

FRANCES LILIAN LANHELLAS GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO E TRATAMENTO DAS ALÇAS
INTESTINAIS FETAIS UTILIZANDO HIDROGEL
(BIOMATERIAL) E S-NITROSOGLUTATIONA (GSNO) NO
MODELO EXPERIMENTAL DE GASTROSQUISE**

CAMPINAS

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO E TRATAMENTO DAS
ALÇAS INTESTINAIS FETAIS UTILIZANDO HIDROGEL
(BIOMATERIAL) E S-NITROSOGLUTATIONA (GSNO) NO
MODELO EXPERIMENTAL DE GASTROSQUISE**

Frances Lilian Lanhellas Gonçalves

Tese de doutorado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da
Universidade de Campinas –
UNICAMP para obtenção de
título de Doutora em Ciências,
área de concentração em
Fisiopatologia Cirúrgica. Sob
orientação do Prof. Dr. Lourenço
Sbragia Neto

Campinas
Unicamp
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ROSANA EVANGELISTA
PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

G856a Gonçalves, Frances Lilian Lanhellas, 1979 -
Avaliação da proteção e tratamento das alças
intestinais fetais utilizando hidrogel (biomaterial) e S-
nitrosoglutathione (GSNO) no modelo experimental de
gastrosquise / Frances Lilian Lanhellas Gonçalves. –
Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Lourenço Sbragia Neto
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gastrosquise. 2. Fetos -Anomalias. 3.
Inflamação . 4. Materiais biocompatíveis. 5. Doadores
de óxido. I. Sbragia Neto, Lourenço II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês : Evaluation of protection and treatment of fetal bowel using hydrogel (biomaterial) and S-nitrosoglutathione (GSNO) in the experimental model of gastroschisis.

Palavra-chave em ingles:

Gastroschisis

Fetus-Abnormalities

Inflammation

Biocompatible materials

Nitric oxide donors

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Lourenço Sbragia Neto [Orientador]

Antônio Gonçalves de Oliveira Filho

Sérgio Tadeu Marba

Ana Cristina Aoun Tannuri

José Luiz Martins

Data da defesa: 16-09-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca Examinadora da Defesa de Doutorado

FRANCES LILIAN LANHELLAS GONÇALVES

Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Membros:

1. Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto -

2. Prof. Dr. Antonio Gonçalves de Oliveira Filho -

3. Prof. Dr. Sérgio Tadeu Martins Marba -

2. Prof. Dr. Ana Crsitina Aoun Tannuri -

3. Prof. Dr. José Luiz Martins -

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/09/2011

DEDICATÓRIA

Ao laboratório de Cirurgia Experimental Fetal Michael R. Harrison (UNICAMP) que durante sua existência fez parte da minha vida, pessoal e profissional, sendo meu lugar de “morada” durante muitos dias e de excelentes resultados no árduo trabalho da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À minha fé

À Deus

Que cuidou da minha saúde física e espiritual, me dando força, paz e esperança, me fazendo acreditar que dias melhores sempre estão por vir.

À minha família

Ao meu pai Pedro de Souza Gonçalves, à minha mãe Aldineia Lanhellas Gonçalves e à minha irmã Vivane Mirian Lanhellas Gonçalves

Mesmo diante de tantas dificuldades e momentos difíceis, com um amor incondicional, sempre me apoiaram, me amaram, me fortaleceram e acreditaram em mim. Vocês me ensinaram a lutar e nunca desistir dos meus sonhos.

À Simone Elisabeth Ferreira

Minha amada companheira, pela paciência e amor em todos os meus dias. Obrigada por toda ajuda na organização do laboratório, principalmente nos momentos finais. Você foi fundamental! Que nossa união seja exemplo de superação, respeito, companheirismo e amor, sempre.

A todos que ajudaram no meu doutorado

Ao orientador, Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Pela confiança depositada em mim durante estes seis anos de convívio, permitindo a minha aprendizagem e as minhas idéias um tanto “químicas”, que possibilitaram realizar tantos experimentos novos e desafiadores. Obrigada por me ajudar e por me guiar no caminho da Ciência.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveria

Por permitir o uso constante de seu laboratório do Instituto de Química e pelas constantes reuniões para surgimento de novas idéias, a fim de melhorar a realização do projeto.

À Dra. Regiane da Silva

Uma parceira incansável e importante que me forneceu o biomaterial e o doador de óxido nítrico, ambos fundamentais para a realização do projeto. Obrigada pelos ótimos conselhos e idéias.

À Química Gabriela Freitas Pereira de Souza

Pela fundamental parceria nos testes de quimioluminescência e na discussão dos resultados. Obrigada pelas várias visitas e ajuda durante todo o projeto.

À Dra. Márcia Pereira Bueno

Pelas várias madrugadas em que me ajudou no laboratório para as cirurgias, mesmo que para isso atrasasse seu trabalho. Obrigada por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira e alunos

Por disponibilizar a estrutura do seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

Por disponibilizar a estrutura do seu laboratório e colaboração neste projeto.

À Profa. Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta e alunos

Por permitir o uso de aparelhos para a realização de parte deste trabalho nos finais de semana.

À Pós-graduação e ao Departamento de Cirurgia

Pela atenção prestada e oportunidade para a realização deste trabalho.

À Fapesp e a Capes

A primeira pelo suporte financeiro ao projeto nº 08/51487-9 e a segunda pela bolsa de estudo concedida, que sem ela não seria possível chegar ao fim do meu doutorado.

À Paula Léa, Secretária da Pós-graduação

Pela ajuda, atenção e amizade durante todos esses anos. Apoio fundamental em todos os momentos para a realização do Doutorado e confecção da Tese.

Aos meus amigos

Ao Augusto Frederico Santos Schmidt

Pela sua importante amizade, paciência e companheirismo no laboratório durante todos esses anos. Sua ajuda foi indispensável na realização deste trabalho.

À Carolina Cori Zuliani

Mais do que uma ajuda técnica no laboratório, uma amiga inestimável que sempre me ajudou, não importando qual favor fosse.

À Aline Cristina Régis

Pela amizade, parceria nos experimentos e apoio nos momentos que precisei.

Aos alunos de Iniciação Científica

Carolina Teixeira Resende Barreto, Fábio Santana de Oliveira e Maidane Luisi Pereira Costa Maia pela convivência e parceria nos projetos.

Que a única dor da maternidade se restrinja à dor do parto”

Poeta Eduardo Barreto

" Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida."

