquise, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP. (*p<0,01)

A avaliação da atividade da MPO nos estômagos dos fetos das ratas, operadas com 18,5 dias de gestação, não tratadas com dexametasona, não demonstrou diferença entre os três grupos, C, Sh e G (GRÁFICO 14).

GRÁFICO 14 – Gráfico comparando a atividade da enzima mieloperoxidade gástrica dos fetos controle, sham e com gastrosquise, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento.

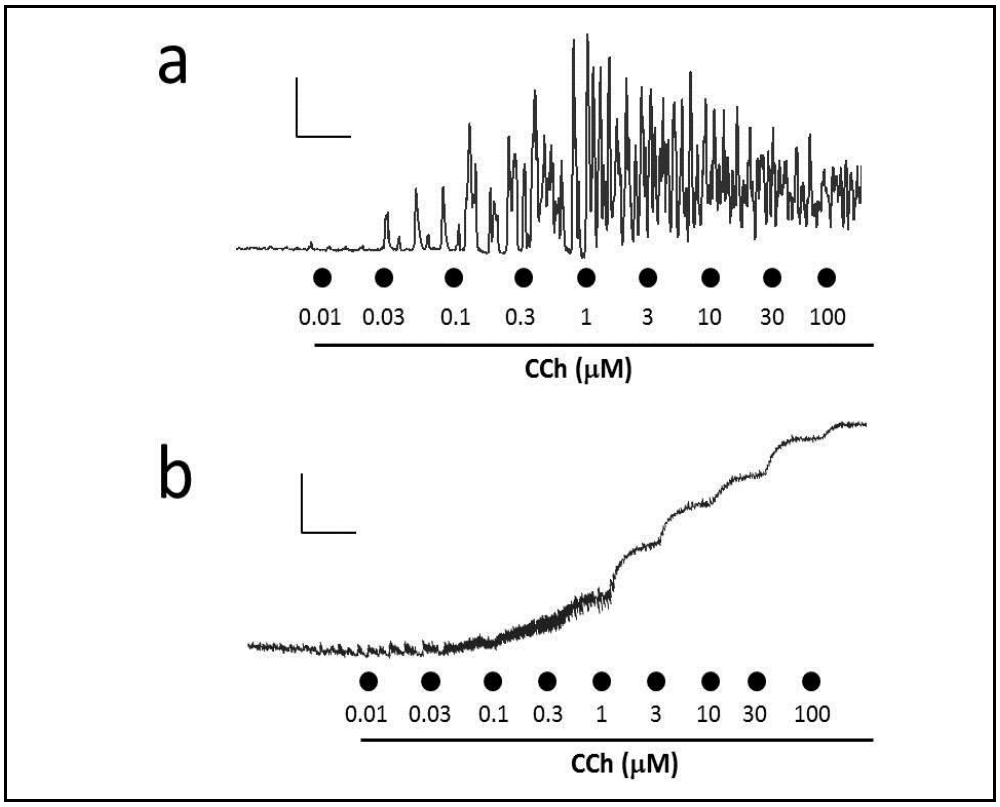


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (C) grupo controle, (Sh) grupo Sham e (G) grupo gastrosquise. Valores em média ± DP.

4.5 Resultado da contratilidade gástrica

Os segmentos de antro e fundo, sob condições basais, dos fetos controle mostraram contrações oscilatórias espontâneas com amplitude de 13,19 ± 4,71 mg/mg de tecido (n = 5) e 2,13 ± 2,00 mg/mg de tecido (n = 8), respectivamente, valores que não diferiram dos obtidos no grupo Sh ou G (TABELA 3; p> 0,05, ANOVA). Concentrações crescentes de CCh (0,01-100 µM) produziram diferentes efeitos sobre ambos os segmentos, que foram caracterizados por um aumento significativo, não sustentado, na amplitude e frequência das contrações espontâneas no músculo liso antral (GRÁFICO 15a), enquanto que um aumento sustentado do tônus foi observado em tecidos fúndicos (GRÁFICO 15b).

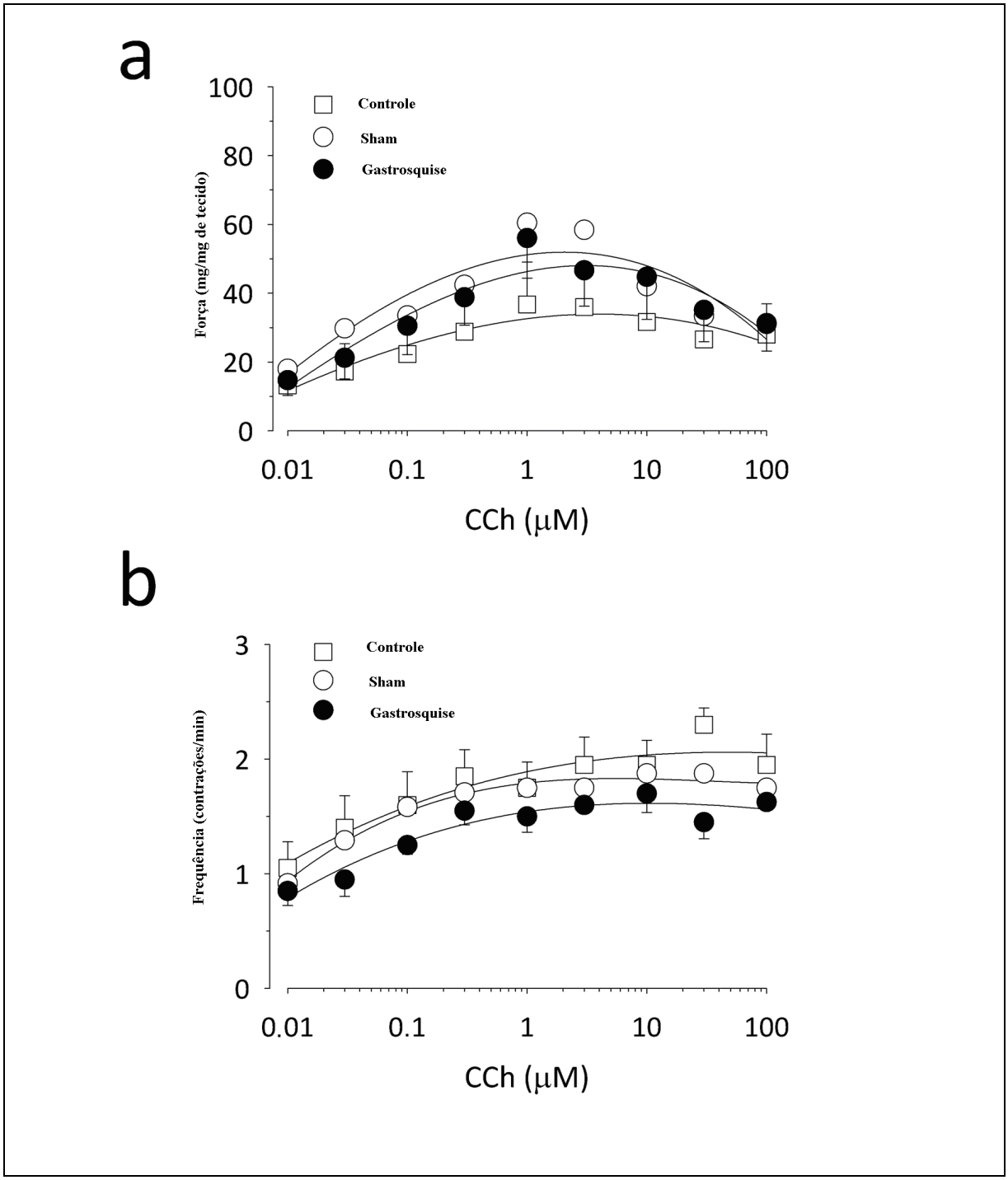
GRÁFICO 15 – Gráfico comparando efeitos da adição de carbacol em segmentos gástricos dos fetos com gastrosquise, controle e sham, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (a) Traçado obtido em antro gástrico (controle); (b) traçado obtido em fundo gástrico (controle).
Calibração: vertical = 100 mg; horizontal = 5 min.

Em segmentos antrais de fetos controle, os valores máximos de amplitude e frequência após adição de CCh foram 37,97 ± 12,92 mg/mg de tecido e 2,30 ± 0,14 contrações/min, que foram observados com a concentração de CCh de 1 e 30 uM, respectivamente (GRÁFICO 16). Estes valores foram significativamente mais elevados do que aqueles em condições basais registradas antes da adição de CCh. Porém, a comparação entre os grupos, não revelou diferença significativa nem na amplitude, nem na freqüência comparando os valores máximos de tecidos antrais (TABELA 3; p> 0,05, ANOVA).

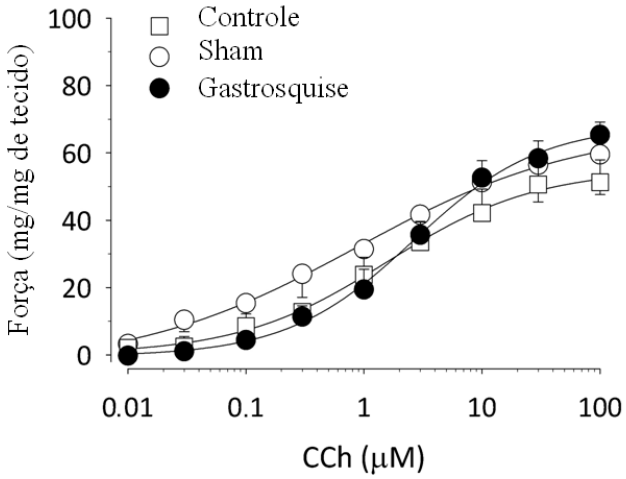
GRÁFICO 16 – Comparação da resposta induzida por carbacol em segmentos de antro gástrico dos fetos com gastrosquise, controle e sham, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: (a) Traçado relativo à força e (b) referente à freqüência. Diferentes concentrações de CCh (0,01-100 µM). Força foi aferida pico a pico e a amplitude expressa em mg/mg de tecido, enquanto a frequência foi expressa em número de contrações/min. Valores expressos em média ± DP. A análise estatística entre os grupos não foi significante ($p > 0,05$).

Na musculatura lisa fúndica, o efeito contrátil induzido por CCh seguiu um formato sigmoidal típico na curva de concentração-efeito, que mostraram respostas crescentes, de uma maneira dependente da concentração (p <0,001, ANOVA), depois de cada aumento da concentração do agente muscarínico (GRÁFICO 17). Em todos os grupos, o primeiro efeito significativo induzido pelo CCh foi observado com 1 µM (p <0,05, teste de Holm-Sidak). Em animais do grupo controle, o valor de EC50 foi de 1,60 [0,89-2,86] µM, enquanto que no S ou G os valores foram 1,15 [0,45 -2,97] µM e 1,96 [0,92-4,21] µM, respectivamente (TABELA 3). Estes valores não atingiram diferença estatística (p> 0,05, ANOVA). Nos segmentos fúndicos, o efeito máximo (Emax) foi alcançado com 100 µM e correspondeu a 51,24 ± 6,72, 59,57 ± 11,97 e 65,36 ± 3,82 mg/mg de tecido nos grupos C, S e G, respectivamente. A comparação entre os grupos dos valores de Emax não alcançou significância estatística (TABELA 3; p> 0,05, Mann-Whitney U-test).

GRÁFICO 17 – Comparação da resposta induzida por carbacol em segmentos de fundo gástrico dos fetos com gastrosquise, controle e sham, em ratas operadas com 18,5 dias e sem tratamento.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.
Nota: Traçado relativo à força. Valores médios da força exercida por segmentos de fundo gástrico de estômagos de fetos de ratos submetidos a concentrações crescentes de CCh (0,01-100 µM). Força foi aferida pico a pico e a amplitude expressa em mg/mg de tecido, enquanto a frequência foi expressa em número de contrações/min. Valores expressos em média ± DP. A análise estatística entre os grupos não foi significante (p > 0,05).

TABELA 3 – Parâmetros da contratilidade da musculatura lisa em segmentos de estômago de fetos de ratos.

	Controle	Sham	Gastrosquise
Antro	(n = 5)	(n = 6)	(n = 5)
Amplitude da contração espontânea pico a pico			
Antes do CCh	13,19 ± 4,71	18,02 ± 6,43	14,72 ± 4,47
Após CCh	37,97 ± 12,92*	60,51 ± 13,69*	56,04 ± 11,68*
Frequência das contrações espontâneas			
Antes do CCh	0,65 ± 0,13	0,54 ± 0,15	0,50 ± 0,14
Após CCh	2,30 ± 0,14*	1,87 ± 0,11*	1,70 ± 0,16*
Fundo	(n = 8)	(n = 7)	(n = 6)
Força máxima sustentada induzida pelo CCh	51,24 ± 6,72	59,57 ± 11,97	65,36 ± 3,82
EC_{50} (µM)	1,60 [0,89 – 2,86]	1,15 [0,45 -2,97]	1,96 [0,92 – 4,21]

Valores da amplitude pico a pico e E_{max} são expressos em mg/mg de tecido;
Valores da freqüência de contrações são expressos em número de contrações por minuto;
Valores da EC_{50} são expressos em µM [95% intervalo de confiança];
Valores expressos como "Após CCh" são considerados como o efeito máximo significante;
* $p < 0,05$, Newman-Keuls test, comparados com valores antes do CCh.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Estudos experimentais em ovelhas sugeriram que a lesão intestinal presente nos fetos com gastrosquise era decorrente de isquemia provocada pela falha da parede abdominal e, também, por exposição das alças ao líquido amniótico (MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006). Porém, outros estudos mostraram que a criação de defeitos de parede abdominal com diferentes dimensões de orifícios não alteraram as lesões do intestino extruso (ALBERT *et al.*, 2001). Em estudos subsequentes, ficou comprovado que o contato com o LA é o principal fator causal do processo inflamatório intestinal, ao invés da compressão exercida pelo orifício da parede abdominal (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001; CORREIA-PINTO *et al.*, 2002; BITTENCOURT *et al.*, 2006; CAĞLAR *et al.*, 2007; HOLLAND; WALKER; BADAWI, 2010).

Essa exposição prolongada desencadeia alterações funcionais e estruturais das alças intestinais, comprovadas ao nascimento, que são consequências diretas ou indiretas do processo inflamatório iniciado intra-útero (SNYDER, 1999; DRIVER, *et al*, 2000). A composição do LA é alterada ao longo de toda a gestação. O encurtamento, dilatação e espessamento intestinal na gastrosquise ocorrem, principalmente, no último trimestre da gravidez, quando o LA sofre modificações em sua composição relacionadas, em parte, à maturação da função renal fetal (TIBBOEL *et al*., 1986a; LANGER *et al*., 1989; SHAW *et al*., 1994).

Diferentes modelos experimentais em animais auxiliam na compreensão dos mecanismos envolvidos com a lesão intestinal em fetos com gastrosquise (MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006). Os modelos mais utilizados são com fetos de galinhas (AKTUG *et al.*,1998), de ovelhas (LANGER, *et al.*,1990), de coelhas (PHILLIPS *et al.*,1991; ALBERT *et al.*,2001) e, mais recentemente, de ratas (CORREIA PINTO *et al.*, 2001).

O modelo de Correia-Pinto *et al*. apresenta vantagens em relação aos demais, pois o experimento com ratos permite um baixo custo, reduzido tempo de gestação (por volta de 21,5 dias), maior disponibilidade de fetos por gravidez (8 a 12 fetos), o índice de abortamento e de trabalho de parto prematuro é baixo e os anticorpos para estudos de biologia molecular são disponíveis no mercado (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001).

O presente estudo conseguiu reproduzir o modelo experimental, descrito originalmente por Correira-Pinto *et al.* (2001), porém foram encontradas taxas de óbito fetal e abortamento maiores do que as descritas na literatura (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001). Esses

resultados, possivelmente, se devem a uma curva de aprendizado ou por diferenças no manejo do animal.

Considerando que o tempo de exposição das alças intestinais interfere no prognóstico neonatal, autores defendem a tese que a antecipação do parto pode reduzir a morbidade dos recém-nascidos com gastrosquise (LANGER *et al.*, 1993; MOORE *et al.*, 1999; MOIR *et al.*, 2005). No modelo de Correia-Pinto *et al*. a cirurgia experimental foi realizada com 18,5 dias de gestação (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001).