Mestre Confúcio

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

	Pag.
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	54
1.1. Aspectos clínicos e fisiológicos da Gastrosquise	55
1.2. Fisiologia do óxido nítrico (NO) e da enzima óxido nítrico sintase (NOS)	58
1.3. Aspectos bioquímicos dos biomateriais	63
2. OBJETIVO	65
2.1. Geral	66
2.2. Específico	66
3. MATERIAL E MÉTODO	67
3.1. Avaliação da Comissão de Ética em Experimentação Animal	68
3.2. Síntese de GSNO	68
3.3. Diluição do GSNO	68
3.4. Preparação do Selante de Fibrina com GSNO	69
3.5. Preparação do Hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc)	69
3.6. Animais	70
3.7. Constituição dos grupos	70
3.8. Esquema de estudo do experimento	72
3.9. Cirurgia	72
3.10. Coleta de dados	78
3.11. Coleta de LA para análise por quimioluminescência	79
3.12. Avaliação morfológica dos intestinos	79
3.13. Processamento para análise morfométrica e imunoistoquímica	80
3.14. Análise da morfometria intestinal	80
3.15. Imunoistoquímica para as enzimas nNOS, iNOS e eNOS.....	81
3.16. Análise semiquantitativa da imunoistoquímica	82
3.17. Extração de proteína total das amostras de intestino para western blotting e Quimioluminescência	82
3.18. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford para western blotting e Quimioluminescência	83
3.19. Expressão das enzimas nNOS, iNOS e eNOS por western blotting	84
3.20. Quantificação de nitrito e nitrato no intestino e no LA por Quimioluminescência	85
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
5. RESULTADO	88
5.1. Análise morfológica	92
5.2. Análise da morfometria intestinal	102
5.3. Análise por imunoistoquímica	118
5.4. Análise por western blotting	124
5.5. Análise por quimioluminescência	127
6. DISCUSSÃO	130
7. CONCLUSÃO	138
7.1. Geral	139
7.2. Específico	139
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
9. APÊNDICES	153

Gastrosquise é um defeito congênito da parede abdominal anterior no qual as alças intestinais ficam herniadas e em contato com o líquido amniótico (LA) cuja exposição crônica resulta em várias disfunções intestinais no período pós-natal. Para reduzir o efeito danoso desta exposição utilizou-se em modelo animal, dosagens diferentes de S-nitrosoglutationa (GSNO), doador de óxido nítrico (NO) e para a concentração mais diluída acrescentou-se o hidrogel de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) copolimerizado com ácido acrílico (Aac) para cobrir as alças fetais expostas fetais afim de avaliar o tratamento com NO e a proteção oferecida pelo biomaterial. A gastrosquise foi induzida cirurgicamente em fetos de ratas com 18,5 dias de gestação. Os fetos foram separados em dez grupos: controle externo (CE), gastrosquise (G), controle interno (CI), Sham (S), gastrosquise + adesivo de fibrina - Beriplast® (GA), gastrosquise + adesivo de fibrina + hidrogel seco (GAH), gastrosquise + GSNO a 50 μ M (GNO1), gastrosquise + GSNO a 5 μ M (GNO2), gastrosquise + GSNO a 0,5 μ M (GNO3), gastrosquise + GSNO a 0,05 μ M (GNO4), gastrosquise + adesivo de fibrina + hidrogel seco + GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4). Com 21,5 dias de gestação, os fetos foram colhidos por cesárea e o hidrogel foi cuidadosamente removido. Ao grupo GNO1 não foi dada continuidade, pois a dosagem foi nociva aos animais. Dados de peso corporal e intestinal foram aferidos e algumas amostras do intestino foram fixadas para estudo histométrico e imunoistoquímico e outras congeladas para western blotting e quimioluminescência. Resultados das medidas morfológicas e histométricas, como peso, diâmetro, espessura das camadas e da parede intestinal, demonstraram que o grau de proteção e tratamento das alças intestinais foi eficaz nos grupos GAH e GAHNO4, pois apresentaram valores significativamente menores, assim como os grupos CE e CI e diferente dos grupos G, GA, GNO2, GNO3 e GNO4 que indicaram processo inflamatório. A expressão das enzimas nNOS, iNOS e eNOS por meio de western blotting e imunoistoquímica diminuiu principalmente nos grupos GAH, GNO4 e GAHNO4 ficando iguais aos grupos CE e CI. A quantificação de nitrato e nitrito (NOx) no intestino e no LA por quimioluminescência nos grupos G, CI e S, mostrou que o NO se difunde do tecido intestinal para o LA, no grupo G e isso pode ser a causa para o aumento da expressão da enzima NOS. Sendo assim, a aplicação do hidrogel aderido pelo adesivo de fibrina mostrou servir como uma efetiva proteção das alças herniadas e o tratamento concomitante com GSNO a 0,05 μ M também ajudou na redução significativa da inflamação na gastrosquise.

ABSTRACT

Gastroschisis is a congenital defect of the anterior abdominal wall in which the herniated bowel is in contact with the amniotic fluid (LA) whose chronic exposure results in several postnatal bowel dysfunction. To reduce the harmful effect of this exposure it was used in an animal model, different doses of S-nitrosoglutathione (GSNO), donor of nitric oxide (NO) and the more dilute concentration was added to the hydrogel of N-isopropylacrylamide (NIPAAm) copolymerized acrylic acid (Aac) to cover the exposed fetal handles in order to assess fetal treatment with NO and the protection offered by the biomaterial. Gastroschisis was surgically induced in fetuses of female *Sprague-Dawley* rats at 18.5 days of gestation. The fetuses were separated into ten groups: external control (CE), gastroschisis (G) internal control (CI), Sham (S), gastroschisis + fibrin adhesive - Beriplast® (GA), gastroschisis + fibrin adhesive + dry hydrogel (GAH), gastroschisis + 50 μ M GSNO (GNO1), gastroschisis + 5 μ M GSNO (GNO2), gastroschisis + 0.5 μ M GSNO (GNO3), gastroschisis + 0.05 μ M GSNO (GNO4), gastroschisis + fibrin adhesive + dry hydrogel + 0.05 μ M GSNO (GAHNO4). On day 21.5 of gestation, fetuses were collected by cesarean section and the hydrogel was carefully removed. The group GNO1 was not given continuity, because the dosage was harmful to the animals. Data of body weight and intestinal samples were measured and some intestinal samples were fixed for immunohistochemical and histometric study and the others were frozen for western blotting and chemiluminescence. Results of morphological and histometric measures such as weight, diameter and thickness of the intestinal wall, showed that the degree of protection and treatment of bowel was effective in groups GAH and GAHNO4 because they showed significantly lower values, as well as groups CE and CI and different from groups G, GA, GNO2, GNO3 and GNO4 that indicated inflammatory process. The expression of nNO, iNOS and eNOS enzymes by western blotting and immunohistochemistry decreased especially in groups GAH, GNO4 and GAHNO4, getting the same results as the CE and CI groups. Quantification of nitrate and nitrite (NO_x) by chemiluminescence in the bowel and LA of groups G, S and CI showed that NO diffused from the intestinal tissue to LA in the group G and this may be the cause for the increased expression of the NOS enzymes. Therefore, the application of hydrogel joined by fibrin adhesive showed an effective protection of the herniated bowel and concomitant treatment with GSNO at 0.05 μ M, also helped in significant reduction in inflammation in gastroschisis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAc	Ácido acrílico
BH4	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina de soro bovino
CE	Controle Externo
CI	Controle Interno
Ca ²⁺	Cálcio
CaM	Calmodulina
Cl ⁻	Cloro
CMC	Camada Muscular Circular
CML	Camada Muscular Longitudinal
CMS	Camadas Mucosa e Submucosa
co	Copolímero
DE-I, DE-II, DI-I e DI-II	Medida dos diâmetros intestinais externos e internos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ETP	Espessura Total da Parede
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
Fe ²⁺	Íon ferro reduzido
Fe ³⁺	Íon ferro oxidado
FMN	Flavina mononucleotídeo
G	Gastrosquise
GA	Gastrosquise + Adesivo de Fibrina
GAH	Gastrosquise + Adesivo de Fibrina + Hidrogel
GNO1	Gastrosquise + aplicação de GSNO a 50 µM
GNO2	Gastrosquise + aplicação de GSNO a 5 µM
GNO2C	Controle do feto Gastrosquise + aplicação de GSNO a 5 µM
GNO3	Gastrosquise + aplicação de GSNO a 0,5 µM
GNO3C	Controle do feto Gastrosquise + aplicação de GSNO a 0,5 µM
GNO4	Gastrosquise + aplicação de GSNO a 0,05 µM
GNO4C	Controle do feto Gastrosquise + aplicação de GSNO a 0,05 µM

GAHNO4	Gastrosquise + Adesivo de Fibrina + Hidrogel + aplicação de GSNO a 0,05 µM
GAHNO4C	Controle do feto Gastrosquise + Adesivo de Fibrina + Hidrogel + aplicação de GSNO a 0,05 µM
GSH	Glutationa
GSNO	S-nitrosoglutationa
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
H/E	Hematoxilina de Erlich/Eosina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
K ⁺	Potássio
L-NAME	NG-nitro-L-arginina éster metílico
LA	Líquido amniótico
MBAAm	N,N-metileno-bisacrilamida
N ₂	Gás nitrogênio
Na ⁺	Sódio
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida
Na ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de sódio
NG	Aminoguanidina
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOH-Arg	NG-hidroxi-L-arginina
NO _x	Quantidade de nitrito e nitrato
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
O ₃	Ozônio
⁻ OONO	Peroxinitrito

PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato)
PC	Peso corporal fetal
PI	Peso intestinal
RSNOs	Nitrosotióis
S	Sham
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SE	Serosa
TEMED	N,N,N-Tetrametilenodiamina
TBS	Tris-Buffered Saline (Tampão Tris)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

LISTA DE NOTAÇÕES

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
°C	Grau Celcius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
cm	Centímetro
Da	Dalton (g/mol)
G	(Gauge) Calibre de agulha
g	Gramma
h	Hora
$h\nu$	Fóton
Kg	Quilograma
L	Litro
μg	Micrograma
μM	Micromolar
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mm	Milimetro
mM	Milimolar
mmol L ⁻¹	Milimoles por litro
mol	Quantidade de matéria
nm	Nanômetros
pH	Potência de Hidrogênio
pKa	- Log na base 10 da constante de acidez
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
V	Volt
x	vezes

LISTA DE FÓRMULAS

	Pág.
Equação 1	58
Equação 2	59
Equação 3	85
Equação 4	85

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Esquema de Estudo do Experimento.....	72

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 – Estrutura química dos aminoácidos envolvidos na formação do NO. As representações gráficas para cada composto estão representadas pela mesma cor do nome e abaixo de cada formula	60
Figura 2 – Formação de NO pelas enzimas nNOS e eNOS, dependentes de cálcio. No citosol, o doador de elétrons NADPH libera um elétron no Domínio Redutase da NOS, liberando NADP⁺. O elétron é conduzido passando pelas flavinas FAD e FMN, pela Calmodulina contendo íons Ca²⁺ ligados até seu destino final, o Domínio Oxidase, onde o grupo heme contendo Fe³⁺ será reduzido a Fe²⁺. O oxigênio molecular é clivado em dois átomos de oxigênio, no qual um dará origem a água e o outro se liga a porção guanidínica do aminoácido L-arginina (vermelho), formando o composto intermediário NOH-Arg (azul) que ao se ligar novamente a um oxigênio molecular, dará origem ao NO, H₂O e L-citrulina (lilás)	61
Figura 3 – Em A, fotografia da rata <i>Sprague-Dawley</i> prenha já anestesiada para início do procedimento cirúrgico. Em B, fotografia do útero bicornio exposto	75
Figura 4 – Seqüência para coleta dos fetos no útero, sendo cada figura representante de uma rata diferente. (A) rata controle que não sofre intervenção cirúrgica. (B) tríade formada pelos grupos G, C e S. (C – D) fetos de ratas que receberam biomateriais e GSNO, sendo C e D, adesivo de fibrina e hidrogel; E, F, G e H, dosagens diferentes de GSNO e I, adesivo de fibrina, hidrogel e GSNO juntos no mesmo feto	76
Figura 5 – Procedimento cirúrgico realizado com 18,5 dias de gestação. (A) Exposição do feto após abertura da cavidade uterina, (B) incisão à direita do cordão umbilical, (C) exposição das alças intestinais como na gastrosquise (Grupo G), (D) aplicação do adesivo de fibrina Beriplast[®] e/ou GSNO (Grupos GA, GAH, GNO1, GNO2, GNO3 e GNO4), (E) aplicação do hidrogel seco (Grupo GHNO4) e (F) adesão e intumescimento do hidrogel	77

Figura 6 – Em A, fotografia da dissecação do intestino desde o piloro ao reto. Em B, fotografia da balança analítica, onde foram medidos todos os pesos corporais em gramas (PC) de todos os fetos estudados, e também a pesagem sobre papel alumínio do intestino dissecado (PI) 79

Figura 7 – Esquema das medidas em cortes histológicos transversais de intestino para a análise estatística. Em A, aumento de 20x para medida dos diâmetros, observando que no D-I e D-III é desde a serosa e em D-II e D-IV é desde a mucosa. Em B, aumento de 200x para medida das camadas, sendo 1- Serosa, 2 – Muscular Longitudinal, 3 – Muscular Circular, 4 – Submucosa e mucosa e 5 – Espessura total da parede 81