No intuito de melhor entender como o tempo de exposição das alças intestinais ao líquido aminótico induz lesão intestinal, foram estudados dois grupos com momentos diferentes de realização da gastrosquise experimental, 18,5 e 19,5 dias de gestação. As alterações morfométricas foram semelhantes entre os dois grupos. França *et al*. (2008), também avaliando grupos com realização da gastrosquise experimental com 18,5 e 19,5 dias de gestação, observaram que o maior tempo de exposição ao líquido amniótico reduziu consideravelmente o comprimento intestinal dos fetos com gastrosquise. Além da redução do CI, foi observado um retardo na maturidade do plexo mioentérico no grupo com gastrosquise criada no 18,5º dia de gestação da rata.

A restrição de crescimento intraútero (RCIU) é um achado frequente em fetos humanos acometidos por gastrosquise, quando avaliados por ecografia (RAYNOR; RICHARDS, 1997; FRIES *et al.*, 1993; PULIGANDLA *et al.*, 2004; PAYNE *et al.*, 2011). Aproximadamente metade dos fetos humanos portadores de gastrosquise apresenta RCIU (ANTEBY; STERNHELL; DICKE, 1999). Estudos em ratos também observaram a presença de RCIU nos fetos submetidos à gastrosquise experimental (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001; OYACHI *et al.*, 2004; MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006; BITTENCOURT *et al.*, 2006).

O presente estudo não observou RCIU dos fetos submetidos à gastrosquise experimental nas diferentes idades gestacionais. Estudos, em diferentes modelos animais que reproduziram a falha anatômica no abdome fetal, simulando uma gastrosquise, reportaram uma RCIU nos fetos acometidos (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001; OYACHI *et al.*, 2004; MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006; BITTENCOURT *et al.*, 2006). Porém, França *et al*., também avaliando grupos com realização da gastrosquise experimental com 18,5 e 19,5 dias de gestação, não observaram RCIU nos fetos com gastrosquise (FRANÇA *et al.*, 2008).

O mecanismo responsável pela RCIU dos fetos com gastrosquise não está completamente esclarecido, pois pode ser resultante primariamente da gastrosquise ou então de fatores outros que não o próprio defeito congênito (BLAKELOCK *et al.*, 1997). Em grande parte dos casos, a RCIU observada em humanos é do tipo simétrica, já iniciando na primeira metade da gravidez, não se limitando somente ao último trimestre, período em que surgem, de forma mais intensa, as lesões intestinais (PAYNE *et al*., 2011). Em humanos, as gestantes com fetos acometidos pela gastrosquise, em geral, apresentam outros fatores de risco, que também são fatores de risco para RCIU, como por exemplo: primigestas jovens, fumantes e com baixo índice de massa corporal (SIEGA-RIZ *et al.*; 2009; PAYNE *et al.*, 2011).

A ausência de RCIU, nos fetos com gastrosquise estudados, sugere que outros fatores, independentes da gastrosquise, sejam responsáveis pela redução da massa corpórea fetal, não identificados nesse estudo (REED *et al.*, 2012).

As alças intestinais de fetos humanos com gastrosquise sofrem alterações macroscópicas, caracterizada principalmente pelo edema e presença de fibrina, bem evidentes ao nascimento, o que dificulta, consideravelmente, a correção cirúrgica da falha abdominal (LEDBETTER, 2012). Os estudos em animais com gastrosquise confirmaram essa observação, sendo descrita a elevação na massa e redução no comprimento das alças intestinais, como principais alterações morfológicas (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001; BITTENCOURT *et al.*, 2006).

O CI também foi drasticamente afetado nos fetos com gastrosquise, em ambos os grupos (18,5 e 19,5 dias), demonstrando o impacto negativo da exposição ao LA sobre seu desenvolvimento. O CI dos fetos com gastrosquise atingiu cerca 77% (cirurgia com 18,5 dias) e 61% (cirurgia com 19,5 dias) do CI dos fetos controle, dados semelhantes aos encontrados na literatura (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001; BITTENCOURT *et al.*, 2006; SBRAGIA *et al.*, 2010).

O CI reduzido na gastrosquise ainda é pouco compreendido. Questiona-se se haveria a ocorrência de encurtamento intestinal ou de retardo em seu desenvolvimento. Além do dano intestinal causado pelo contato direto com o LA, ocorreria uma resposta inflamatória sistêmica, que, também explicaria um retardo no desenvolvimento intestinal, podendo afetar

outros órgãos abdominais, como por exemplo o estômago (GOMEZ *et al*., 1998; FRANÇA *et al.*, 2008).

Não houve diferença na avaliação isolada da MI dos fetos com gastrosquise, quando comparados aos fetos C e Sh, em ambos os grupos. Porém, a avaliação da relação massa intestinal por comprimento intestinal (MI/CI) demonstrou um maior ganho de massa por cada milímetro de comprimento intestinal nos fetos com gastrosquise nos dois grupos, quando comparados aos fetos C e Sh (18,5 dias) ou somente ao C (19,5dias). Esse dado sugere presença de intenso processo inflamatório. Esses dados são semelhantes aos achados de outros autores da literatura (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001; BITTENCOURT *et al*., 2006; SBRAGIA *et al*., 2010).

A inflamação aguda é uma resposta do organismo à infecção, lesão imune, ou tóxica tecidual. No processo inflamatório inicial, ocorre um recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão, para ajudar na eliminação dos agentes nocivos e na degradação de tecido necrótico decorrente do dano celular, desencadeando os eventos de cura e reconstituição dos tecidos danificados. Entretanto, as células inflamatórias também podem apresentar efeitos deletérios, prolongando a inflamação e induzindo lesão tecidual. Tal efeito ocorre através da liberação de enzimas, radicais tóxicos do oxigênio e mediadores químicos, como as citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2004).

Os estudos sobre os mecanismos fisiopatológicos das alterações intestinais nos casos de gastrosquise ainda são escassos, sendo relatados alguns marcadores inflamatórios, entre esses destacam-se: óxido nítrico (BEALER *et al.*, 1996; DILSIZ *et al.*, 1999), ferritina (CAĞLAR *et al.*, 2007) e interleucinas inflamatórias (GUIBOURDENCHE *et al.*, 2006; SBRAGIA *et al.*, 2010), como IL-6 e IL-8.

Os leucócitos polimorfonucleares (LPMN), principalmente os neutrófilos, que são dentre as células fagocíticas as mais abundantes na circulação, são também as primeiras células a serem ativadas na defesa pelo sistema imunológico inato contra infecções. Estas células devem migrar por quimiotaxia até o local da infecção, onde elas reconhecem, fagocitam e destroem microorganismos invasores pela liberação, no fagolisossomo, de enzimas hidrolíticas, proteolíticas e de espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidas por um complexo enzimático de membrana denominado NADPH oxidase (BABIOR, 1984). As ERO são essenciais para a destruição dos microrganismos fagocitados. No processo

bactericida os agentes etiológicos são englobados em vacúolos fagocíticos (fagossomos) e posteriormente os grânulos dos neutrófilos se fundem a essa estrutura dando origem ao fagolisossomo, os patógenos são então expostos a ataques das enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas, estocadas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos. Estes apresentam quatro tipos de grânulos, que contém diferentes enzimas e proteínas, destacando-se os grânulos azurófilos, os quais apresentam níveis elevados de mieloperoxidase (MPO).

A presença de inflamação nas alças intestinais, dos fetos das ratas com gastrosquise experimental, expostas à cavidade uterina foi confirmada com a avaliação da atividade da enzima MPO. A hipótese que as alterações inflamatórias intestinais nos casos de fetos com gastrosquise é limitada as alças expostas e em contato com o LA foi confirmada no presente estudo. A avaliação da atividade da MPO no estômago, não exposto a cavidade amniótica, de fetos controle, sham e com gastroquise não apresentou diferença significante. Dessa forma, o processo inflamatório foi limitado às alças intestinais, expostas a cavidade uterina.

Desde 1948, quando foi administrada a injeção de cortisol sintético para tratamento de artrite reumatoide, os corticosteroides são utilizados para tratamento de desordens inflamatórias. Os corticosteroides têm a capacidade de impedir ou suprimir a resposta inflamatória, independentemente do agente indutor ser de natureza radiante, mecânica, química, infecciosa ou imunológica. Apesar da administração de corticosteroides ser uma terapia paliativa, uma vez que a causa subjacente da doença persista, a supressão dos efeitos deletérios da inflamação é de grande valor. Suas ações imunossupressoras e anti-inflamatórias estão ligadas de forma indissolúvel, pois ambas resultam, principalmente, da inibição de funções específicas dos leucócitos, como a síntese e a ação das citocinas. Os corticosteroides inibem os fenômenos iniciais do processo inflamatório, como edema, deposição de fibrina, dilatação capilar, emigração de leucócitos e atividade fagocitária. Suprimem, também, as manifestações tardias, como proliferação de capilares e fibroblastos, deposição de colágeno e cicatrização (FLAMMER; ROGATSKY, 2011).

Liggins e Howie, em 1972, demonstraram que o uso antenatal de corticosteroide reduz significativamente a mortalidade por síndrome da dificuldade respiratória em recém-nascidos prematuros (LIGGINS; HOWIE, 1972). Em modelos animais, o uso materno de costicosteroides, no período gestacional, também tem demonstrado melhora na motilidade intestinal em recém-nascidos sem malformações abdominais (SASE *et al*. 2005). O controle

do processo inflamatório intestinal, para prevenção de complicações neonatais, através da administração de corticoide foi proposto por vários autores, em estudos animais e em humanos (GOU *et al.*, 1995; YU *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2004; BITTENCOURT *et al.*, 2006).

Apesar das alterações morfométricas terem sido semelhantes entre os grupos com gastrosquise experimental realizada com 18,5 e 19,5 dias, optou-se comparar o efeito do tratamento materno com dexametasona no grupo de 18,5 dias, baseado em publicação anterior que observou diferença na maturidade intestinal entre esses dois grupos (BITTENCOURT *et al.*, 2006).

A dose de corticosteroide foi 0,4mg/kg definida com base na literatura, na qual foram relatados resultados positivos na maturação intestinal e pulmonar, com doses de 0,2 a 0,5 mg/kg (BUCHMILLER *et al*., 1994; GUARINO *et al*., 2000). No presente estudo, optou-se pela administração intra-peritoneal materna de corticosteroide, durante três dias, do dia da realização do procedimento experimental até o parto, presumindo que haveria efeito favorável sobre o processo inflamatório intestinal fetal, bem como sobre sua maturação (SASE *et al*. 2005; BITTENCOURT *et al.*, 2006).

O uso de corticoide não é isento de efeitos colaterais, dentre eles o comprometimento do crescimento. Crianças que tomam corticoides por longos períodos e em doses altas apresentam, invariavelmente, comprometimento estatural. Isto é compreensível quando recordamos o efeito catabólico desses compostos, mas vários outros pontos de ação atuam prejudicando o crescimento. O prejuízo é maior em fases de crescimento acelerado, como dos 5 aos 7 anos e no estirão pubertário (KUPERMAN *et al*., 2001). O uso de corticosteroide durante uma gestação normal pode desencadear RCIU tanto em seres humanos como em tecidos de animais de laboratório (AGHAJAFARI *et al*., 2002). Os resultados encontrados não encontraram diferença na comparação da massa corpórea entre os fetos tratados ou não com dexametasona. Possivelmente, o tempo de tratamento materno com a dexametasona não foi suficiente para desencadear um quadro de RCIU.

O CI dos fetos das ratas tratadas com dexametasona (C-Sh-G) não apresentou nenhuma diferença. Porém, no grupo de ratas não tratadas, foi observada uma redução significante do CI nos fetos com G, quando comparados ao C e Sh. A comparação do CI dos fetos com gastrosquise tratados com os não tratados revelou uma melhora significante do CI, revelando um efeito da dexametasona na prevenção do encurtamento intestinal.

Avaliando os grupos tratados ou não com dexametasona, também não houve diferença da MI dos fetos com gastrosquise, quando comparados aos fetos C e Sh. Porém, a avaliação da relação massa intestinal por comprimento intestinal (MI/CI) demonstrou um maior ganho de massa por cada milímetro de comprimento intestinal nos fetos com gastrosquise não tratados com dexametasona, dado não observado no grupo tratado. Comparando somente os fetos com gastrosquise, tratados ou não, observou-se uma redução significativa na relação MI/CI no grupo tratado com dexametasona, comprovando o efeito da droga na redução do edema por cada milímetro de comprimento da alça intestinal, semelhante aos dados da literatura (BITTENCOURT *et al.*, 2006).

Os resultados encontrados pelo presente trabalho sugerem o efeito benéfico da corticoterapia materna nos casos de gastrosquise. Após a administração de dexametasona na dose de 0,4mg/kg durante três dias, entre o procedimento cirúrgico inicial e a coleta das amostras, houve uma diferença estatística entre os grupos, em relação ao comprimento das alças intestinais. Outros autores já haviam descrito benefícios da corticoterapia, intraperitoneal ou intramniótica, em fetos com gastrosquise, melhorando marcadores morfométrios e bioquímicos (GOU *et al.*, 1995; YU *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2004; BITTENCOURT *et al.*, 2006).

Além das alterações morfométricas localizadas nas alças intestinais expostas ao líquido amniótico, são descritas alterações funcionais, que promovem um quadro de dismotilidade, possivelmente, devido a alterações na maturidade das células de cajal, na formação do plexo mioentérico (MIDRIO, *et al.*, 2004; FRANÇA, *et al.*, 2008; VANNUCCHI, *et al.*, 2003; VANNUCCHI, *et al.*, 2004).

Os recentes estudos sobre a gastrosquise, além de procurar compreender a fisiopatologia da doença, buscam encontrar fatores de gravidade no período pré-natal. A possibilidade de detecção de marcadores relacionados à uma morbidade neonatal, apenas por imagem ultrassonográfica, não-invasivas e captadas no período gestacional, são as mais estudadas. Entre eles destacam-se: presença de restrição de crescimento intrauterino, dilatação de alças intestinais intra e extra-abdominais, espessura e alteração na ecogenicidade da alça intestinal (GERSHON; THOMPSON, 1973; GINTZLER.; ROTHMAN; GERSHON, 1980; GARZON; DUCROC; GELOSO, 1982; GREGERSEN *et al.*, 2006; SANTIAGO-MUNOZ *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2010).

A dilatação gástrica tem sido aventada também como um potencial marcador de gravidade pré-natal. Neste sentido, Aina-Mumuney *et al*. demonstraram que neonatos com gastrosquise com dilatação gástrica intraútero apresentaram maior período de internação, maior incidência de volvo e óbito neonatal, quando comparado com neonatos com gastrosquise sem dilatação (AINA-MUMUNEY *et al.*, 2004). Também, Santiago-Munoz *et al.* relataram que a presença de dilatação gástrica em ultrassonografia pré-natal correlacionou-se de forma estatisticamente significante com maior necessidade (60% quando a ecografia evidenciou dilatação gástrica comparado a 10% nos casos sem dilatação) de intervenções cirúrgicas para complicações intestinais neonatais (atresia, perfuração ou necrose) (SANTIAGO-MUNOZ *et al.*, 2007). Por outro lado, Alfaraj *et al.* descreveram que a dilatação gástrica em fetos com gastrosquise foi relacionada com a presença de líquido amniótico meconial no momento do parto (53% vs. 24%), mas não identificou associação significativa com qualquer outro parâmetro de gravidade perinatal ou cirúrgica (ALFARAJ *et al.*, 2011).

Mesmo entre os que acreditam que a dilatação gástrica seja um critério de morbidade, não há consenso sobre a sua real fisiopatologia. Está bem estabelecido que as alterações de motilidade e trânsito intestinal são achados frequentes em crianças com gastrosquise, mesmo após correção cirúrgica (TANNURI *et al.*, 2011). Essa dismotilidade, possivelmente, é resultante da exposição das alças intestinais ao mecônio presente no líquido amniótico durante a vida intrauterina (CORREIA-PINTO *et al.*, 2002; TIBBOEL *et al*., 1986a; LANGER *et al*., 1989; SHAW *et al*., 1994). Sobre a dilatação gástrica, alguns defendem que seria apenas um indicativo de obstrução mecânica intestinal como a encontrada no volvo intestinal associado à gastrosquise (AINA-MUMUNEY *et al.*, 2004). Por outro lado, outros acreditam que seja uma repercussão direta ou indireta do processo inflamatório intestinal sobre a motilidade gástrica. Oyachi *et al*. aventaram que uma resposta tecidual "íleo-gástrica" poderia ocorrer por alteração nos níveis de fatores de motilidade (polipeptídio gástrico inibidor e grelina), ou por vias neuroimunomodulatórias (OYACHI *et al*., 2004).