Figura 8 – Fotografias de alguns exemplares de intestinos de fetos de rato retirados do útero materno com 21,5 dias de gestação. A – Exemplo de intestino dos fetos dos grupos CE e CI; B – Exemplo de intestino dos fetos dos grupos G e GA; C – Exemplo de intestino dos fetos do grupo GNO4; D – Exemplo de intestino dos fetos dos grupos S, GAH e GAHNO4. E - Exemplo de intestino dos fetos dos grupos GA, GNO2 e GNO3. F – Hidrogel intumescido após ser retirado do intestino. Nota-se inflamação mais intensa nos grupos representados pela figura 5B e 5E 90

Figura 9 – Fotografia dos fetos de rato após a cesárea com 21,5 dias de gestação. A – Feto do grupo GNO4 com intestino exposto. B – Intestino do grupo GNO4 não muito inflamado, mesmo após exposição ao LA. C – Feto do grupo G com o intestino totalmente inflamado e ao seu lado o feto do grupo GAH com o intestino ainda coberto pelo hidrogel. D – Dissecação do feto do grupo GAH expondo o intestino que não apresenta inflamação das alças 91

Figura 10 – Fotomicrografia dos diâmetros dos intestinos dos fetos dos dez grupos. A – Controle Externo (CE); B – Gastrosquise (G); C – Controle Interno (CI); D – Sham (S); E – Gastrosquise e adesivo (GA); F – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); G – Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2); H - Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3); I - Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4); J – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4). Nota-se que os intestinos dos fetos dos grupos G, GA e GNO2 são maiores que dos outros grupos, enquanto que os grupos GAH, GNO4 e GAHNO4

	Pag.
apresentam diâmetro menor igual aos grupos CE e CI. Barra de 200 μm	107
Figura 11 – Fotomicrografia das paredes intestinais dos fetos dos dez grupos. A – Controle Externo (CE); B – Gastrosquise (G); C – Controle Interno (CI); D – Sham (S); E – Gastrosquise e adesivo (GA); F – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); G – Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2); H – Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3); I – Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4); J – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4). As paredes dos grupos GAH e GAHNO4 são iguais dos grupos CE e CI. Barras de 30 μm	109
Figura 12 – Fotomicrografia da vilosidade intestinal e da camada serosa na G. A – Vilosidade intestinal evidenciando o epitélio prismático (*) e o tecido conjuntivo com hemáceas (seta). B – Epitélio de revestimento possui as células com bordas estriadas, constituídas por microvilos para aumentar a absorção (seta). C – Célula caliciforme em evidência (setas). D – Na G, a camada serosa é a primeira que aumenta em espessura (seta). Barra de 10 μm	112
Figura 13 – Imunoistoquímica para análise da expressão de nNOS nos grupos estudados. A – Controle Externo (CE); B – Gastrosquise (G); C – Controle Interno (CI); D – Sham (S); E – Gastrosquise e adesivo (GA); F – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); G – Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2); H – Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3); I – Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4); J – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4). Barra de 30 μm	119
Figura 14 – Imunoistoquímica para análise da expressão de iNOS nos grupos estudados. A – Controle Externo (CE); B – Gastrosquise (G); C – Vilosidade intestinal em evidência mostrando a forte imunomarcção na Gastrosquise; D – Controle Interno (CI); E – Sham (S); F – Gastrosquise e adesivo (GA); G – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); H – Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2); I – Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3); J – Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4); K – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4); L – Vilosidade intestinal em evidência mostrando a fraca marcação no grupo GAHNO4. Barra de 30 μm	121
Figura 15 – Imunoistoquímica para análise da expressão de eNOS nos grupos estudados. A – Controle Externo (CE); B – Gastrosquise (G); C – Controle	

Interno (CI); D – Sham (S); E – Gastrosquise e adesivo (GA); F – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); G – Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2); H - Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3); I - Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4); J – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4). Barra de 30 μ m	123
Figura 16 – Análise da expressão de nNOS por Western blotting para todos os grupos estudados. A tríade formada por G, CI e S correu separadamente em outro gel, porém no mesmo dia, na mesma cuba e nas mesmas condições	124
Figura 17 – Análise da expressão de iNOS por Western blotting para todos os grupos estudados. A tríade formada por G, CI e S correu separadamente em outro gel, porém no mesmo dia, na mesma cuba e nas mesmas condições	125
Figura 18 – Análise da expressão de eNOS por Western blotting para todos os grupos estudados. A tríade formada por G, CI e S correu separadamente em outro gel, porém no mesmo dia, na mesma cuba e nas mesmas condições	126

Gráfico 1 – Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4C) e Controle do feto com Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4C), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. * ($p < 0,05$), # ($p < 0,001$) 93

Gráfico 2 – Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4C) e Controle do feto com Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4C), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. ** ($p < 0,01$), # ($p < 0,001$) 94

Gráfico 3 – Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4C) e Controle do feto com Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4C), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$) 95

Gráfico 4 – Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos.

	Pag.
Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$)	98
Gráfico 5 – Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. ** ($p < 0,01$) # ($p < 0,001$)	99
Gráfico 6 – Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. * ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$) # ($p < 0,001$)	100
Gráfico 7 – Diâmetro Externo I, em μm , em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$)	103
Gráfico 8 – Diâmetro Externo II, em μm , em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$)	104

Gráfico 9 – Diâmetro Interno I, em μm , em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$)	105
Gráfico 10 – Diâmetro Interno II, em μm , em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$)	106
Gráfico 11 – Espessura, em μm , da parede intestinal em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$)	110
Gráfico 12 – Espessura, em μm , da camada serosa em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$)	111
Gráfico 13 – Espessura, em μm , da camada muscular longitudinal em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05	

μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. ** ($p < 0,01$) # ($p < 0,001$)	113
Gráfico 14 – Espessura, em μm , da camada muscular circular em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$)	114
Gráfico 15 – Espessura, em μm , das camadas submucosa e mucosa juntas em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$)	115
Gráfico 16 – Intensidade de marcação, expressa em valores arbitrários das médias, da expressão de nNOS em imunoistoquímica para os fetos dos grupos: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4)	118
Gráfico 17 – Intensidade de marcação, expressa em valores arbitrários das médias, da expressão de iNOS em imunoistoquímica para os fetos dos grupos: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4)	120
Gráfico 18 – Intensidade de marcação, expressa em valores arbitrários das médias, da expressão de eNOS em imunoistoquímica para os fetos dos grupos: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S),	

Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4)	122
---	-----

Gráfico 19 – Valores das medias de densidade ótica das bandas de western blotting para nNOS de todos os grupos estudados: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4)	125
--	-----

Gráfico 20 – Valores das medias de densidade ótica das bandas de western blotting para iNOS de todos os grupos estudados: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4)	126
--	-----

Gráfico 21 – Valores das medias de densidade ótica das bandas de western blotting para eNOS de todos os grupos estudados: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4)	127
--	-----

Gráfico 22 – Quantificação de NOx no intestino por Quimioluminescência dos grupos G ,CI e S, com desvio padrão e diferença estatística. * p < 0,05	128
---	-----

Gráfico 23 – Quantificação de NOx no LA por Quimioluminescência dos grupos G ,CI e S, com desvio padrão e diferença estatística. # p < 0,001	128
---	-----

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 – Resumo das principais características das três isoformas de NOS	59
Tabela 2 – Diluição da curva de calibração com BSA para análise da concentração de proteínas pelo método de Bradford (84)	83
Tabela 3 – Distribuição dos valores de PC, PI e da relação PI/PC para os grupos CE, CI, G e todos os controles dos grupos com diferentes dosagens de GSNO, expressos por médias $\pm$ desvio-padrão. PC: Peso Corporal; PI: Peso Intestinal; PI/PC: relação de Peso Intestinal pelo Peso Corporal; CE: Controle Externo; G: Gastrosquise; CI: Controle Interno; GNO2C: feto vizinho ao feto operado (Gastrosquise + 5 μ M de GSNO); GNO3C: feto vizinho ao feto operado (Gastrosquise + 0,5 μ M de GSNO); GNO4C: feto vizinho ao feto operado (Gastrosquise + 0,05 μ M de GSNO); GAHNO4C: feto vizinho ao feto operado (Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel + 0,05 μ M de GSNO)	96
Tabela 4 – Distribuição dos valores de PC, PI e da relação PI/PC para todos os grupos de estudo, expressos por médias $\pm$ desvio-padrão. PC: Peso Corporal; PI: Peso Intestinal; PI/PC: relação de Peso Intestinal pelo Peso Corporal; CE: Controle Externo; G: Gastrosquise; CI: Controle Interno; S: Sham; GA: Gastrosquise + Adesivo; GAH: Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel; GNO2: Gastrosquise + 5 μ M de GSNO; GNO3: Gastrosquise + 0,5 μ M de GSNO; GNO4: Gastrosquise + 0,05 μ M de GSNO; GAHNO4: Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel + 0,05 μ M de GSNO	101
Tabela 5 – Distribuição dos valores de DE-I, DE-II, DI-I, DI-II, ETP, SE, CML, CMC e CMS para todos os grupos de estudo, expressos por médias $\pm$ desvio-padrão. CE: Controle Externo; G: Gastrosquise; CI: Controle Interno; S: Sham; GA: Gastrosquise + Adesivo; GAH: Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel; GNO2: Gastrosquise + 5 μ M de GSNO; GNO3: Gastrosquise + 0,5 μ M de GSNO; GNO4: Gastrosquise + 0,05 μ M de GSNO; GAHNO4: Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel + 0,05 μ M de GSNO; DE-I: Diâmetro Externo I; DI-I: Diâmetro Interno I; DE-II: Diâmetro Externo II; DI-II: Diâmetro Interno 2; ETP: Espessura Total da Parede; SE: Serosa; CML: Camada Muscular Longitudinal; CMC: Camada Muscular Circular; CMS: Camadas Mucosa e Submucosa	116

Tabela 6 - Distribuição dos valores de quantificação de NOx no intestino e no LA de fetos de ratos dos grupos G, CI e S, expressos por médias $\pm$ desvio-padrão. G: Gastrosquise; CI: Controle Interno; S: Sham	129
Tabela 7 - Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g) e Relação Peso Intestinal/Peso Corporal para os 14 grupos comparados ..	155
Tabela 8 - Resultado das aferições do Diâmetro externo I (μ m), Diâmetro interno I (μ m), Diâmetro externo II (μ m), Diâmetro interno II (μ m) para os dez grupos estudados	160
Tabela 9 - Resultado das aferições das camadas serosa, muscular longitudinal, muscular circular, submucosa e mucosa e parede total intestinal, em μ m, para os dez grupos estudados	164
Tabela 10 – Resultado da análise semiquantitativa da imunomarcacão para nNOS dos dez grupos estudados. 0 = negativo; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte	170
Tabela 11 – Resultado da análise semiquantitativa da imunomarcacão para iNOS dos dez grupos estudados. 0 = negativo; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte	171
Tabela 12 – Resultado da análise semiquantitativa da imunomarcacão para eNOS dos dez grupos estudados. 0 = negativo; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte	172

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos clínicos e fisiológicos da Gastrosquise

A gastrosquise é um defeito congênito da parede abdominal caracterizado por um pequeno orifício, geralmente localizado à direita do umbigo, que permite a herniação e exposição permanente das alças intestinais ao líquido amniótico (LA) e seus componentes durante a gestação (1,2).

A exposição permanente das alças ao LA e seus componentes causa alterações da morfologia e da histologia da parede intestinal que leva à hipomotilidade intestinal e deficiência na absorção dos nutrientes (3,4,5). A hipomotilidade e a deficiência absorptiva intestinal, por sua vez, obrigam a utilização de nutrição parenteral prolongada e elevam a possibilidade de ocorrer complicações pós-operatórias, o que aumenta a morbidade, a mortalidade e o custo do tratamento médico-hospitalar (6,7).

A gastrosquise acontece devido a uma falha no retorno das alças intestinais ainda embrionárias para dentro da cavidade abdominal quando esta inicia seu fechamento. No embrião, o intestino médio sofre um alongamento rápido por volta da 5ª semana de gestação, principalmente da porção cefálica (duodeno), resultando na formação da alça intestinal primária que penetra no celoma extra-embriônico durante a 6ª semana de gestação, comunicando-se com o saco vitelino através do ducto vitelino. Ao mesmo tempo em que a alça se alonga, ela gira no sentido anti-horário em torno do eixo da artéria mesentérica superior, dando origem aos cólons com o ceco que irá se posicionar à direita no abdome. Por fatores ainda desconhecidos, as alças intestinais herniadas começam a voltar para a cavidade abdominal por volta da 10ª semana, mas podem escapar por meio de uma fraqueza na parede localizada à direita do umbigo devido à falha da migração das células musculares provenientes de miótomos dorsais nesta região. Quando ocorre falha no retorno das alças intestinais para a cavidade abdominal, a rotação anti-horária é incompleta e as alças permanecem exteriorizadas em contato direto com o LA o que define embriologicamente o defeito que é a gastrosquise (1).

Apesar da etiologia da gastrosquise ser ainda desconhecida (8,9,10), alguns autores sugerem que ela ocorreria por uma regressão ou lesão precoce de uma das artérias onfalomesentéricas na fase embrionária, quando estas artérias ligam o saco vitelínico à aorta dorsal (11).

Outras malformações vasculares, como: involução da veia umbilical direita, interrupção do ramo terminal da artéria mesentérica superior e/ou ruptura do cordão umbilical intra-útero também são apontadas como causas da gastrosquise. Alterações genéticas (grupos familiares com padrão de herança autossômica, de expressão variável), teratogênicas (radiação na fase de implantação), e drogas como o ácido acetilsalicílico, a pseudoefedrina, o acetaminofen e o tabagismo, estariam também envolvidas na sua etiologia (12,13).