Estudando coelhos, Oyachi et al. encontraram uma redução na sensibilidade gástrica para betanecol (agonista colinérgico) (OYACHI *et al*., 2004). No entanto, eles não especificaram qual a porção do estômago que foi avaliada. Além disso, os autores sugeriram que a dismotilidade gastrointestinal seria resultante da inflamação do tecido muscular liso. No entanto, o processo inflamatório não foi avaliado por nenhum marcador. Para elucidar essa hipótese, o presente estudo descreveu a motilidade da musculatura lisa em fundo e antro

gástrico de fetos de ratos com gastrosquise e estabeleceu uma possível relação com a inflamação.

Existem poucos estudos na literatura que descrevam a atividade contrátil de tecidos em fetos de ratos, especialmente em segmentos de estômago. Foi adotado o modelo de gastrosquise experimental descrito por Correia-Pinto *et al*. (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001), que se assemelha a gastrosquise humana, permitindo avaliar e comparar fetos com gastrosquise, sham e controles da mesma ninhada. Embora extremamente reduzido de tamanho, os segmentos do fundo e antro gástrico de fetos de ratos reproduziram, sob condições experimentais, o registro de padrões fisiológicos compatíveis com atividade contrátil de músculo liso.

Os segmentos de músculo liso do fundo e do antro foram estudados devido a relevância nas funções gástricas, relacionadas a armazenamento, mistura e propulsão do alimento através do piloro para o duodeno, respectivamente (GREGERSEN *et al.*, 2006). Como esperado, os segmentos fúndicos apresentaram um padrão contrátil caracterizado por baixa frequência e baixa amplitude das contrações espontâneas. Esses segmentos, quando estimulados pelo Carbacol (CCh, agente muscarínico), responderam de forma dependente da concentração, produzindo contrações prolongadas. Os tecidos antrais responderam, ao estímulo muscarínico, com uma elevação tanto da amplitude e da frequência de suas contrações oscilatórios, mas sem manutenção evidente de um tônus sustentado acima dos níveis basais.

A capacidade de resposta para a secreção de ácido devido à interação com vários agonistas, incluindo CCh, já foi demonstrada em estômagos de ratos fetais por Garzon *et al*. (GARZON *et al*., 1982). Reforçando este fato, os resultados fornecem evidência de que o músculo liso gástrico fetal é igualmente sensível a estímulos contráteis induzidos por estimulação agonista dos receptores muscarínicos *in vitro*. Isto corrobora com resultados de que, embora realizados em outras espécies animais, como coelhos, a acetilcolina apresenta um papel fisiológico agonística sobre o músculo liso do intestino durante o período de gestação (GERSHON; THOMPSON, 1973; GINTZLER; ROTHMAN; GERSHON, 1980).

A caracterização *in vitro* da resposta contrátil induzida por CCh foi escolhida devido ao estímulo colinérgico constituir a unidade excitatória principal do sistema nervoso parassimpático no intestino (HARRINGTON *et al.*, 2010), sendo a motilidade gastrointestinal

influenciada, desde o início do desenvolvimento, pelos neurônios colinérgicos (TOMOMASA *et al.*, 1988). Tal aspecto foi inicialmente considerado, para encontrar possíveis mudanças no comportamento contrátil do tecido gástrico após o estabelecimento de gastrosquise, uma hipótese não confirmada atualmente na literatura.

Os resultados observados, usando o CCh como agonista colinérgico, foram claramente diferentes de Oyachi *et al.*, que observaram uma redução significativa na contratilidade gástrica induzida por betanecol em preparações de músculo liso gástrico (OYACHI *et al*., 2004). Considerando-se que Oyachi *et al*. utilizaram coelhos, é possível concluir que, pelo menos em ratos, a gastrosquise é incapaz de induzir alterações diretas da contratilidade muscular lisa do estômago. Além disso, a avaliação da resposta ao betanecol, no estudo de Oyachi *et al.*, foi limitada a apenas uma concentração da droga, sem considerar outras concentrações, não analisando uma relação de concentração-efeito completa para o estímulo muscarínico.

Diferentes razões podem explicar a ausência de alterações funcionais na resposta contrátil da musculatura lisa do estômago, supostamente esperadas devido à gastrosquise nesse modelo experimental. Durante os experimentos, a avaliação macroscópica confirmou a extrusão do intestino da cavidade abdominal de fetos de ratos, indicando a indução cirúrgica com sucesso de gastrosquise. Como esperado, a exposição do intestino não foi observada em fetos do grupo sham. Além disso, as alças intestinais de fetos com gastrosquise mostraram edema e inflamação evidente, que foi confirmada, bioquimicamente, através da medida da atividade da MPO em comparação com fetos sham e controle. Em contraste, as amostras de tecido gástrico, incluindo o grupo com gastrosquise, não revelaram qualquer aumento significativo da MPO. Isso sugere que os eventos inflamatórios são secundários à exposição das alças intestinais ao líquido amniótico.

Os achados confirmam dados de outros estudos que demonstraram a ativação de processos inflamatórios no sistema intestinal de fetos de ratos submetidos à gastrosquise experimental (SBRAGIA *et al*., 2010; GONÇALVES *et al*., 2011). Essa reação inflamatória parece estar envolvida na promoção de mudanças de atividade contrátil nos segmentos intestinais acometidos. As alterações na contratilidade incluem: uma redução da frequência e da amplitude das contrações espontâneas, mas um aumento da resposta à estimulação de campo eléctrico ou agonistas colinérgicos provavelmente devido ao aumento da participação dos receptores muscarínicos M3 (RÉGIS *et al*., 2011), em combinação com redução na

resposta do plexo mioentérico e das células de Cajal (LANGER; BRAMLETT, 1997; FRANÇA *et al*., 2008). De acordo com os nossos resultados, as mudanças nos receptores colinérgicos não parecem ocorrer nos tecidos gástricos de fetos de ratos com gastrosquise.

Diante dos resultados encontrados, a hipótese defendida por alguns pesquisadores, que o achado ultrassonográfico de dilatação gástrica pré-natal poderia está relacionado com maior morbidade neonatal em fetos com gastrosquise, poderia ser resultado de uma obstrução intestinal mecânica, mas não por efeitos diretos ou indiretos causados por inflamação. Uma obstrução intestinal mecânica persistente ou transitória, que ocorra durante o período intrauterino, secundário ou não a volvos (que não pode ser contemplada pelo modelo experimental utilizado), pode ser responsável pela dilatação gástrica (AINA-MUMUNEY *et al*., 2004). Portanto, esse achado ecográfico deve servir como um alerta (em situações clínicas reais) para os profissionais de cuidados neonatais, devido à suposta isquemia significativa eventual intestinal, com graves repercussões sistêmicas.

Assim, o modelo experimental de gastrosquise em rato não induz a inflamação mediada por neutrófilos em tecidos gástricos, preservando uma resposta contrátil do tecido muscular liso do estômago, após a administração exógena de CCh, pelo menos *in vitro*. Além disso, para validar esses resultados, futuros estudos podem ser realizados aplicando este modelo experimental em outras espécies superiores, que têm períodos mais longos de gestação, bem como modificando o modelo experimental, promovendo obstrução intestinal adicional, por exemplo volvo.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Em modelo experimental de gastrosquise em ratas, realizado com 18,5 e 19,5 dias de gestação, o tempo de exposição das alças intestinais ao líquido amniótico não interferiu nas alterações morfométricas.

2. Em modelo experimental de gastrosquise em ratas, realizado com 18,5 dias de gestação, o tratamento materno com dexametasona, durante a gestação, reduziu o dano intestinal, segundo os parâmetros morfométricos.

3. Em modelo experimental de gastrosquise em ratas, realizado com 18,5 dias de gestação, os fetos com gastrosquise apresentam intenso processo inflamatório intestinal, mas não apresentam processo inflamatório nos estômagos. Esse fato se deve, possivelmente, a exposição das alças intestinais a cavidade amniótica, o que não ocorreu com os estômagos.

4. Em modelo experimental de gastrosquise em ratas, realizado com 18,5 dias de gestação, os fetos com gastrosquise não apresentam alterações na contratilidade gástrica, quando estimulados com agonista colinérgico (carbacol). Portanto, a gastrosquise parece não interferir no mecanismo colinérgico de estimulação da contratilidade gástrica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 2nd edition. Ed. Saunders, 2004.

ABDULLAH, F.; ARNOLD, M. A.; NABAWEESI, R.; FISCHER, A. C.; COLOMBANI, P. M.; ANDERSON, K. D.; LAU, H.; CHANG, D. C. Gastroschisis in the United States 1988-2003: analysis and risk categorization of 4344 patients. Journal of perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association, v. 27, n. 1, p. 50-5, Jan. 2007.

AGHAJAFARI, F.; MURPHY, K.; MATTHEWS, S.; OHLSSON, A.; AMANKWAH, K.; HANNAH, M. Repeated doses of antenatal corticosteroids in animals: a systematic review. American journal of obstetrics and gynecology, v. 186, n. 4, p. 843-9, Apr. 2002.

AINA-MUMUNEY, A. J.; FISCHER, A. C.; BLAKEMORE, K. J.; CRINO, J. P; COSTIGAN, K.; SWENSON, K.; CHISHOLM, C. A. A dilated fetal stomach predicts a complicated postnatal course in cases of prenatally diagnosed gastroschisis. American journal of obstetrics and gynecology, v. 190, n. 5, p. 1326-30, May. 2004.

AKTUG, T.; ERDAG, G.; KARGI, A.; AKGUR, F. M.; TIBBOEL, D. Amnio-allantoic fluid exchange for the prevention of intestinal damage in gastroschisis: an experimental study on chick embryos. Journal of pediatric surgery, v. 30, n. 3, p. 384–387, Mar. 1995.

ALBERT, A.; SANCHO, M. A.; JULIÁ, V.; DÍAZ, F.; BOMBÍ, J. A.; MORALES, L. Intestinal damage in gastroschisis is independent of the size of the abdominal defect. Pediatric surgery international, v. 17, n. 2-3, p. 116-9, Mar. 2001.

ALFARAJ, M. A.; RYAN, G.; LANGER, J. C.; WINDRIM, R.; SEAWARD, P. G.; KINGDOM, J. Does gastric dilation predict adverse perinatal or surgical outcome in fetuses with gastroschisis? Ultrasound in obstetrics and gynecology : The official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, v. 37, n. 2, p. 202-6, Feb. 2011.

ALTAF, M. A; SOOD, M. R. The nervous system and gastrointestinal function. Developmental disabilities research reviews, v. 14, n. 2, p. 87-95, Jan. 2008.

ANTEBY, E. Y.; STERNHELL, K.; DICKE, J. M. The fetus with gastroschisis managed by a trial of labor: antepartum and intrapartum complications. Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association, v. 19, n. 7, p. 521-4, Oct-Nov. 1999.

ANTEBY, E. Y.; YAGEL, S. Route of delivery of fetuses with structural anomalies. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology, v. 106, n. 1, p. 5-9, Jan. 2003.

ARNOLD, M. A.; CHANG, D. C.; NABAWEESI, R.; COLOMBANI, P. M.; BATHURST, M. A.; MON, K. S.; HOSMANE, S.; ABDULLAH, F. Risk stratification of 4344 patients with gastroschisis into simple and complex categories. Journal of pediatric surgery, v. 42, n. 9, p. 1520-5, Set. 2007.

BABIOR, B. M. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. Blood, v. 64, n. 5, p. 959-66, Nov. 1984.

BADILLO, A. T.; HEDRICK, H. L.; WILSON, R. D.; DANZER, E.; BEBBINGTON, M. W.; JOHNSON, M. P.; LIECHTY, K. W.; FLAKE, A. W.; ADZICK, N. S. Prenatal ultrasonographic gastrointestinal abnormalities in fetuses with gastroschisis do not correlate with postnatal outcomes. Journal of pediatric surgery, v. 43, n. 4, p. 647-53, Apr. 2008.

BAHLMANN, F.; MERZ, E.; WEBER, G.; MACCHIELLA, D. Prenatal diagnosis and management of gastroschisis and omphalocele. Pediatric surgery international, v. 11, n 2-3, p. 67-71, Feb. 1996.

BARSEGHYAN, K.; AGHAJANIAN, P.; MILLER, D. A. The prevalence of preterm births in pregnancies complicated with fetal gastroschisis. Archives of gynecology and obstetrics, v. 286, n. 4, p. 889-92, Oct. 2012.

BEALER, J. F.; GRAF, J.; BRUCH, S. W.; ADZICK, N. S.; HARRISON, M. R. Gastroschisis increases small bowel nitric oxide synthase activity. Journal of pediatric surgery, v. 31, n. 8, p. 1043–1045, Aug. 1996.

BENJAMIN, B. G.; ETHEN, M. K.; VAN HOOK, C. L.; MYERS, C. A.; CANFIELD, M. A. Gastroschisis prevalence in Texas 1999-2003. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, v. 88, n. 3, p. 178-85, Mar. 2010.

BETHEL, C.; SEASHORE, J.; TOULOUKIAN, R. Cesarian section does not improve outcome in gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 24, n. 1, p. 1-4, Jan. 1989.

BITTENCOURT, D. G.; BARRETO, M. W.; FRANÇA, W. M.; GONÇALVES, A.; PEREIRA, L. A.; SBRAGIA, L. Impact of corticosteroid on intestinal injury in a gastroschisis rat model: morphometric analysis. Journal of pediatric surgery, v. 41, n. 3, p. 547-53, Mar. 2006.

BLAKELOCK, R. T.; HARDING, J. E.; KOLBE, A.; PEASE, P. W. Gastroschisis: can the morbidity be avoided? Pediatric surgery international,v. 12, n. 4, p. 276-82, Apr. 1997.

BOND, S. J.; HARRISON, M. R.; FILLY, R. A.; CALLEN, P. W.; ANDERSON, R. A.; GOLBUS, M. S. Severity of intestinal damage in gastroschisis: correlation with prenatal sonographic findings. Journal of pediatric surgery, v. 23, n. 6, p. 520-5, Jun. 1988.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. Blood, v. 60, n. 3, p. 618-622, Sep. 1982.

BRUGGER, P. C.; PRAYER, D. Development of gastroschisis as seen by magnetic resonance imaging. Ultrasound in obstetrics and gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, v. 37, n. 4, p. 463-70, Apr. 2011.

BUCHMILLER, T. L; SHAW, K.; LAM, M. L.; STOKES, R.; DIAMOND, J. S.; FONKALSRUD, E. W. Effect of prenatal dexamethasone administration: fetal rabbit intestinal nutrient uptake and disaccharidase development. The Journal of surgical research, v. 57, n. 2, p. 274-9, Aug. 1994.

BURC, L.; VOLUMENIE, J. L.; DE LAGAUSIE, P.; GUIBOURDENCHE, J.; OURY, J. F.; VUILLARD, E.; SIBONY, O.; BLOT, P.; SAIZOU, C.; LUTON, D.. Amniotic fluid inflammatory proteins and digestive compounds profile in fetuses with gastroschisis undergoing amnioexchange. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology, v. 111, n. 4, p. 292-7, Apr. 2004.

CAĞLAR, M.; HAKGÜDER, G.; ATEŞ. O.; OLGUNER, M.; COKER, C.; OZER, E.; AKGÜR, F. M. Amniotic fluid ferritin as a marker of intestinal damage in gastroschisis: a time course experimental study. Journal of pediatric surgery, v. 42, n. 10, p. 1710-5, Oct. 2007.

CANFIELD, M. A.; HONEIN, M. A.; YUSKIV, N.; XING, J.; MAI, C. T.; COLLINS, J. S.; DEVINE, O.; PETRINI, J.; RAMADHANI, T. A.; HOBBS, C. A.; KIRBY, R. S. National estimates and race/ethnic-specific variation of selected birth defects in the United States, 1999-2001. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, v. 76, n. 11, p. 747-56, Nov. 2006.

CASTILLA, E. E.; MASTROIACOVO, P.; ORIOLI, I. M. Gastroschisis: international epidemiology and public health perspectives. American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics, v. 148C, n. 3, p. 162-79, Aug. 2008.

CEREKJA, A.; PIAZZE, J.; COZZI, D. Early prenatal sonographic diagnosis of gastroschisis. Journal of clinical ultrasound: JCU, v. 40, n. 8, p. 526-8, Oct. 2012.

CHABRA, S. Gastroschisis: brief early history. Journal of perinatal medicine, v. 35, n. 5, p. 455, Jan. 2007.

CHRISTISON-LAGAY, E. R.; KELLEHER, C. M.; LANGER, J. C. Neonatal abdominal wall defects. Seminars in fetal and neonatal medicine, v. 16, n. 3, p. 164-72, Jun. 2011.