A gastrosquise ocorre em 1:5.000 a 1:10.000 nascidos vivos, acomete mais meninos que meninas numa proporção aproximada de 2:1 (6,8,13,14) e incide mais em fetos de mães com idade abaixo dos 20 anos de baixa condição sócio-econômica, baixa escolaridade, associada à história obstétrica de aborto e curto intervalo de tempo entre a menarca e primeira gravidez (12,15).

A taxa de mortalidade da gastrosquise varia de 4 a 22 % mas pode chegar a 28 % quando associada à atresia intestinal ou perfuração e a 100 % quando ocorre volvo do intestino médio (12,16,17,18). Em geral, nos países desenvolvidos onde há uma grande quantidade de unidades de terapia intensiva pediátrica e neonatal e boa assistência pré-natal, a mortalidade vem diminuindo com taxas de 5 a 10 %, já no Brasil a mortalidade passou de 52 %, taxa considerada muito alta e explicada pelas baixas condições de atendimento perinatal principalmente (11,19,20). Porém, um estudo realizado em três centros universitários no Brasil verificou que a taxa de sobrevivência é alta, cerca de 85,9%, após cirurgia de fechamento da gastrosquise e seria melhor se houvesse maior atenção aos distúrbios metabólicos e hidroeletrólíticos (21).

A gastrosquise raramente está associada a alterações cromossômicas, mas associada a alterações anatômicas, especialmente às atresias intestinais e malformações cardíacas, que vem aumentando em incidência (13). Outras associações menos frequentes são ainda a criptorquidia, a hipospádia e as deformidades dos membros inferiores (8).

Gastrosquise pode ser diagnosticada no período pré-natal por meio da ultra-sonografia, sendo possível visualizar as alças intestinais na cavidade amniótica por volta da 18ª semana (16,22,23) e tendo como possíveis diagnósticos diferenciais a onfalocele, a extrofia vesical ou cloacal (12).

A necessidade de repetidas cirurgias e o tempo de internação hospitalar agravam o quadro, colaborando com o aumento das taxas globais de morbidade (24,25). Nas últimas décadas, a chance de sobrevivência dos neonatos portadores de gastrosquise vem aumentando

devido a três fatores: 1) criação de unidades de terapia intensiva neonatal; 2) desenvolvimento de avanços em nutrição parenteral e; 3) utilização de novas drogas anestésicas que possibilitaram uma melhor estabilidade hemodinâmica e respiratória durante o ato cirúrgico (26).

Há aproximadamente 40 anos, alguns autores (27) idealizaram a utilização de prótese de silicone em formato cilíndrico (silo), que seria ordenhada progressivamente, direcionando o conteúdo intestinal de volta à cavidade abdominal. Posteriormente, o tratamento preconizado, utilizado ainda atualmente para os neonatos com gastrosquise, é o fechamento primário do defeito, imediatamente após o parto (25,28). No entanto, existem casos onde o volume das alças intestinais é muito superior à cavidade abdominal. Consequentemente, o fechamento primário não é indicado, pois acarreta grandes transtornos respiratórios e hemodinâmicos (29).

A fisiopatologia dos mecanismos de lesão da parede intestinal na gastrosquise fetal ainda não está completamente esclarecida, sabe-se que o tempo de exposição das alças intestinais ao LA é um dos fatores freqüentemente considerados na origem do dano causado às alças intestinais fetais (15,22,30).

Inicialmente, a lesão da parede intestinal da doença era atribuída exclusivamente à presença de urina no LA, pois uma série dos componentes urinários como glicose, proteínas, eletrólitos (Na^+ , Cl^- e K^+), uréia, creatinina, além de fosfatase alcalina e lactase poderiam ter uma ação tóxica direta sobre as alças (31,32,33,34). No entanto, outros autores comprovaram que a lesão das alças intestinais é consequência do contato das alças com o mecônio no LA e não da urina (35,36,37).

O contato do intestino com o LA e seus componentes leva à formação de uma fina camada de fibrina (*fibrous peel ou fibrous coating*) sobre a camada serosa das alças intestinais (38,39) e espessamento das outras camadas da parede que acaba causando encurtamento e edemaciando o intestino (4,5,34,40). Estas alterações da estrutura de crescimento do órgão comprometem a organização, a distribuição e o grau de maturidade dos gânglios e plexos mioentéricos (41,42) com conseqüente hipomotilidade intestinal prolongada. Devido a isso, tem sido proposto por alguns autores, a antecipação do parto, em detrimento dos riscos da prematuridade, a fim de minimizar o dano causado às alças intestinais, apesar de não ser frequente (43,44,45).

Vários modelos de experimentação animais vêm sendo descritos para avaliar as alterações histológicas e fisiopatológicas do intestino fetal na gastrosquise: ovelhas (40,46), coelhas (47),

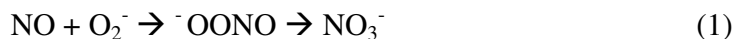
ratas (48), e embriões de aves (4,49). O modelo em ratos tem várias vantagens, pois o rato apresenta curto período gestacional (termo=22 dias), oferece maior número de fetos por gestação além de ser de baixo custo na aquisição e manutenção (48).

1.2. Fisiologia do óxido nítrico (NO) e da enzima óxido nítrico sintase (NOS)

Um dos mecanismos envolvidos nas alterações das alças intestinais na gastrosquise está relacionado ao óxido nítrico (NO) e a sua enzima óxido nítrico sintase (NOS). No modelo experimental de gastrosquise em coelhos (47) e em embriões de galinha (4), o aumento da atividade da NOS está relacionada à piora do aspecto inflamatório da alça e a sua diminuição está relacionada à melhora das alças intestinais.

O NO é um radical livre gasoso, altamente tóxico, constituindo uma molécula pequena, com vida muito curta (de 6 a 10 segundos), pouco solúvel em água e eletricamente neutra, o que possibilita atravessar a membrana plasmática por difusão simples e também percorrer distâncias surpreendentes a partir da célula que a produz, antes da sua inativação (50,51,52). O NO não necessita de um receptor específico, nem de um canal protéico, estando livre para transitar e atuar em diversos sítios. Devido a tais características, é uma molécula adequada para atuar como sinalizador intracelular e entre células vizinhas (50).

Por ser uma espécie radicalar, o NO é capaz de reagir rapidamente com outros radicais biológicos, como oxigênio molecular e superóxido (O_2^-). A reação com o O_2^- é uma das mais significantes, sendo o peroxinitrito ($^{\cdot}OONO$) o produto desta reação, que é um potente oxidante, capaz de oxidar tióis, bases de DNA e destruir componentes celulares críticos. A meia-vida do $^{\cdot}OONO$, sob condições fisiológicas, é aproximadamente 1 segundo, decompondo-se espontaneamente para produzir nitrato (NO_3^-), conforme reação abaixo (53):



Outra reação, na fase gasosa, que pode ocorrer *in vivo* é a oxidação do NO resultando na produção de duas moléculas de outro radical paramagnético, o dióxido de nitrogênio (NO_2):



Muitas células são capazes de sintetizar o NO através de hemoproteínas da família citocromo P450-like, chamadas de NO sintases (NOS). As NOS estão presentes no citosol e são dependentes de O₂, NADPH, flavinas e biopterinas para exercer sua atividade. Até o momento, foram isoladas e clonadas três isoenzimas, sendo duas constitutivas em determinadas células e uma induzível, recebendo as siglas respectivas de cNOS e iNOS. Todas as três isoenzimas são semelhantes estruturalmente, sendo homodiméricas, com pesos moleculares variando de 130.000 a 150.000 Da. Elas possuem um domínio Redutase, no qual ligam-se os cofatores NADPH, FAD e FMN e outro domínio Oxidase, no qual ligam-se o grupo heme, o aminoácido L-arginina e a tetrahydrobiopterina (BH₄). Ligando os dois, há a região aonde se liga a Calmodulina (54). Porém, elas são reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (isoforma I), 12 (isoforma II) e 17 (isoforma III) (55).

A isoforma I ou óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) é constitutiva, cálcio-calmodulina dependente e está presente em neurônios, células epiteliais, Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Periférico e outros. A isoforma II ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é uma NOS induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular. Não é regulada por cálcio. Produz grande quantidade de NO que tem efeito citostático por inibição de enzimas contendo ferro, também causando fragmentação de DNA. Atua em parasitas e células tumorais. Já a isoforma III ou óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é constitutiva, cálcio-calmodulina dependente e produz NO em endotélio vascular sob condições basais (54). A tabela 1 resume as principais características das três isoformas.

Tabela 1 – Resumo das principais características das três isoformas de NOS.

	NOS I (nNOS)	NOS II (iNOS)	NOS III (eNOS)
Tipos	Neuronal	Induzível	Endotelial
Descoberta	Neurônios	Macrófagos	Céls. Endoteliais
Expressão	Constitutiva	Induzida	Constitutiva
Regulação	Dependente de Cálcio	Independente de Cálcio	Dependente de Cálcio
Síntese	Baixa, intermitente	Alta, contínua	Baixa, intermitente

Em células de mamíferos, o NO é gerado a partir da conversão do aminoácido L-arginina para L-citrulina pela NOS (56,57). A síntese de NO ocorre através de uma reação em dois passos formando o intermediário, NG-hidroxi-L-arginina (NOH-Arg) e posteriormente, através da oxidação deste, são produzidos NO e L-citrulina (Figura 1).

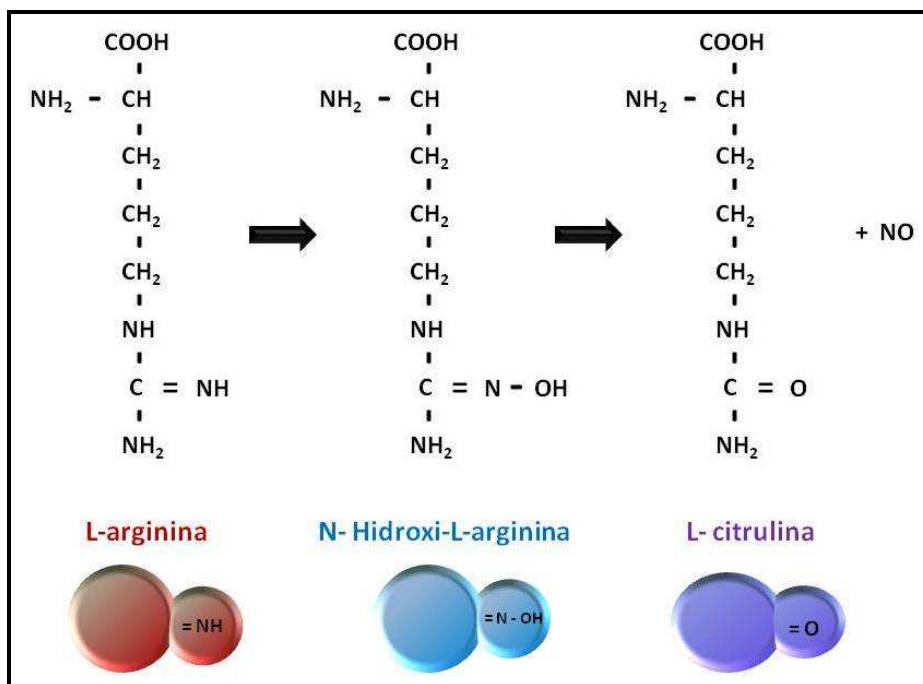


Figura 1 – Estrutura química dos aminoácidos envolvidos na formação do NO. As representações gráficas para cada composto estão representadas pela mesma cor do nome e abaixo de cada fórmula.

Esta reação ocorre com a participação de co-fatores redox necessários para a atividade da NOS (58,59), tais como: 1) NADPH, que é o verdadeiro doador de elétrons da reação; 2) FAD e FMN, cofatores que canalizam os elétrons do NADPH para o grupamento heme, onde o ferro reduzido pela transferência de um elétron vindo do NADPH se liga ao oxigênio molecular, que é então clivado, liberando um átomo de oxigênio como água, sendo o outro incorporado em um dos nitrogênios guanidínicos terminais da arginina para produzir o intermediário NOH-Arg; em seguida, a ativação de outra molécula de oxigênio facilita a oxidação do NOH-Arg, produzindo água, NO e L-citrulina; 3) calmodulina (CaM), que tem o papel de desencadear a transferência de

elétrons das flavinas para o grupo heme e finalmente 4) tetrahydrobiopterina (BH_4), com função ainda pouco esclarecida, mas de grande importância para a catálise da reação de síntese de NO (60) (Figura 2).