CORREIA-PINTO, J.; TAVARES, M. L.; BAPTISTA, M. J.; ESTEVÃO-COSTA, J.; FLAKE, A. W.; LEITE-MOREIRA, A. F. A new fetal rat model of gastroschisis: development and early characterization. Journal of pediatric surgery, v. 36, n. 1, p. 213-6, Jan. 2001.

CORREIA-PINTO, J.; TAVARES, M. L.; BAPTISTA, M. J.; HENRIQUES-COELHO, T.; ESTEVÃO-COSTA, J.; FLAKE, A. W.; LEITE-MOREIRA, A. F. Meconium dependence of bowel damage in gastroschisis. Journal of Pediatric Surgery, v. 37, n. 1, p. 31-35, Jan. 2002.

COUGHLIN, J. P.; DRUCKER, D. E.; JEWELL, M. R.; EVANS, M. J.; KLEIN, M. D. Delivery room repair of gastroschisis. Surgery, v. 114, n. 4, p. 822-6, Oct. 1993.

DAVIS, R. P.; TREADWELL, M. C.; DRONGOWSKI, R. A.; TEITELBAUM, D. H.; MYCHALISKA, G. B. Risk stratification in gastroschisis: can prenatal evaluation or early postnatal factors predict outcome? Pediatric surgery international, v. 25, n. 4, p. 319-25, Apr. 2009.

De LAGAUSIE, P.; GUIBOURDENCHE, J.; de BUIS, A.; PEUCHMAUR, M.; OURY, J. F.; AIGRAIN, Y.; SIBONY, O.; LUTON, D. Esophageal ligature in experimental gastroschisis. Journal pediatric surgery, v. 37, n. 8, p. 1160–1164, Aug. 2002.

DeVRIES, P. A. The pathogenesis of gastroschisis and omphalocele. Journal of pediatric surgery, v. 15, n. 3, p. 245–51, Jun. 1980.

DILSIZ, A.; GÜNDOGAN, A. H.; AKTAN, M.; DUMAN, S.; AKTUG, T. Nitric oxide synthase inhibition prevents intestinal damage in gastroschisis: a morphological evaluation in chick embryos. Journal of pediatric surgery, v. 34, n. 8, p. 1248-52, Aug. 1999.

DRIVER, C. P.; BRUCE, J.; BIANCHI, A.; DOIG, C. M.; DICKSON, A. P.; BOWEN, J. The contemporary outcome of gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 35, n. 12, p. 1719-23, Dec. 2000.

DUHAMEL, B. Embryology of the exomphalos and allied malformations. Archives of disease in childhood, v.38, n. 198, p. 142-7, Apr. 1963.

ERGÜN, O.; BARKSDALE, E.; ERGÜN, F. S.; PROSEN, T.; QURESHI, F. G.; REBLOCK, K. R.; FORD, H.; HACKAM, D. J. The timing of delivery of infants with gastroschisis influences outcome. Journal of pediatric surgery, v. 40, n. 2, p. 424-8, Feb. 2005.

FASCHING, G.; MAYR, J.; SAUER, J. The effect of the mode of delivery on outcome in fetuses with gastroschisis. Pediatric surgery international, v. 11, n. 2-3, p. 100-2, Feb. 1996.

FELDKAMP, M. L.; CAREY, J. C.; SADLER, T. W. Development of gastroschisis: Review of hypotheses, a novel hypothesis, and implications for research. American journal of medical genetics. Part A, v. 143A, n. 7, p. 639–52, Apr. 2007.

FITZSIMMONS, J.; NYBERG, D. A.; CYR, D. R.; HATCH, E. Perinatal management of gastroschisis. Obstetrics and gynecology, v. 71, n. 6, p. 910-3, Jun. 1988.

FLAMMER, J. R.; ROGATSKY, I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets andmechanisms. Molecular endocrinology, v.25, n. 7, p.1075-86, Jul. 2011.

FRANÇA, W. M.; LANGONE, F.; DE LA HOZ, C. L.; GONÇALVES, A.; BITTENCOURT, D.; PEREIRA, L. V.; SBRAGIA, L. Maturity of the myenteric plexus is decreased in the gastroschisis rat model. Fetal diagnosis and therapy, v. 23, n. 1, p. 60-8, Jan. 2008.

FRIES, M. H.; FILLY, R. A.; CALLEN, P. W.; GOLDSTEIN, R. B.; GOLDBERG, J. D.; GOLBUS, M. S. Growth retardation in prenatally diagnosed cases of gastroschisis. Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine, v. 12, n. 10, p. 583-8, Oct. 1993.

GARCIA, L; BRIZOT, M.; LIAO, A,; SILVA, M. M.; TANNURI, A. C.; ZUGAIB, M. Bowel dilation as a predictor of adverse outcome in isolated fetal gastroschisis. Prenatal diagnosis, v.30, n. 10, p. 964-9, Oct. 2010.

GARZON, B.; DUCROC, R.; GELOSO, J. P.: Ontogenesis of gastric response to agonists and antagonists of acid secretion in fetal rat. Journal of developmental physiology, v. 4, n. 3, p. 195-205, Jun. 1982.

GERSHON, M. D.; THOMPSON, E. B. The maturation of neuromuscular function in a multiply innervated structure: development of the longitudinal smooth muscle of the foetal mammalian gut and its cholinergic excitatory, adrenergic inhibitory, and non-adrenergic inhibitory innervation. The Journal of physiology, v. 234, n. 2, p. 257-277, Oct. 1973.

GHIONZOLI, M.; JAMES, C. P.; DAVID, A. L.; SHAH, D.; TAN, A. W.; ISKAROS, J.; DRAKE, D. P.; CURRY, J. I.; KIELY, E. M.; CROSS, K.; EATON, S.; DE COPPI, P.; PIERRO, A. Gastroschisis with intestinal atresia predictive value of antenatal diagnosis and outcome of postnatal treatment. Journal pediatric surgery,v. 47, n. 2, p. 322-8, Feb. 2012.

GINTZLER, A. R.; ROTHMAN, T. P.; GERSHON, M. D. Ontogeny of opiate mechanisms in relation to the sequential development of neurons known to be components of the guinea pig's enteric nervous system. Brain research, v. 189, n. 1, p. 31-48, May. 1980.

GOLDSTEIN, I.; REECE, E. A,; YARKONI, S.; WAN, M.; GREEN, J. L.; HOBBINS, J. C. Growth of the fetal stomach in normal pregnancies. Obstetrics and gynecology, v. 70, n. 4, p. 641-4, Oct. 1987.

GOMEZ, R.; ROMERO, R.; GHEZZI, F.; YOON, B. H.; MAZOR, M.; BERRY, S. M. The fetal inflammatory response syndrome. American journal of obstetrics and gynecology, v. 179, n. 1, p. 194-202, Jul. 1998.

GONÇALVES, F. L.; DA SILVA, R.; SCHMIDT, A. F.; DE OLIVEIRA, M. G.; SBRAGIA, L. Hydrogel protection: a novel approach to reduce bowel inflammation in experimental gastroschisis. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology, v. 148, n. 1, p. 35-9, Jan. 2010.

GONÇALVES, F. L.; DE SOUZA, G. F.; SCHMIDT, A. F.; REGIS, A. C.; DE OLIVEIRA, M. G.; SBRAGIA, L. Evaluation of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthases (NOS) in the amniotic fluid in an experimental gastroschisis rat model. European journal of pediatric surgery: official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery, v. 21, n. 6, p. 362-5, Dec. 2011.

GUO, W.; SWANIKER, F.; FONKALSRUD, E. W.; VO, K.; KARAMANOUKIAN, R. Effect of intraamniotic dexamethasone administration on intestinal absorption in a rabbit gastroschisis model. Journal of pediatric surgery, v. 30, n. 7, p. 983-6, Jul. 1995.

GREGERSEN, H.; HAUSKEN, T.; YANG, J.; ØDEGAARD, S.; GILJA, O. H. Mechanosensory properties in the human gastric antrum evaluated using B-mode ultrasonography during volume-controlled antral distension. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology, v. 290, n. 5, p. G876-882, May. 2006.

GUARINO, N.; OUE, T.; SHIMA, H.; PURI, P. Antenatal dexamethasone enhances surfactant protein synthesis in the hypoplastic lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. Journal of pediatric surgery, v. 35, n. 10, p.1468-73, Oct. 2000.

GUIBOURDENCHE, J.; BERREBI, D.; VUILLARD, E.; DE LAGAUSIE, P.; AIGRAIN, Y.; OURY, J. F.; LUTON, D. Biochemical investigations of bowel inflammation in gastroschisis. Pediatric research, v. 60, n. 5, p. 565-8, Nov. 2006.

HALLER, J. A.; KEHRER, B. H.; SHAKER, I. J.; SHERMETA, D. W.; WYLLIE, R. G. Studies of the pathophysiology of gastroschisis in fetal sheep. Journal of pediatric surgery, v. 9, n. 5, p. 627–632, Oct. 1974.

HARRINGTON, A. M.; PECK, C. J.; LIU, L.; BURCHER, E.; HUTSON, J. M.; SOUTHWELL, B. R. Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon. Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society, v. 22, n. 9, p. 999-1008,e262-3, Sep. 2010.

HENRICH, K.; HUEMMER, H. P.; REINGRUBER, B.; WEBER, P. G. Gastroschisis and omphalocele: treatments and long-term outcomes. Pediatric surgery international, v. 24, n. 2, p. 167-73, Feb. 2008.

HOLLAND, A. J.; WALKER, K.; BADAWI, N. Gastroschisis: an update. Pediatric surgery international, v. 26, n. 9, p. 871-8, Sep. 2010.

HOYME, H. E.; HIGGINBOTTOM, M. C.; JONES, K. L. The vascular pathogenesis of gastroschisis: Intrauterine interruption of the omphalomesenteric artery. The journal of pediatrics, v. 98, n. 2, p. 228–31, Feb. 1981.

HUH, N. G.; HIROSE, S.; GOLDSTEIN, R. B. Prenatal intraabdominal bowel dilation is associated with postnatal gastrointestinal complications in fetuses with gastroschisis. American journal of obstetrics and gynecology, v. 202, n. 4, p. 396.e1-6, Apr. 2010.

HUNTER, A. G.; STEVENSON, R. E. Gastroschisis: clinical presentation and associations. American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics, v. 148C, n. 3, p. 219-30, Aug. 2008.

JAGER, L. C.; HEIJ, H. A. Factors determining outcome in gastroschisis: clinical experience over 18 years. Pediatric surgery international, v. 23, n. 8, p. 731-6, Aug. 2007.

KASSA, A. M.; LILJA, H. E. Predictors of postnatal outcome in neonates with gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 46, n. 11, p. 2108-14, Nov. 2011.

KEYS, C.; DREWETT, M.; BURGE, D. M. Gastroschisis: the cost of an epidemic. Journal of pediatric surgery, v. 43, n. 4, p. 654-7, Apr. 2008.

KIRK, E. P.; WAH, R. M. Obstetric management of the fetus with omphalocele or gastroschisis: A review and report of one hundred twelve cases. American journal of obstetrics and gynecology, v. 146, n. 5, p. 512-16, Jul. 1983.

KITCHANAN, S.; PATOLE, S. K.; MULLER, R. WHITEHALL, J. S. Neonatal outcome of gastroschisis and exomphalos: A 10-year review. Journal of paediatrics and child health, v. 36, n. 5, p. 428-30, Oct. 2000.

KLUCK, P.; TIBBOEL, D.; van der KAMP, A. W.; MOLENAAR, J. C. The effect of fetal urine on the development of the bowel in gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 18, n. 1, p. 47-50, Feb. 1983.

KULEVA, M., KHEN-DUNLOP, N., DUMEZ, Y., VILLE, Y. AND SALOMON, L. Is complex gastroschisis predictable by prenatal ultrasound? BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology, v. 119, n. 1, p. 102-9, Jan. 2012.

KUNZ, L. H.; GILBERT, W. M.; TOWNER, D. R. Increased incidence of cardiac anomalies in pregnancies complicated by gastroschisis. American journal of obstetrics and gynecology, v. 193, n. 3 Pt 2, p. 1248-52, Sep. 2005.

KUPERMAN, H.; DAMIANI, D.; CHROUSOS, G. P.; DICHTCHEKENIAN, V.; MANNA, T. D.; FILHO, V. O.; SETIAN, N. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in children with leukemia before and after 6 weeks of high-dose glucocorticoid therapy. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, v. 86, n. 7, p. 2993-6, Jul. 2001.

LANGER, J. C.; BELL, J. G.; CASTILLO, R. O.; CROMBLEHOLME, T. M.; LONGAKER, M. T.; DUNCAN, W.; BRADLEY, S. M.; FINKBEINER, W. E.; VERRIER, E. D.; HARRISON, M. R. Etiology of intestinal damage in gastroschisis, II. Timing and reversibility of histological changes, mucosal function, and contractility. Journal of pediatric surgery, v. 25, n. 11, p. 1122-6, Nov. 1990.

LANGER, J. C.; BRAMLETT, G. Effect of prokinetic agents on ileal contractility in a rabbit model of gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 32, n. 4, p. 605-8, Apr. 1997.

LANGER, J. C.; KHANNA, J.; CACO, C.; DYKES, E. H.; NICOLAIDES, K. H. Prenatal diagnosis of gastroschisis: development of objective sonographic criteria for predicting outcome. Obstetrics and gynecology, v.81, n. 1, p. 53-6, Jan. 1993.

LANGER, J. C.; LONGAKER, M. T.; CROMBLEHOLME, T. M.; BOND, S. J.; FINKBEINER, W. E.; RUDOLPH, C. A.; VERRIER, E. D.; HARRISON, M. R. Etiology of intestinal damage in gastroschisis. I: Effects of amniotic fluid exposure and bowel constriction in a fetal lamb model. Journal of pediatric surgery, v. 24, n. 10, p. 992-7, Oct. 1989.

LAO, O. B.; LARISON, C.; GARRISON, M. M.; WALDHAUSEN, J. H.; GOLDIN, A. B. Outcomes in neonates with gastroschisis in U.S. children's hospitals. American journal of perinatology, v. 27, n. 1, p. 97-101, Jan. 2010.

LAUSMAN, A. Y.; LANGER, J. C.; TAI, M.; SEAWARD, P. G.; WINDRIM, R. C.; KELLY, E. N.; RYAN, G. Gastroschisis: what is the average gestational age of spontaneous delivery? Journal of pediatric surgery, v. 42, n.11, p. 1816-21, Nov. 2007.

LAWSON, A.; DE LA HUNT, M. N. Gastroschisis and undescended testis. Jounal of pediatric surgery, v. 36, n. 2, p. 366-7, Feb. 2001

LEDBETTER, D. J. Congenital abdominal wall defects and reconstruction in pediatric surgery: gastroschisis and omphalocele. The Surgical clinics of North America, v. 92, n. 3, p. 713-27, Jun. 2012.

LEDBETTER, D. J. Gastroschisis and omphalocele. The Surgical clinics of North America, v. 86, n. 2, p. 249-60, vii, Apr. 2006.

LEWIS, D. F.; TOWERS, C. V.; GARITE, T. J.; JACKSON, D. N.; NAGEOTTE, M. P.; MAJOR,C. A. Fetal gastroschisis and omphalocele: Is the caesarean section the best mode of delivery? American journal of obstetrics and gynecology, v. 163, n. 3, p. 773-5, Sep. 1990.

LIGGINS, G. C.; HOWIE, R. N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. Pediatrics, v. 50, n. 4, p. 515-25, Oct. 1972.

LOANE, M.; DOLK, H.; BRADBURY, I. Increasing prevalence of gastroschisis in Europe 1980-2002: a phenomenon restricted to younger mothers? Paediatric and perinatal epidemiology, v. 21, n. 4, p. 363-9, Jul. 2007.

LOANE, M.; DOLK, H.; KELLY, A.; TELJEUR, C.; GREENLEES, R.; DENSEM, J.; EUROCAT WORKING GROUP. Paper 4: EUROCAT statistical monitoring: identification and investigation of ten year trends of congenital anomalies in Europe. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, v. 91, Suppl 1, p S31-43, Mar. 2011.

MEARS, A. L.; SADIQ, J. M.; IMPEY, L.; LAKHOO, K. Antenatal bowel dilatation in gastroschisis: a bad sign? Pediatric surgery international, v. 26, n. 6, p. 581-8, Jun. 2010.

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. Histochemistry and cell biology, v. 131, n. 1, p. 43-53, Jan. 2009.

MIDRIO, P.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S.; VANNUCCHI, M. G.; FLAKE, A. W. Gastroschisis in the rat model is associated with a delayed maturation of intestinal pacemaker cells and smooth muscle cells. Journal of pediatric surgery, v. 39, n. 10, p. 1541-7, Oct. 2004.

MITIKO, N.; OLIVEIRA, R. Mecanismos intracelulares dos mediadores inibitórios não adrenérgicos e não colinérgicos no trato gastrointestinal. Revista Brasileira de Biociências, v. 6, n. 4, p. 315-20, Out.-dez. 2008.

MOIR, C. R.; RAMSEY, P. S.; OGBURN, P. L.; JOHNSON, R. V.; RAMIN, K. D. A prospective trial of elective preterm delivery for fetal gastroschisis. American journal of perinatology, v. 21, n. 5, p. 289-94, Jul. 2004.

MOORE, T. C.; COLLINS, D. L.; CATANZARITE, V.; HATCH, J. R. Pre-term and particularly pre-labor cesarean section to avoid complications of gastroschisis. Pediatric surgery international, v. 15, n. 2, p. 97-104, Mar. 1999.

MORETTI, M.; KHOURY, A.; RODRIGUEZ, J.; LOBE, T.; SHAVER, D.; SIBAI, B. The effect of mode of delivery on the perinatal outcome in fetuses with abdominal wall defects. Am J Obstet Gynecol, v. 163, n. 3, p. 833-8, Sep. 1990.

MORTELL, A; MONTEDONICO, S.; PURI, P. Animal models in pediatric surgery. Pediatric surgery international, v. 22, n. 2, p. 111-28, Feb. 2006.

MORTELLARO, V. E.; ST PETER, S. D.; FIKE, F. B.; ISLAM, S. Review of the evidence on the closure of abdominal wall defects. Pediatric surgery international, v. 27, n. 4, p. 391-7, Apr. 2011.

NAZER H, J.; CIFUENTES O, L. Congenital malformations in Latin America in the period 1995-2008. Revista médica de Chile, v. 139, n. 1, p. 72-8, Jan. 2011.

NICHOL, P. F.; BYRNE, J. L.; DODGION, C.; SAIJOH, Y. Clinical considerations in gastroschisis: incremental advances against a congenital anomaly with severe secondary effects. American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics, v. 148C, n. 3, p. 231-40, Aug. 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. CID-10: classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde. v.1. 8.ed. 10.rev. São Paulo: Edusp, 2000. 1191 p.

OYACHI, N.; LAKSHMANAN, J.; ROSS, M. G.; ATKINSON, J. B. Fetal gastrointestinal motility in a rabbit model of gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 39, n. 3, p. 366-370, Mar. 2004.

PALOMAKI, G. E.; HILL, L. E.; KNIGHT, G. J.; HADDOW, J. E.; CARPENTER, M. Second-trimester maternal serum alpha-fetoprotein levels in pregnancies associated with gastroschisis and omphalocele. Obstetrics and gynecology, v. 71, n. 6, p. 906-9, Jun. 1988.

PARKER, S. E.; MAI, C. T.; CANFIELD, M. A.; RICKARD, R.; WANG, Y.; MEYER, R. E.; ANDERSON, P.; MASON, C. A.; COLLINS, J. S.; KIRBY, R. S.; CORREA, A.; NATIONAL BIRTH DEFECTS PREVENTION NETWORK. Updated National Birth Prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006. Birth defects research. Part A, Clinical and Molecular Teratology, v. 88, n. 12, p. 1008-16, Dec. 2010.

PATRONI, L.; BRIZOT, M. L.; MUSTAFA, S. A.; CARVALHO, M. H. B.; SILVA, M. M.; MIYADAHIRA, S.; ZUGAIB, M. Gastrosquise: Avaliação Pré-Natal dos Fatores Prognósticos para Sobrevida Pós-Natal. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v. 22, n. 7, p. 421-8, Jul. 2000.

PAYNE, N. R.; SIMONTON, S. C.; OLSEN, S.; ARNESEN, M. A.; PFLEGHAAR, K. M. Growth restriction in gastroschisis: quantification of its severity and exploration of a placental cause. BMC Pediatrics, v. 11, p. 90, Jan. 2011.

PHILLIPS J. D.; KELLY, R. E. JR.; FONKALSRUD, E. W.; MIRZAYAN, A.; KIM, C. S. An improved model of experimental gastroschisis in fetal rabbits. Journal of pediatric surgery, v. 26, n. 7, p. 784-7, Jul. 1991.

PHILLIPS, J. D.; RAVAL, M. V.; REDDEN, C.; WEINER, T. M. Gastroschisis, atresia, dysmotility: surgical treatment strategies for a distinct clinical entity. Journal of Pediatric Surgery, v. 43, n. 12, p. 2208-12, Dec. 2008.

PULIGANDLA, P. S.; JANVIER, A.; FLAGEOLE, H.; BOUCHARD, S.; MOK, E.; LABERGE, J. M. The significance of intrauterine growth restriction is different from prematurity for the outcome of infants with gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 39, n. 8, p. 1200-4, Aug. 2004.

PUTNAN, T. C.; EMMENS, R. Pediatric abdominal wall defects. In: SCWHARTZ, S. I. E. H. Ed. Maingot's Abdominal Operations. Norwalk, Conecticut: Appleton & Lange, 1990:297-313.

QUIRK, J. G. J.; FORTNEY, J.; COLLINS, H. B.; WEST, J.; HASSAD, S. J.; WAGNER, C. Outcome of newborns with gastroschisis: The effect of mode of delivery, site of delivery, and interval from birth to surgery. American journal of obstetrics and gynecology, v. 174, n. 4, p. 1134-8, Apr. 1996.

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. Journal of cellular and molecular medicine, v. 14, n. 5, p. 1125-34, May. 2010.

RASMUSSEN, S. A; FRÍAS, J. L. Non-genetic risk factors for gastroschisis. American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics, v. 148C, n. 3, p. 199-212, Aug. 2008.

RAYNOR, B. D.; RICHARDS, D. Growth retardation in fetuses with gastroschisis. Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine, v. 16, n. 1, p. 13-6, Jan. 1997.

REED, D. R.; DUKE, F. F.; ELLIS, H. K.; ROSAZZA, M. R.; LAWLER, M. P.; ALARCON, L. K.; TORDOFF, M. G. Body fat distribution and organ weights of 14 common strains and a 22-strain consomic panel of rats. Physiology and behavior, v. 103, n. 5, p. 523-9, Jul. 2011.

RÉGIS, A. C.; ROJAS-MOSCOSO, J. A.; GONÇALVES, F. L.; SCHMIDT, A. F.; MÓNICA, F. Z.; ANTUNES, E.; SBRAGIA, L. The cholinergic response is increased in isolated ileum from gastroschisis rat model. Pediatric surgery international, v.27, n. 9, p. 1015-9, Sep. 2011.

SAKALA, E. P.; ERHARD, L. N.; WHITE, J. J. Elective caesarean section improves outcomes of neonates with gastroschisis. American journal of obstetrics and gynecology, v. 169, n. 4, p.1050-3, Oct. 1993.

SALLER, D. N. JR.; CANICK, J. A.; PALOMAKI, G. E.; KNIGHT, G. J.; HADDOW, J. E. Second-trimester maternal serum alpha-fetoprotein, unconjugated estriol, and hCG levels in

pregnancies with ventral wall defects.. Obstetrics and gynecology, v. 84, n. 5, p. 852-5, Nov. 1994.

SANTIAGO-MUNOZ, P. C.; MCINTIRE, D. D.; BARBER, R. G.; MEGISON, S. M.; TWICKLER, D. M.; DASHE, J. S. Outcomes of pregnancies with fetal gastroschisis. Obstetrics and gynecology, v. 110, n. 3, p. 663-8, Sep. 2007.

SASE M.; LEE, J. J.; ROSS, M. G.; BUCHMILLER, T. L. Maternal steroid enhancement of fetal rabbit gastrointestinal motility. The journal of obstetrics and gynaecology research, v. 31, n. 3, p. 263-7, Jun. 2005.

SBRAGIA, L.; MELO FILHO, A. A.; BARINI, R.; HUGUET, P. R.; MARBA, S.; SILVA, J. M. B. Importância do Diagnóstico Pré-Natal de Gastrosquise. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v. 21, n. 8, p. 475-479, Ago. 1999.

SBRAGIA, L.; SCHMIDT, A. F.; MORAES, S.; BITTENCOURT, D. G.; GONÇALVES, F. L. L.; PEREIRA, L. A. V. D.; VELLOSO, L. A. Inflammatory response in a rat model of gastroschisis is associated with an increase of NF-kappaB. Brazilian journal of medical and biological research, v. 43, n. 2, p. 160-5, Feb. 2010.

SCHWARZ, N. T.; KALFF, J. C.; TÜRLER, A.; SPEIDEL, N.; GRANDIS, J. R.; BILLIAR, T. R.; BAUER, A. J. Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. Gastroenterology, v. 126, n. 1, p. 159-69, Jan. 2004.

SEGEL, S. Y.; MARDER, S. J.; PARRY, S.; MACONES, G. A. Fetal abdominal wall defects and mode of delivery: A systematic review. Obstetrics and gynecology, v. 98, n. 5 Pt 1, p. 867-73, Nov. 2001.

SENCAN, A.; GUMUSTEKIN, M.; GELAL, A.; ARSLAN, O.; OZER, E.; MIR, E. Effects of amnio-allantoic fluid exchange on bowel contractility in chick embryos with gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 37, n. 11, p. 1589-93, Nov. 2002.

SHAW, A. The myth of gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 10, n. 2, p. 235–44, Apr. 1975.

SHAW, K.; BUCHMILLER, T. L.; CURR, M.; LAM, M. M.; HABIB, R.; CHOPOURIAN, H. L.; DIAMOND, J. M.; FONKALSRUD, E. W. Impairment of nutrient uptake in a rabbit model of gastroschisis. Journal of pediatr surgery, v. 29, n. 3, p. 376-8, Mar. 1994.

SHERMAN, N. J.; ASCH, M. J.; ISAACS, H.; ROSENKRANTZ, J. G. Experimental gastroschisis in the fetal rabbit. Journal of pediatric surgery, v. 8, n. 2, p. 165–169, Apr. 1973.

SIEGA-RIZ A. M.; VISWANATHAN, M.; MOOS, M. K.; DEIERLEIN, A.; MUMFORD, S.; KNAACK, J.; THIEDA, P.; LUX, L. J.; LOHR, K. N. A systematic review of outcomes of maternal weight gain according to the Institute of Medicine recommendations: birthweight, fetal growth, and postpartum weight retention. American journal of obstetrics and gynecology, v. 201, n. 4, p. 339.e1-14, Oct. 2009.

SNYDER, C. W.; BIGGIO, J. R.; BRINSON, P.; BARNES, L. A.; BARTLE, D. T.; GEORGESON, K. E.; MUENSTERER, O. J. Effects of multidisciplinary prenatal care and delivery mode on gastroschisis outcomes. Journal of pediatric surgery, v. 46, n. 1, p. 86-9, Jan. 2011.

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. Histopathology, v. 50, n. 2, p. 176-89, Jan. 2007.

STRINGER, M. D.; BRERETON, R. J.; WRIGHT, V. M. Controversies in the management of gastroschisis: A study of 40 patients. Archives of disease in childhood, v. 66, n. 1, p. 34-6, Jan. 1991.

SWIFT, R. I.; SINGH, M. P.; ZIDERMAN, D. A.; SILVERMAN, M.; ELDER, M. A.; ELDER, M. G. A new regime in the management of gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 27, n. 1, p. 61-3, Jan. 1992.

TANNURI, A. C..; SBRAGIA, L.; TANNURI, U.; SILVA, L. M.; LEAL, A. J.; SCHMIDT, A. F.; OLIVEIRA-FILHO, A. G.; BUSTORFF-SILVA, J. M.; VICENTE, Y. A.; TAZIMA, M. F.; PILEGGI, F. O.; CAMPERONI, A. L. Evolution of critically ill patients with gastroschisis from three tertiary centers. Clinics, v. 66, n. 1, p. 17-20, Jan. 2011.

TIBBOEL, D.; RAINE, P.; MCNEE, M.; AZMY, A.; KLÜCK, P.; YOUNG, D.; MOLENAAR, J. C. Developmental aspects of gastroschisis. Journal of pediatr surgery, v. 21, n. 10, p. 865-9, Oct. 1986a.

TIBBOEL, D.; VERMEY-KEERS, C.; KLUCK, P.; GAILLARD, J. L.; KOPPENBERG, J.; MOLENAAR, J. C. The natural history of gastroschisis during fetal life: Development of the fibrous coating on the bowel loops. Teratology, v. 33, n. 3, p. 267-72, Jun. 1986b.

TOMOMASA, T.; HYMAN, P. E.; HSU, C. T.; JING, J.; SNAPE, W. J. JR. Development of the muscarinic receptor in rabbit gastric smooth muscle. The American journal of physiology, v. 254, n. 5pt1, p. G680-6, May. 1988.

VALDEZ, J. A. L.; COYOTL, D. M. C.; VEJA, C. A. V. New embryological hypothesis, genetics and epidemiology of gastroschisis. Pediatric Theme, v. 68, n. 3, p. 224-231, May-Jun. 2011.

VANNUCCHI, M. G.; MIDRIO, P.; FLAKE, A. W.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. Neuronal differentiation and myenteric plexus organization are delayed in gastroschisis: an immunohistochemical study in a rat model.. Neuroscience letters, v. 339, n. 1, p. 77-81, Mar. 2003.

VANNUCCHI, M. G.; MIDRIO, P.; ZARDO, C.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. Neurofilament formation and synaptic activity are delayed in the myenteric neurons of the rat fetus with gastroschisis. Neuroscience letters, v. 364, n. 2, p. 81-5, Jul. 2004.

VARGUN, R.; AKTUG, T.; HEPER, A.; BINGOL-KOLOGLU, M. Effects of intrauterine treatment on interstitial cells of Cajal in gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 42, n. 5, p. 783-7, May. 2007.

VEGUNTA, R. K.; WALLACE, L. J.; LEONARDI, M. R.; GROSS, T. L.; RENFROE, Y.; MARSHALL, J. S.; COHEN, H. S.; HOCKER, J. R.; MACWAN, K. S.; CLARK, S. E.; RAMIRO, S.; PEARL, R. H. Perinatal management of gastroschisis: analysis of a newly established clinical pathway. Journal of pediatric surgery, v. 40, n. 3, p. 528-34, Mar. 2005.

VILELA, P. C.; AMORIM, M. M. R.; FALBO NETO, G. H.; SANTOS, L. C.; SANTOS, R. V. H.; CORREIA, C. Fatores prognósticos para óbito em recém-nascidos com gastrosquise. Acta Cirurgica Brasileira, v. 17, n. Supl 1, p. 17-20. 2002.

VU, L. T.; NOBUHARA, K. K.; LAURENT, C.; SHAW, G. M. Increasing prevalence of gastroschisis: population-based study in California. The Journal of pediatrics, v. 152, n. 6, p. 807-11, Jun. 2008.

WILSON, M. S.; CARROLL, M. A.; BRAUN, S. A.; WALSH, W. F.; PIETSCH, J. B.; BENNETT, K. A. Is Preterm Delivery Indicated in Fetuses with Gastroschisis and Antenatally Detected Bowel Dilation?.Fetal diagnosis and therapy, 2012 Jul 18. [Epub ahead of print].

WILSON, R. D.; JOHNSON, M. P. Congenital abdominal wall defects: an update. Fetal diagnosis and therapy, v. 19, n. 5, p. 385-98, Sep-Oct. 2004.

YU, J.; GONZALEZ-REYES, S.; DIEZ-PARDO, J. A.; TOVAR, J. A. Effects of prenatal dexamethasone on the intestine of rats with gastroschisis. Journal of pediatric surgery, v. 38, n. 7, p. 1032-5, Jul. 2003.

YU, J.; GONZALEZ-REYES, S.; DIEZ-PARDO, J. A.; TOVAR, J. A. Local dexamethasone improves the intestinal lesions of gastroschisis in chick embryos. Pediatric surgery international, v. 19, n. 12, p. 780-4, Jan. 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Dados da morfometria de fetos de ratas operadas com 19,5 dias de gestação e sem tratamento.

	MC			MI			CI		
Animal	**C**	**Sh**	**G**	**C**	**Sh**	**G**	**C**	**Sh**	**G**
1	5,238	5,545	4,623	0,193	0,198	0,240	275	200	150
2	4,685	5,213	4,334	0,164	0,177	0,177	178	248	105
3	4,508	5,015	4,398	0,185	0,195	0,167	234	168	114
4	5,109	5,007	5,089	0,171	0,187	0,211	223	224	150
5	4,634	4,782	4,572	0,172	0,178	0,166	213	211	146
6	4,690	4,230	3,759	0,170	0,182	0,120	218	209	156

MC: Massa Corpórea; MI: Massa Intestinal; CI: Comprimento Intestinal. Grupos: (C) Controle, (Sh) Sham e (G) Gastrosquise

APÊNDICE B

Dados da morfometria de fetos de ratas operadas com 18,5 dias de gestação e sem tratamento.

	MC			MI			CI		
Animal	**C**	**Sh**	**G**	**C**	**Sh**	**G**	**C**	**Sh**	**G**
1	3,377	4,295	4,320	0,102	0,225	0,233	160	205	150
2	3,320	4,209	4,460	0,129	0,186	0,140	165	205	140
3	4,253	4,142	4,810	0,143	0,154	0,268	195	221	178
4	4,123	4,031	4,450	0,147	0,156	0,166	195	185	155
5	4,365	4,598	3,451	0,148	0,222	0,189	190	189	139
6	4,115	5,290	4,626	0,166	0,175	0,166	188	205	112
7	3,908	3,540	5,005	0,140	0,112	0,207	156	158	175
8	5,409	4,262	4,330	0,177	0,154	0,205	200	230	85
9	4,221	4,144	3,260	0,128	0,156	0,171	170	200	115
10	4,387	4,313	4,395	0,235	0,148	0,245	186	165	94
11	5,307	4,075	4,626	0,240	0,186	0,238	192	215	201

MC: Massa Corpórea; MI: Massa Intestinal; CI: Comprimento Intestinal. Grupos: (C) Controle, (Sh) Sham e (G) Gastrosquise

APÊNDICE C

Dados da morfometria de fetos de ratas operadas com 18,5 dias de gestação e tratadas com dexametasona.

	MC			MI			CI		
Animal	**C**	**Sh**	**G**	**C**	**Sh**	**G**	**C**	**Sh**	**G**
1	4,360	3,790	3,894	0,179	0,152	0,166	192	185	180
2	4,197	4,515	4,870	0,168	0,198	0,170	197	192	178
3	4,140	3,954	3,852	0,168	0,136	0,180	195	160	166
4	3,708	3,030	2,882	0,218	0,122	0,136	170	190	150
5	3,434	3,280	3,875	0,145	0,138	0,162	192	166	175

MC: Massa Corpórea; MI: Massa Intestinal; CI: Comprimento Intestinal. Grupos: (C) Controle, (Sh) Sham e (G) Gastrosquise

APÊNDICE D

Atividade da enzima Mieloperoxidase no intestino e estômago

	MPO DO INTESTINO			MPO DO ESTÔMAGO		
Animal	**C**	**Sh**	**G**	**C**	**Sh**	**G**
1	-0,252845	0,126422	5,309734	1,137800	-0,379267	0,379266
2	0,379267	0,126422	0,252844	1,264223	5,436157	0,758533
3	0,126422	0,632111	1,390644	8,723135	1,643489	3,539823
4	0,126422	0,126422	26,801517	2,781290	5,815423	1,264222
5	0,126422	0,505689	3,160556	1,896334	2,654867	1,390644
6	1,264223	0,252845	1,896333	1,390645	1,769912	1,517067
7	0,126422	0,252845	17,319848	0,632111	-	-
8	0,505689	0,126422	12,895069	0,632111	-	-
9	1,264223	0,000000	0,379266	0,379267	-	-

Grupos: (C) Controle, (Sh) Sham e (G) Gastrosquise

APÊNDICE E

Frequência de contrações de antro gástrico no grupo controle, em diferentes concentrações de Carbacol.

4 minutos	Basal	0,01µM	0,03µM	0,1µM	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM	100µM
Animal 1	1	1	2	3	5	6	7	7	9	7
Animal 2	4	6	7	6	9	8	8	8	10	6
Animal 3	2	4	7	9	10	10	11	11	11	12
Animal 4	3	4	4	5	6	5	5	6	8	7
Animal 5	3	6	8	9	7	6	8	7	8	7
1 minuto	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 1	0,25	0,25	0,5	0,75	1,25	1,5	1,75	1,75	2,25	1,75
Animal 2	1	1,5	1,75	1,5	2,25	2	2	2	2,5	1,5
Animal 3	0,5	1	1,75	2,25	2,5	2,5	2,75	2,75	2,75	3
Animal 4	0,75	1	1	1,25	1,5	1,25	1,25	1,5	2	1,75
Animal 5	0,75	1,5	2	2,25	1,75	1,5	2	1,75	2	1,75

APÊNDICE F

Frequência de contrações de antro gástrico no grupo *sham*, em diferentes concentrações de Carbacol.

4 minutos	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 1	3	5	5	6	5	6	4	5	7	5
Animal 2	1	2	3	3	5	6	7	9	7	8
Animal 3	4	6	8	8	8	7	7	7	8	7
Animal 4	2	5	8	7	9	8	7	8	8	7
Animal 5	3	4	6	9	9	9	10	9	9	9
Animal 6	0	0	1	5	5	6	7	7	6	6
1 minuto	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 1	0,75	1,25	1,25	1,5	1,25	1,5	1	1,25	1,75	1,25
Animal 2	0,25	0,5	0,75	0,75	1,25	1,5	1,75	2,25	1,75	2
Animal 3	1	1,5	2	2	2	1,75	1,75	1,75	2	1,75
Animal 4	0,5	1,25	2	1,75	2,25	2	1,75	2	2	1,75
Animal 5	0,75	1	1,5	2,25	2,25	2,25	2,5	2,25	2,25	2,25
Animal 6	0	0	0,25	1,25	1,25	1,5	1,75	1,75	1,5	1,5

APÊNDICE G

Frequência de contrações de antro gástrico no grupo gastrosquise, em diferentes concentrações de Carbacol.

4 minutos	Basal	0,01µM	0,03µM	0,1µM	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM	100µM
Animal 1	1	3	4	5	6	6	6	7	7	6
Animal 2	2	5	6	6	6	6	7	6	6	6
Animal 3	2	3	3	5	8	8	7	9	5	7
Animal 4	1	2	3	4	5	5	6	7	7	7
Animal 5	4	4	3	5	6	5	6	5	4	2
1 minuto	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 1	0,25	0,75	1	1,25	1,5	1,5	1,5	1,75	1,75	1,5
Animal 2	0,5	1,25	1,5	1,5	1,5	1,5	1,75	1,5	1,5	1,5
Animal 3	0,5	0,75	0,75	1,25	2	2	1,75	2,25	1,25	1,75
Animal 4	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,25	1,5	1,75	1,75	1,75
Animal 5	1	1	0,75	1,25	1,5	1,25	1,5	1,25	1	0,5

APÊNDICE H

Amplitudes das contrações do antro gástrico em diferentes concentrações de Carbacol no grupo controle.

Animal	Massa	Basal	0,01µM	0,03µM	0,1µM	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM	100µM
Animal 1	0,0041	0,0174	0,0155	0,0152	0,0194	0,0431	0,0651	0,1289	0,1136	0,0822	0,0757
				0,0167	0,0363	0,0255	0,1003	0,0365	0,0593	0,0581	0,0403
					0,0169	0,0873	0,0387	0,0672	0,0303	0,0437	0,086
						0,0503	-0,0303	0,0949	0,0796	0,0638	0,0241
						0,0286	0,0656	0,0299	0,0419	0,0307	0,0762
							0,031	0,0307	0,0838	0,0391	0,0254
								0,0848	0,0464	0,0509	0,0658
										0,0576	
										0,0642	
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 2	0,0069	0,0228	0,0383	0,0354	0,0465	0,0687	0,0825	0,1474	0,0548	0,1783	0,1425
		0,0282	0,0358	0,0227	0,0529	0,1389	0,0737	0,1867	0,1892	0,0831	0,0909
		0,0297	0,0306	0,036	0,058	0,0925	0,1676	0,1153	0,1031	0,0985	0,0637
		0,0256	0,0227	0,0327	0,0445	0,0773	0,1162	0,1682	0,1679	0,1045	0,12
			0,0458	0,0315	0,0915	0,1	0,1122	0,1217	0,0975	0,0728	0,0559
			0,0369	0,0458	0,0625	0,1663	0,1182	0,1006	0,0686	0,0545	0,0855
				0,0417		0,086	0,0994	0,0658	0,1739	0,0948	
						0,0655	0,0871	0,2235	0,1771	0,0815	
						0,0949				0,0897	

										0,1142	
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 3	0,0077	0,028	0,0734	0,0521	0,0753	0,073	0,0983	0,0857	0,057	0,1286	0,0642
		0,0417	0,0529	0,0432	0,1347	0,0981	0,0677	0,0622	0,0658	0,0597	0,059
			0,0533	0,0628	0,0513	0,0741	0,0837	0,0911	0,052	0,0636	0,0677
			0,0597	0,0533	0,0607	0,0713	0,1729	0,0583	0,0961	0,0493	0,0509
				0,0606	0,0591	0,0851	0,0731	0,0953	0,0471	0,0438	0,0559
				0,0922	0,0674	0,0689	0,0799	0,0693	0,1169	0,0357	0,0913
				0,0562	0,0501	0,0581	0,0832	0,0767	0,061	0,0389	0,0593
					0,0855	0,0726	0,0798	0,0639	0,0568	0,0383	0,0512
					0,0815	0,0613	0,0655	0,0821	0,0565	0,0358	0,0452
						0,0979	0,0591	0,1201	0,0529	0,0437	0,0414
								0,0775	0,0594	0,0464	0,0611
											0,0577
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 4	0,0109	0,2435	0,3024	0,2952	0,1889	0,5148	0,5211	0,5183	0,4115	0,44	0,1481
		0,1822	0,1512	0,2512	0,4761	0,4052	0,3098	0,462	0,2903	0,2658	0,3485
		0,1552	0,1942	0,4754	0,3366	0,4659	0,2685	0,3576	0,2521	0,3124	0,356
			0,1904	0,2965	0,4402	0,3947	0,1665	0,0739	0,1866	0,0932	0,2893
					0,2842	0,1405	0,29	0,1085	0,2786	0,231	0,1522
						0,2432			0,2199	0,1615	0,2712
										0,1577	0,1919
										0,2964	

Animal	Massa	Basal	0,01µM	0,03µM	0,1µM	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM	100µM
Animal 5	0,0023	0,0529	0,0309	0,0427	0,0674	0,1252	0,3626	0,1543	0,4566	0,1475	0,32
		0,0253	0,0244	0,0164	0,2108	0,2049	0,1244	0,4502	0,1072	0,2894	0,1887
		0,091	0,0243	0,0413	0,0635	0,1024	0,351	0,3585	0,1946	0,0928	0,0588
			0,0715	0,0203	0,0285	0,0611	0,0482	0,2614	0,1272	0,1913	0,1223
			0,025	0,0355	0,0312	0,05127	0,139	0,161	0,1319	0,1454	0,1263
			0,0234	0,1087	0,0627	0,2025	0,0671	0,137	0,0898	0,0934	0,0994
				0,0287	0,0607	0,11		0,1678	0,1078	0,068	0,1983
				0,0265	0,0794			0,1636		0,1405	
					0,0938						

APÊNDICE I

Amplitudes das contrações do antro gástrico em diferentes concentrações de Carbacol no grupo *sham*.

Animal	Massa	Basal	0,01µM	0,03µM	0,1µM	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM	100µM
Animal 1	0,0044	0,1373	0,1246	0,157	0,1927	0,2491	0,1562	0,3099	0,1944	0,1384	0,1443
		0,2264	0,1978	0,1956	0,132	0,1156	0,3066	0,1892	0,1109	0,0646	0,0749
		0,0979	0,0904	0,074	0,2509	0,0998	0,1599	0,2059	0,1655	0,0676	0,0933
			0,0608	0,0774	0,1008	0,2041	0,1864	0,1595	0,0809	0,1232	0,0809
			0,0877	0,1314	0,0859	0,0965	0,0916		0,1759	0,0769	0,0954
					0,0599		0,2216			0,1472	
										0,1337	
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 2	0,0096	0,033	0,0496	0,0619	0,1131	0,1403	0,1194	0,4576	0,3246	0,3741	0,3372
			0,0284	0,1828	0,1445	0,0639	0,2854	0,2269	0,0962	0,2404	0,2815
				0,0516	0,1634	0,3073	0,1965	0,2112	0,2373	0,2613	0,1946
						0,088	0,1071	0,2702	0,2198	0,0598	0,201
						0,0753	0,2657	0,1934	0,1871	0,1806	0,2052
							0,2388	0,1047	0,1837	0,1494	0,2076
								0,3247	0,1232	0,071	0,0663
									0,2158		0,2944
									0,1178		

Animal	Massa	Basal	0,01µM	0,03µM	0,1µM	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM	100µM
Animal 3	0,0025	0,0238	0,209	0,0365	0,1156	0,0617	0,1887	0,1982	0,0704	0,1646	0,0496
		0,0256	0,2915	0,0545	0,0683	0,0272	0,1829	0,1037	0,1597	0,0622	0,0661
		0,0235	0,063	0,029	0,0503	0,1791	0,0585	0,0779	0,0573	0,0947	0,0358
		0,0452	0,0385	0,0268	0,1083	0,2293	0,1484	0,0669	0,1674	0,0618	0,0552
			0,0273	0,042	0,0684	0,1155	0,0754	0,0847	0,0762	0,045	0,0844
			0,024	0,0657	0,1616	0,0463	0,1125	0,2254	0,1504	0,0639	0,0285
				0,0372	0,0492	0,1363	0,0779	0,1144	0,0427	0,0702	0,0822
				0,3357	0,0484	0,0565				0,1155	
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 4	0,0015	0,0279	0,0292	0,0388	0,0368	0,1835	0,407	0,3724	0,2487	0,0802	0,0823
		0,0263	0,0228	0,0415	0,1815	0,0987	0,21	0,2701	0,1921	0,1428	0,1164
			0,0336	0,041	0,1522	0,0702	0,189	0,1063	0,2037	0,1635	0,0787
			0,0244	0,0255	0,0257	0,1979	0,3284	0,187	0,0752	0,0722	0,0586
			0,0333	0,0255	0,0239	0,2542	0,1383	0,0687	0,0667	0,0851	0,0581
				0,0284	0,0423	0,083	0,1841	0,1499	0,0895	0,05	0,0443
				0,0291	0,0355	0,0381	0,1327	0,1659	0,157	0,0629	0,0531
				0,0423		0,2107	0,2072		0,093	0,0633	
						0,1549					
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 5	0,0029	0,052	0,0622	0,0668	0,076	0,165	0,0786	0,3776	0,1459	0,1714	0,1243
		0,0493	0,0597	0,0737	0,0596	0,1738	0,1383	0,1625	0,1584	0,0695	0,1868
		0,0509	0,0681	0,0754	0,1525	0,1541	0,2014	0,0861	0,0941	0,1482	0,1068

			0,0651	0,0974	0,176	0,1058	0,2822	0,1644	0,1195	0,0637	0,1534
				0,0498	0,1324	0,1591	0,1563	0,1149	0,1023	0,1615	0,1698
				0,0759	0,1157	0,1073	0,1063	0,2681	0,1994	0,0831	0,1534
					0,0871	0,1112	0,2072	0,1929	0,1298	0,0519	0,1698
					0,1986	0,0841	0,2648	0,1914	0,0903	0,1122	0,0911
					0,1706	0,207	0,1991	0,2177	0,0825	0,1555	0,1911
								0,1772			
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 6	0,0043	0	0	0,2899	0,3937	0,2095	0,4335	0,6043	0,2668	0,164	0,3147
					0,1694	0,2338	0,3792	0,2549	0,2909	0,0931	0,0705
					0,1276	0,217	0,3963	0,1209	0,1745	0,2453	0,1418
					0,188	0,1714	0,2573	0,2814	0,1289	0,1464	0,1407
					0,0657	0,1072	0,2282	0,3099	0,1894	0,1711	0,134
							0,2735	0,1444	0,2084	0,2062	0,0813
								0,2329	0,0981		

APÊNDICE J

Amplitudes das contrações do antro gástrico em diferentes concentrações de Carbacol no grupo gastrosquise.

Animal	Massa	Basal	0,01µM	0,03µM	0,1µM	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM	100µM
Animal 1	0,0048	0,0787	0,1027	0,1679	0,2234	0,342	0,3891	0,2809	0,1675	0,1903	0,2067
			0,1033	0,0897	0,156	0,22	0,1962	0,1666	0,0825	0,2182	0,1132
			0,1027	0,0743	0,2015	0,2029	0,2648	0,1044	0,168	0,1538	0,1796
				0,0883	0,057	0,2402	0,2395	0,1442	0,1193	0,1735	0,1786
					0,2712	0,1102	0,2685	0,2033	0,115	0,1929	0,0804
						0,2671	0,1645	0,1639	0,1934	0,1214	0,1431
									0,194	0,0817	
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 2	0,0037	0,031	0,0737	0,098	0,2619	0,1081	0,4229	0,4238	0,3523	0,3977	0,2716
		0,0419	0,0404	0,1026	0,1898	0,3677	0,2998	0,1877	0,3643	0,1779	0,2497
			0,0875	0,2294	0,2108	0,0999	0,3511	0,2009	0,2745	0,2266	0,1738
			0,0676	0,1263	0,1965	0,2883	0,3764	0,2753	0,3398	0,1903	0,239
			0,0981	0,1956	0,1515	0,0823	0,2541	0,2694	0,2584	0,2001	0,0973
				0,1242	0,1745	0,3303	0,3496	0,2755	0,28477	0,284	0,2949
								0,2203			
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 3	0,0031	0,0176	0,0179	0,035	0,1184	0,0603	0,3566	0,2568	0,3123	0,1972	0,1792
		0,0114	0,0158	0,0323	0,0809	0,2538	0,2059	0,2132	0,2108	0,2107	0,0701
			0,0108	0,0596	0,081	0,1308	0,3378	0,203	0,1673	0,0653	0,1129

					0,087	0,1691	0,1971	0,1789	0,1831	0,0788	0,0629
					0,1927	0,1517	0,1636	0,2001	0,1087	0,0899	0,0972
						0,1454	0,1326	0,2957	0,1791		0,0807
						0,2068	0,1558	0,1883	0,1905		0,1335
						0,1106	0,1751		0,2017		
									0,1796		
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 4	0,0073	0,0136	0,0186	0,0131	0,0234	0,0781	0,1728	0,2322	0,195	0,1209	0,0918
			0,0117	0,0138	0,0209	0,0756	0,1921	0,2265	0,1638	0,1403	0,1222
				0,0201	0,0173	0,0687	0,1662	0,1048	0,1573	0,0589	0,0754
					0,0112	0,0608	0,2828	0,2219	0,1443	0,1106	0,1599
						0,105	0,1668	0,1418	0,1145	0,0895	0,0914
								0,085	0,0869	0,0672	0,0562
									0,1401	0,099	0,0651
Animal	**Massa**	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**
Animal 5	0,0116	0,1582	0,3453	0,3812	0,3364	0,3378	0,2712	0,2109	0,2734	0,1682	0,1544
		0,1691	0,3072	0,3329	0,115	0,1431	0,2988	0,2629	0,2168	0,171	0,1315
		0,0757	0,3205	0,2627	0,358	0,2901	0,2862	0,2178	0,1725	0,158	
		0,1279	0,1613		0,1541	0,2156	0,3242	0,2675	0,1666	0,1563	
					0,2847	0,3086	0,2835	0,1962	0,1659		
						0,3211		0,2173			

APÊNDICE K

Amplitudes das contrações do fundo gástrico em diferentes concentrações de Carbacol nos grupo controle (C), Sham (Sh) e gastrosquise (G).

C	Basal	0,01µM	0,03µM	0,1µM	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM	100µM	Massa
Animal 1	0,4686	0,4687	0,4682	0,5051	0,5978	0,7087	0,8309	0,9285	0,9653	0,9604	0,0059
Animal 2	0,2941	0,272	0,3767	0,3863	0,4188	0,5313	0,6406	0,6789	0,7408	0,783	0,0102
Animal 3	0,4162	0,4015	0,3874	0,4168	0,4701	0,5387	0,6089	0,6428	0,6983	0,6974	0,0052
Animal 4	0,6712	0,6412	0,6091	0,6363	0,6867	0,7875	0,9102	0,9343	0,9959	0,9766	0,0065
Animal 5	0,4242	0,468	0,4105	0,482	0,4782	0,4837	0,5163	0,5741	0,6352	0,6532	0,0066
Animal 6	0,5027	0,6169	0,6205	0,6377	0,6338	0,6164	0,6384	0,7159	0,7948	0,787	0,0097
Animal 7	0,367	0,4132	0,4727	0,5837	0,5417	0,7364	0,7343	0,8466	0,9012	0,9165	0,00735
Animal 8	0,4535	0,4676	0,4693	0,4972	0,527	0,5586	0,6067	0,655	0,7338	0,7385	0,00735
Sh	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**	**Massa**
Animal 1	0,7192	0,7276	0,7439	0,7552	0,7557	0,781	0,7953	0,8243	0,8398	0,835	0,0059
Animal 2	0,3331	0,3165	0,3876	0,4003	0,465	0,5066	0,6171	0,6677	0,6692	0,7139	0,012
Animal 3	0,7318	0,6948	0,6894	0,6894	0,6841	0,7671	0,7922	0,8897	0,9515	0,9562	0,0068
Animal 4	0,4418	0,4686	0,4686	0,4741	0,5868	0,5985	0,7026	0,7842	0,8064	0,8186	0,0042
Animal 5	0,3749	0,4035	0,5209	0,5767	0,6409	0,7361	0,7895	0,8633	0,9023	0,9438	0,0059
Animal 6	0,2725	0,2934	0,3361	0,369	0,4185	0,5125	0,6168	0,6346	0,6655	0,7173	0,0052
Animal 7	0,5773	0,6061	0,6756	0,744	0,7819	0,7901	0,8004	0,8414	0,8723	0,8638	0,0047
G	**Basal**	**0,01µM**	**0,03µM**	**0,1µM**	**0,3µM**	**1µM**	**3µM**	**10µM**	**30µM**	**100µM**	**Massa**
Animal 1	0,4062	0,3921	0,4202	0,4111	0,4486	0,4909	0,557	0,6035	0,6511	0,6921	0,0045
Animal 2	0,5103	0,5178	0,5178	0,5552	0,5688	0,5873	0,683	0,7263	0,7333	0,7904	0,0048
Animal 3	0,5403	0,5403	0,5459	0,5991	0,6325	0,6912	0,7141	0,761	0,7858	0,8087	0,0043
Animal 4	0,2558	0,2584	0,2594	0,2745	0,4021	0,5477	0,629	0,7287	0,7812	0,8321	0,0076
Animal 5	0,4052	0,4052	0,4052	0,4052	0,4149	0,4286	0,6693	0,9425	0,9792	0,9792	0,0074
Animal 6	0,3825	0,3825	0,3825	0,3825	0,4114	0,414	0,5047	0,6404	0,6699	0,7258	0,0063

APÊNDICE L

Versão final de artigo aceito para publicação

GASTRIC CONTRACTILITY IN EXPERIMENTAL GASTROSCHISIS

ABSTRACT

Background/purpose: The mechanism of fetal gastric dilation in gastroschisis is a controversial area. This study was designed to characterize changes in the contractile profile of strips of stomach from rats following experimental gastroschisis.

Methods: Pregnant Wistar rats were operated on day 18.5. Fetuses were divided into three groups:gastroschisis (G), sham (S) and control (C). On day 21.5, gastric *fundus* and *antrum* strips were obtained and suspended to a force transducer connected to a digital data acquisition system. They were submitted to increasing concentrations of carbachol (CCh) and weighed at the end of each procedure. Frequency and amplitude of each contraction were evaluated.

Results: Under basal conditions, spontaneous oscillatory contractions of *antrum* and *fundus* strips of G, S and C were similar ($P > 0.05$; ANOVA). However, cumulative concentrations of CCh (0.01-100 μM) produced different effects in all groups and were characterized by a significant increase in amplitude and frequency of spontaneous contractions in antral smooth muscle and a sustained increase in tonus in fundic strips. Upon analysis, no significant difference in frequency or amplitude was noted in antral tissues comparing C, to G and to S ($P > 0.05$). No significant contractility difference was noted in fundic smooth muscle (comparing all groups, $P > 0.05$), with the CCh-induced curve following a typical sigmoidal format, dependent to increasing concentrations ($P < 0.001$).

Conclusions: Gastric contractile responses to CCh are preserved in experimental gastroschisis. These results do not support the theory that gastric dilation may occur secondary to intestinal inflammation alone.

Keywords: Gastroschisis; experimental, intestinal & gastric muscle contractility.

INTRODUCTION

Gastroschisis is increasing in prevalence throughout the world although overall mortality rates have fallen and are now <10% [1]. Nonetheless, morbidity is still high with long hospital stays and high medical costs [2,3].

Both clinical and experimental studies have suggested that there are changes in the organization of myoenteric complexes of the affected intestines, together with retarded maturation of Cajal cells, smooth muscle cells [4,5] and neurons [6,7]. These changes are thought to contribute to motility defects, a key characteristic of the intestines of infants with gastroschisis [8,9].

The prognostic value of certain maternal ultrasound-derived features such as fetal intestinal dilation [10,11] remains controversial. Recently, fetal gastric dilation has also been suggested as a biological marker for post-natal complicated gastroschisis [12,13]. Its supporters speculate that this occurs as a consequence of mechanical intestinal obstruction (e.g. volvulus, or atresia), or is due to the effect of inflammation on gastric motility [13,14].

There are a number of methods to identify intestinal inflammatory processes including the measurement of myeloperoxidase (MPO) activity. This enzyme occurs in azurophilic granules in neutrophils, and can be used as an indirect biochemical marker of neutrophils infiltration into inflamed tissues [15].

We investigated a model of experimental gastroschisis in fetal rats and studied the effect on gastric motility.

MATERIAL AND METHODS

Animals

The research protocol was approved by the Ethics and Research on Animals Committee (CEPA/UFC, protocol number 33/2008). We used female albino Wistar rats (*Rattus norvergicus*), weighing about

250 g and acquired from the Central Vivarium of the Federal University of Ceará (UFC). They were maintained under a naturally acclimatized day-night-cycle ambience, with free access to water and fodder. After verifying that they were undergoing *estrous* or *pro-estrous* cycle, we divided the rats in a random manner and assigning each to individual cages and mated. The mating procedure entailed a free interaction involving a female:male proportion of 3:2 per cage. Mating was considered success upon the verification of viable spermatozoids in a simple vaginal smear sample, 24 h after commence of the female-male interaction. When positive, we considered this day to be pregnancy day zero with a full term in lasting 22 days.

Surgical Model

We used the experimentally induced gastroschisis model described previously by Correia-Pinto [16]. Pregnant rats were anesthetized on the 18.5th day with an intra-muscular injection of ketamine 175 mg/kg (50 mg/ml; Cetamin® - Syntec - Brazil) and xylazine 2.5mg/kg (10 mg/ml; Rompum® - Bayer - Brasil). Using surgical loupe magnification and an aseptic technique we performed a ventral laparotomy. The bicornuate uterus was exteriorized and the fetuses counted, from the proximal to the distal extremity in relation to the cervix. The most proximal and the most distal fetus of each uterine cornu were not included in the study, leaving the 2nd, 3rd, and 4th either to gastroschisis surgery (G), control (C) (non-manipulated) or sham (S). This was repeated on the other cornu. A purse-string suture was placed in the uterine wall with a polypropylene (6-0) suture, exposing the anterior abdominal wall of the fetus up to the level of the umbilicus while leaving the upper abdomen and thorax within the uterine cavity. Experimental gastroschisis was performed by a right paramedian incision (5 mm) and exposing the intestines. Sham surgery procedure included exteriorizing the ventral abdominal wall, similar to the gastroschisis group, and gentle abdominal palpation. Uterine incisions and the maternal abdominal wall were closed. Animas were kept in individual cages with food and water offered *ad libitum*.

Data collection

On the 21.5th day, the operated rats were anesthetized, and a caesarian-like surgery undertaken to collect and weigh (body weight - BW) the operated fetuses and controls. These were sacrificed by occipital puncture. The stomach was sampled for *in vitro* contractility study or estimation of MPO. The intestinal tract was removed from pylorus to rectum and it was weighed (intestinal weight - IW). This was followed by a linear and careful spreading of the gut upon a flat surface without applying

any tension while carefully dissecting the mesenterium, and measured using a ruler (intestinal length - IL). Harvested intestines were sampled for MPO activity.

Morphometric analysis

Fetuses with gastroschisis, controls and sham-operated were compared for BW, IW, IL, IW/BW ratio, IW/IL ratio, and BW - IW.

Myeloperoxidase Estimation

As previously described [17], we determined the intensity of neutrophil accumulation in intestinal tissue of gastroschisis, sham and control group of rats. Initially, stomach and intestines, weighing approximately 150 – 100 g, were homogenized in a buffer containing hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) (Sigma®, USA); utilizing 1 ml of HTAB, for every 50 g of tissue. Later, the contents were centrifuged at 3,000 rpm, for 15 min. Subsequently, an osmotic shock was applied using a solution (900 µl) containing 0.2% NaCl followed by a 900 µl solution containing 1.6% NaCl and 5% glucose was added to each pellet. This was centrifuged for 15 min, after which each pellet was re-suspended in a $NaPO_4$-based buffer (pH 5.4) consisting of 0.5% HTAB and homogenized once again. There were three rounds of freezing-defreezing procedures, followed by another centrifugation process at 10,000 rpm for 15 min, at 4ºC. Finally, we quantified the MPO activity by determining change in optic density (OD, basal 450 nm) in each pellet utilizing tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H_2O_2 (0.5 mM) and expressed the results in units per mg weight of tissue (U/mg). Each group consisted of a minimum 6 fetuses.

In vitro *contractility*

Stomach strips from G, C and S fetuses were isolated for *in vitro* studies using a organ-bath system. Gastric fundus and the antrum from each stomach sample (cut as ring-like segments representing the stomach circumference in the fundus and antrum) were isolated and suspended using a non-extensible cotton string to a force transducer (ML870B60/C-V, AD Instruments, Australia), connected to a digital data acquisition system (PowerLab™ 8/30, AD Instruments). Tissues were maintained in 5 ml organ bath filled with modified Tyrode's solution (in mM: NaCl 136.0; KCl 5.0; $MgCl_2$ 0.98; $CaCl_2$ 2.0; NaH_2PO_4 0.36; $NaHCO_3$ 11.9 and glucose 5.5) warmed at 37°C continuously bubbled with 5% CO_2 in O_2. Isometric contraction recordings were representative of the circular smooth muscle. A resting tension of 1 g was initially applied onto each tissue preparation and an equilibrium period of 1 h was

then allowed. Each suspended tissue was submitted to increasing concentrations of carbachol (CCh, 0.01-100 μM) in order to construct concentration-effect curves. After each protocol, tissue strips were weighed so as to express the force developed after a given contractile stimulus as a relation to its respective mass of tissue (mg of force/mg of tissue). Frequency of contractions was expressed as contractions/min. Force developed in antral tissues was evaluated by measuring peak-to-peak amplitude of the spontaneous or CCh-induced rhythmic smooth muscle contractions. Fundic tissues were evaluated by measuring the CCh-induced contraction at the maximal peak deflections after a given concentration of CCh. Values of EC_{50}, i.e. the concentration of CCh that causes 50% of its maximal effect, were also described. At least, five fetuses were studied in the groups G, C and S.

Statistical analysis

Data on morphological results and those related to the activity of MPO were expressed as mean ± standard deviation – SD (number of experiments) and thereafter submitted to statistical evaluation using analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls multiple comparison test.

Data from gastric contractility were expressed as mean ± standard error of the mean – SEM (number of experiments). Significance of the results was determined using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) and, when significant, followed by the Newman-Keuls multiple comparison test. Values of EC_{50} were shown as geometric mean [95% confidence interval] (number of experiments). Comparison of EC_{50} values was performed by the Mann-Whitney U test.

All analyses were performed using the GraphPad Prism software and statistical significance was accepted if $P < 0.05$.

RESULTS

Morphometric results

There were 11 rats in each group. Table 1 illustrates morphometric data. Gastroschisis fetuses had heavier but shorter intestines and higher values for IW/BW and IW/IL in comparison to sham and controls. Nevertheless, BW and BW–IW indices were similar across all groups.

Myeloperoxidase results

There was significantly higher intestinal MPO activity in fetuses with gastroschisis, when compared to

both sham and controls ($P < 0.01$, ANOVA) (Fig 1a). Hysterotomy by itself did not alter MPO activity as there was no significant difference between the sham and control groups. However, there was no difference in gastric tissue MPO activity comparing all groups (Fig. 1b).

Gastric contractility results

Antral and fundal strips from control rats showed spontaneous oscillatory contractions with a mean amplitude of 13.19 ± 4.71 mg/mg of tissue (n = 5) and 2.13 ± 2.00 mg/mg of tissue (n = 8) respectively, both under basal conditions. This was not significantly different from sham- or gastroschisis groups (Table 2; $P > 0.05$, ANOVA). Addition of CCh (0.01-100 µM) produced differential effects, characterized by an increase in the amplitude and frequency of the spontaneous contractions in antral smooth muscle (Fig. 2a), and a sustained increase in tonus observed in fundal tissues (Fig. 2b).

Maximal values of contractile amplitude (Fig. 3a) and frequency (Fig. 3b) after addition of CCh were 37.97 ± 12.92 mg/mg of tissue and 2.30 ± 0.14 contractions/min, which were observed with CCh at 3 and 30 µM, respectively in antral strips of control animals. These were significantly higher than those in basal period recorded before adding CCh ($P < 0.05$, ANOVA). Group comparison of maximal values showed that neither antral amplitude nor frequency was significantly different (Table 2; $P > 0.05$, ANOVA).

The contractile effect induced by CCh in fundal smooth muscle followed a typical sigmoid concentration-effect curve (Fig. 4) ($P < 0.001$, ANOVA). The first significant effect induced by CCh was observed at 1 µM ($P < 0.05$, ANOVA) in all groups. EC_{50} was 1.60 [0.89 – 2.86] µM in controls, and 1.15 [0.45 -2.97] µM and 1.96 [0.92 – 4.21] µM, respectively in sham and gastroschisis groups (Table 2) (Difference not statistically significant ($P > 0.05$, ANOVA)). Maximal effect (E_{max}) was achieved at 100 µM in fundal strips from all groups (51.24 ± 6.72, 59.57 ± 11.97 and 65.36 ± 3.82 mg/mg of tissue in control, sham and gastroschisis, respectively, $P > 0.05$, Mann-Whitney U-test).

DISCUSSION

Gastric dilatation has been suggested as an additional prenatal risk factor in infants with gastroschisis. It is associated with presence of meconium in the amniotic fluid at birth, increased need for surgery, longer hospital admission, and even more frequent neonatal deaths [12,13,18]. However, there has been no consensus on the pathophysiology involved.

Studies on the effect of gastroschisis on intestinal motility are rare. In one study in rabbits, Oyachi *et al*. found a reduction in gastric sensitivity to bethanecol – a cholinergic agonist [14]. However, they did not specify which portion of the stomach was tested and suggested that the dysmotility could be due to gastric smooth muscle tissue inflammation. However, no actual assessment of inflammatory activity was measured.

Studies on contractile activity of isolated rat fetal muscle strips particularly from the stomach, are also uncommon. We used the experimental gastroschisis model described by Correia-Pinto *et al*. [16] that resembles human gastroschisis and in which putative smooth muscle contractile behavior was noted and compared this to two other experimental groups (sham operated and controls from the same litter) in the same gestation.

Although extremely small in size, the selected strips from the fundus and antrum reproduced recordings compatible with the physiological patterns expected of this smooth muscle. It is worth highlighting that the motive behind selection of fundal and the antral smooth muscle is that those regions are involved in functions primarily related to meal storage and mixture, and propulsion of gastric contents through the pylorus into the duodenum, respectively [19]. As expected, fundal strips showed a contractile pattern characterized by low-frequency, small-amplitude spontaneous contractions and, when stimulated by the muscarinic agent CCh, they responded in a concentration-dependent manner producing sustained contractions, whereas antral tissues characteristically increased both the amplitude and the frequency of its oscillatory contractions, but without evident maintenance of a sustained tonus above basal levels.

Despite of the functional and physiological differences existing between fundic and antral strips, it should be considered that the resultant CCh-induced contractions in our experiments were also consistent with the expected responses caused by the interaction of this cholinergic agent with muscarinic receptors in gastric tissues. Acid secretion and interaction with several agonists, including

CCh, has already been shown in fetal rat stomachs by Garzon *et al*. [20]. Our findings provide evidence that fetal gastric smooth muscle is similarly responsive to contractile stimuli induced by agonistic stimulation of muscarinic receptors *in vitro*. This corroborates with findings, which though conducted in other animal species such as guinea-pigs and rabbits, acetylcholine inflicted an agonistic physiological role on the gut smooth muscle during the gestation period [21,22].

In our study, *in vitro* characterization of the contractile response induced by CCh was chosen since cholinergic stimulus constitutes the major excitatory drive of the parasympathetic nervous system in the gut [23] and gastrointestinal motility appears to be influenced early during development by cholinergic neurons [24]. Our results, by contrast, using CCh as cholinergic agonist clearly differed with those of Oyachi *et al*., who observed a significant reduction in bethanechol-induced contraction in isolated preparations of gastric smooth muscle from rabbits [14]. Is is noteworthy that the evaluation conducted by Oyachi et al. was restricted to a single concentration of bethanechol, without analyzing a complete concentration-effect relationship for the muscarinic stimulus. We conclude that at least in rats, gastroschisis is unable to induce direct changes in gastric smooth muscle contractility.

There may be several reasons why we did not show functional changes due to gastroschisis in our experimental model. We did obtain bowel extrusion indicating a successful surgical gastroschisis. Moreover, the small intestine of such fetuses showed oedema and inflammation which was biochemically confirmed by the increased levels of MPO. However, gastric muscle from all groups did not show any significant increase in this marker, as would be expected in inflamed tissue [15] and seems to support the hypothesis that inflammation is secondary to amniotic fluid exposure.

There appears to be a general activation of the inflammatory cascades in rat fetal gut involved in gastroschisis [25,26]. Such a cascade may be involved in promoting dysmotility in the exposed intestinal segments. These changes have included a reduction in the frequency and in the amplitude of spontaneous contractions, and an increased response to electrical field stimulation or cholinergic agonists and is probably due to the increased participation of M_3-muscarinic receptors [27] in combination with decreased maturity of the myoenteric plexus and cells of Cajal [7,28]. Our results suggest that changes in cholinergic receptors seem not to occur in the stomach of rat fetuses with gastroschisis.

In conclusion, experimental gastroschisis does not induce neutrophil-mediated inflammation in the stomach and seems to have a preserved contractile response to exogenous administration of CCh. Moreover, future studies need to be performed in other species with longer gestational periods and perhaps incorporating the concept of an additional mechanical intestinal obstruction.

REFERENCES

1. Holland AJ, Walker K, Badawi N: Gastroschisis: an update. Pediatr Surg Int 2010;26:871-878.
2. Bradnock TJ, Marven S, Owen A, et al: Gastroschisis: one year outcomes from national cohort study. BMJ (Clinical research ed) 2011;343:d6749.
3. Sydorak RM, Nijagal A, Sbragia L, et al: Gastroschisis: small hole, big cost. J Pediatr Surg 2002;37:1669-1672.
4. Midrio P, Faussone-Pellegrini MS, Vannucchi MG, et al: Gastroschisis in the rat model is associated with a delayed maturation of intestinal pacemaker cells and smooth muscle cells. J Pediatr Surg 2004;39:1541-1547.
5. Midrio P, Vannucchi MG, Pieri L, et al: Delayed development of interstitial cells of Cajal in the ileum of a human case of gastroschisis. J Cell Mol Med 2008;12:471-478.
6. Santos MM, Tannuri U, Maksoud JG: Alterations of enteric nerve plexus in experimental gastroschisis: is there a delay in the maturation? J Pediatr Surg 2003;38:1506-1511.
7. França WM, Langone F, de la Hoz CLR, et al: Maturity of the myenteric plexus is decreased in the gastroschisis rat model. Fetal Diagn Ther 2008;23:60-68.
8. Baird R, Puligandla P, Skarsgard E, et al: Infectious complications in the management of gastroschisis. Pediatr Surg Int 2011;28:399-404.
9. Tannuri ACA, Sbragia L, Tannuri U, et al: Evolution of critically ill patients with gastroschisis from three tertiary centers. Clinics (Sao Paulo) 2011;66:17-20.
10. Tower C, Ong SSC, Ewer AK, et al: Prognosis in isolated gastroschisis with bowel dilatation: a systematic review. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2009;94:F268-274.
11. Garcia L, Brizot M, Liao A, et al: Bowel dilation as a predictor of adverse outcome in isolated fetal gastroschisis. Prenat Diagn 2010;30:964-969.
12. Alfaraj MA, Ryan G, Langer JC, et al: Does gastric dilation predict adverse perinatal or surgical outcome in fetuses with gastroschisis? Ultrasound Obstet Gynecol 2011;37:202-206.
13. Aina-Mumuney AJ, Fischer AC, Blakemore KJ, et al: A dilated fetal stomach predicts a complicated postnatal course in cases of prenatally diagnosed gastroschisis. Am J Obstet Gynecol 2004;190:1326-1330.
14. Oyachi N, Lakshmanan J, Ross MG, et al: Fetal gastrointestinal motility in a rabbit model of gastroschisis. J Pediatr Surg 2004;39:366-370.
15. Santos CL, Souza MHLP, Gomes AS, et al: Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. Br J Pharmacol 2005;146:481-486.

16. Correia-Pinto J, Tavares ML, Baptista MJ, et al: A new fetal rat model of gastroschisis: development and early characterization. J Pediatr Surg 2001;36:213-216.
17. Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G: Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. Blood 1982;60:618-622.
18. Santiago-Munoz PC, McIntire DD, Barber RG, et al: Outcomes of pregnancies with fetal gastroschisis. Obstet Gynecol 2007;110:663-668.
19. Gregersen H, Hausken T, Yang J, et al: Mechanosensory properties in the human gastric antrum evaluated using B-mode ultrasonography during volume-controlled antral distension. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006;290:G876-882.
20. Garzon B, Ducroc R, Geloso JP: Ontogenesis of gastric response to agonists and antagonists of acid secretion in fetal rat. J Dev Physiol 1982;4:195-205.
21. Gershon MD, Thompson EB: The maturation of neuromuscular function in a multiply innervated structure: development of the longitudinal smooth muscle of the foetal mammalian gut and its cholinergic excitatory, adrenergic inhibitory, and non-adrenergic inhibitory innervation. J Physiol 1973;234:257-277.
22. Gintzler AR, Rothman TP, Gershon MD: Ontogeny of opiate mechanisms in relation to the sequential development of neurons known to be components of the guinea pig's enteric nervous system. Brain Res 1980;189:31-48.
23. Harrington AM, Peck CJ, Liu L, et al: Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon. Neurogastroenterol Motil 2010;22:999-1008,e262-263.
24. Tomomasa T, Hyman PE, Hsu CT, et al: Development of the muscarinic receptor in rabbit gastric smooth muscle. Am J Physiol 1988;254:G680-686.
25. Sbragia L, Schmidt AF, Moraes S, et al: Inflammatory response in a rat model of gastroschisis is associated with an increase of NF-kappaB. Braz J Med Biol Res 2010;43:160-165.
26. Gonçalves FL, de Souza GF, Schmidt AF, et al: Evaluation of Nitric Oxide (NO) and Nitric Oxide Synthases (NOS) in the Amniotic Fluid in an Experimental Gastroschisis Rat Model. Eur J Pediatr Surg 2011;21:362-365.
27. Régis AC, Rojas-Moscoso JA, Gonçalves FLL, et al: The cholinergic response is increased in isolated ileum from gastroschisis rat model. Pediatr Surg Int 2011;27:1015-1019.
28. Langer JC, Bramlett G: Effect of prokinetic agents on ileal contractility in a rabbit model of gastroschisis. J Pediatr Surg 1997;32:605-608.

LEGENDS

Table 1: Morphometric results

Table 2: Contractile variables of smooth muscle behavior in isolated gastric strips from rat fetuses

Figure 1: Comparison of the myeloperoxidase (MPO) activity in intestinal and gastric tissues from rat fetuses

Intestinal tissues of rat fetuses with gastroschisis showed increased values for MPO activity in comparison to control- and sham-group (a). In contrast, no difference on MPO activity was detected on gastric tissues (b). Values are expressed as mean ± SD (*n* = 6–9). *P < 0.01, compared to control and sham groups (*n* = 6–9).

Figure 2 – Effects of the cumulative addition of carbachol on isolated gastric strips of rat fetuses

Typical traces of contractile recordings with isolated strips obtained from antrum (a) or fundus (b) of rat stomach. Experimental recordings were obtained from control rats. Note the differential profile of the CCh-induced responses. While antral strips showed unsustained contractions with pronounced increase in both amplitude and frequency of the spontaneous contractions, fundal strips suffered sustained increase in tonus with discrete changes in other contractile parameters. Calibrations: vertical = 100 mg; horizontal = 5 min.

Figure 3 – Comparison of carbachol-induced responsiveness on isolated antral strips of rat fetuses

Graphs showing the mean values for the force (panel a) or frequency (panel b) of rhythmic smooth muscle contractions recorded in antral strips treated with increasing concentrations of CCh (0.01 - 100 µM). Force was measured as the peak-to-peak amplitude and was expressed as mg/mg of tissue, while frequency is expressed by the number of contractile events/min. Values are expressed as mean ± SEM (*n* = 5 - 6). A two-way ANOVA revealed no statistical difference in the responsiveness to CCh between groups ($P > 0.05$).

Figure 4 – Comparison of the carbachol-induced responsiveness on isolated fundic strips of rat fetuses

Graph showing the mean values for the sustained smooth muscle force of fundic strips treated with increasing concentrations of CCh (0.01 - 100 µM). Force was measured at the peak deflection for each CCh concentration and was expressed as mg/mg of tissue. Values are expressed as mean ± SEM (*n* = 6 - 8). A two-way ANOVA revealed no statistical difference in the responsiveness to CCh between groups ($P > 0.05$).

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 nº 33/08, sobre o projeto intitulado: **"Estudo de mecanismos inflamatórios e alterações de maturação de células intestinais em modelo experimental de gastrosquise em ratos."** de responsabilidade de Antônio 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 27 de agosto de 2008.

Fortaleza, 27 de agosto de 2008

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

ANEXO B

From: **Mark Davenport**
Date: 2012/7/8
Subject: ROME CONGRESS manuscript submission [199]
To: aamelofilho@gmail.com

JOURNAL OF PEDIATRIC SURGERY

Jay L. Grosfeld MD
Editor-in-Chief
J.W. Riley Hospital for Children
702 Barnhill Drive - Suite 2500
Indianapolis, Indiana 46202
Tel: (317) 274-5716
Fax: (317) 274-5777

Mark Davenport ChM FRCS FRCS (Paeds)
Editor for the British Isles,
Kings College Hospital
Denmark Hill,
London. SE5 9RS
Tel: +44 203 299 3350
Fax: +44 203 299 4021

E Mail: markdav2@ntlworld.com

8th July 2012

Dear Dr Filho,

RE: Is gastric contractility changed in experimental gastroschisis? [199]

Thank you for submitting the above manuscript which was presented at this year's BAPS /EUPSA Congress in Rome. The publications committee, which considers papers for the Congress Edition of the Journal of Pediatric Surgery, carefully scrutinized all of the 53 manuscripts which were submitted.

I am delighted to inform you that your paper has been **accepted for publication** in the Congress Edition of the Journal, **providing appropriate revision is undertaken**.

The publications committee felt that you should

1. *Title – can you change this to avoid the question. E.G. "Gastric contractility in experimental gastroschisis."*
2. *Methods*

   a. *Holm Sidak test – unusual choice. Add the actual software package you are using (e.g. SPSS).*
   b. *Brazil or Brasil?*
3. *Results –*
   a. *In text where you say something is significant please put P value.*
4. *Discussion*
   a. *Reduce element of human gastroschisis comparison (P9) – this is in your introduction – concentrate more on pros and cons of experiment (rats vs rabbits for instance).*
   b. *Reduce overall length of section – currently p8 -14 – by about 50%.*

I would be grateful if you can ensure that the revised manuscript reaches me as E Mail attachments no later than the **31st JULY 2013**.

Please note that as deadlines are tight in this year's Congress edition then failure to re-submit satisfactorily will mean rejection and re-entry into the Journal's standard editorial process. The Congress issue of the Journal is due to be published in February 2013.

Thanks you once again for your valuable contribution.

Best wishes,

Yours Sincerely,

Mark Davenport