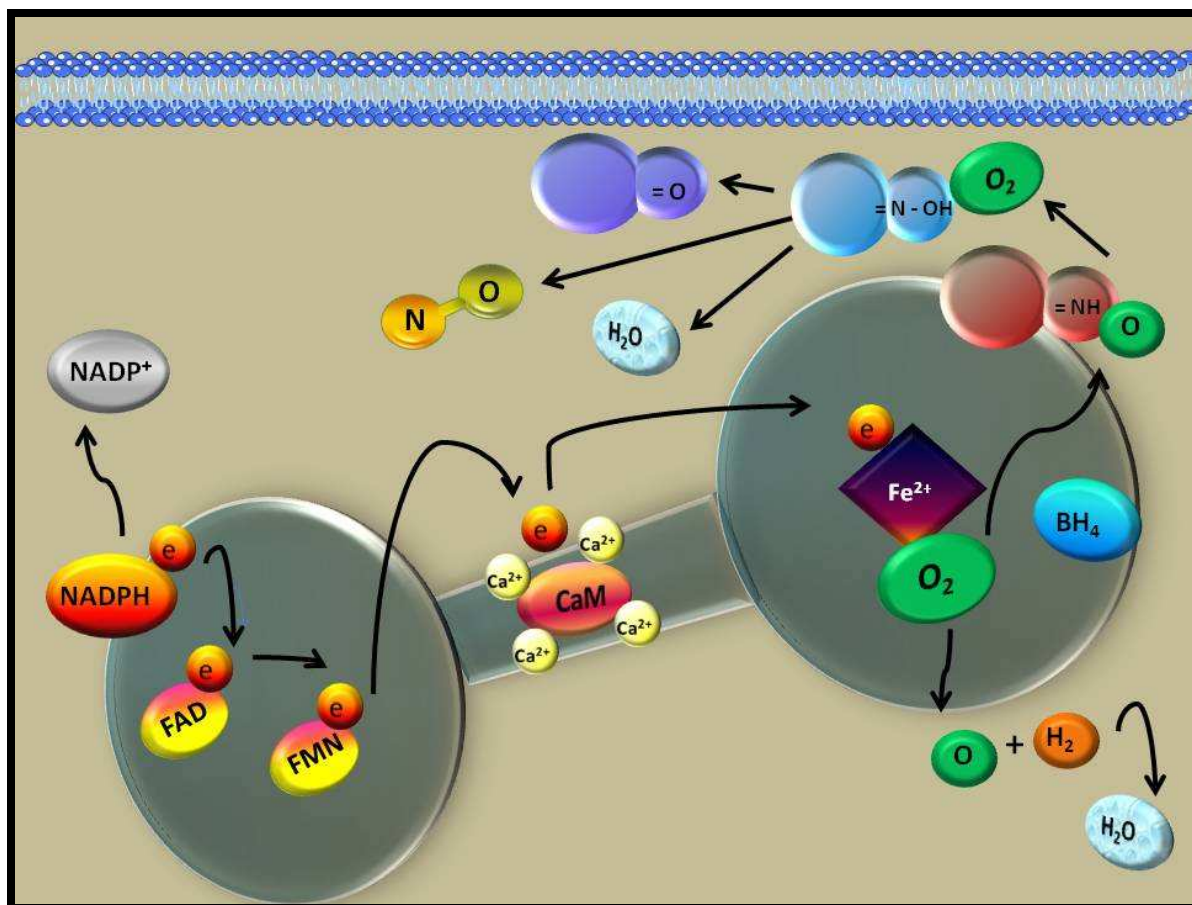


Figura 2 – Formação de NO pelas enzimas nNOS e eNOS, dependentes de cálcio. No citosol, o doador de elétrons NADPH libera um elétron no Domínio Redutase da NOS, liberando NADP^+ . O elétron é conduzido passando pelas flavinas FAD e FMN, pela Calmodulina contendo íons Ca^{2+} ligados até seu destino final, o Domínio Oxidase, onde o grupo heme contendo Fe^{3+} será reduzido a Fe^{2+} . O oxigênio molecular é clivado em dois átomos de oxigênio, no qual um dará origem a água e o outro se liga a porção guanidínica do aminoácido L-arginina (vermelho), formando o composto intermediário NOH-Arg (azul) que ao se ligar novamente a um oxigênio molecular, dará origem ao NO, H_2O e L-citrulina (lilás).

NO é uma molécula endógena importante na regulação do tônus vasomotor, nas interações com parede de vasos, na replicação de células musculares lisas e na resposta imune (61). Ela é vital na fisiologia gastrointestinal normal e importante na modulação da permeabilidade da mucosa e na motilidade de músculos lisos, sendo crítico para a viabilidade de células epiteliais no sistema (47).

Ele pode agir benéficamente (mensageiro) e maleficamente (toxina). Como mensageiro, ele pode agir no fluxo sanguíneo (tamponamento de ácidos e diluição de toxinas), no peritálismo, na secreção exócrina, como antimicrobiano (ativação de iNOS por macrófagos – *Helicobacter pylori*), na proteção da mucosa (efeito antiinflamatório pela inibição de mastócitos), como antiparasitário e no impedimento de lesões celulares por radicais livres. Como toxina, pode provocar danos na mucosa (hemorragia digestiva), mutagênese e superexpressão da iNOS (diminuição do transporte de eletrólitos) (62,63).

A simplicidade da estrutura química do NO sugere que ela seja um agente terapêutico promissor com efeitos biológicos que podem depender da sua concentração, dos seus sítios de recepção e de suas fontes de produção (64).

Doadores de NO para fins terapêuticos vêm sendo cada vez mais estudados em pacientes e um exemplo bem conhecido da sua utilização são os compostos nitrosotióis (RSNOs), que são mais estáveis que o NO e são metabólitos endógenos de NO detectados no meio intra e extra celular e apresentam muitas das propriedades biológicas atribuídas ao NO, como a vasodilatação de veias e artérias e a inibição de agregação plaquetária (59). Os compostos RSNOs têm ocorrência natural no corpo humano e são doadores ou armazéns de NO, sendo considerados espécies fundamentais no mecanismo de transferência de NO, *in vivo* (65) e capazes de liberar NO espontaneamente por processos térmicos.

Estes compostos podem ser utilizados em várias aplicações biomédicas quando incorporados em matrizes que atuem como veículo de liberação de NO (61). Dentro desta classe de veículo de liberação de NO se destaca a S-nitrosoglutationa (GSNO) (66). A GSNO juntamente com S-nitrosoproteínas (67) e S-nitroso-derivados de hemoglobina (68) já foram identificados como compostos endógenos fundamentais no armazenamento e transporte de NO (67). A matriz de liberação GNSO, que também é encontrada *in vivo*, é uma matriz estável devido à existência de interações entre hidrogênios intra-moleculares na sua composição e tem sido bem estudada na pele humana, pois atua como um facilitador do fluxo sanguíneo local (69).

1.3. Aspectos bioquímicos dos biomaterias

Além do GSNO, há biomateriais que podem ser utilizados como locais de armazenamento e liberação de NO e que também são utilizados em procedimentos cirúrgicos e em técnicas relacionadas à engenharia de tecidos, como os hidrogéis (70,71).

Recentemente foi demonstrado que a utilização de hidrogéis (biomaterial) como proteção das alças intestinais fetais contra o LA pode diminuir a inflamação do intestino em fetos de ratos (72).

A adequação das propriedades físicas e mecânicas dos hidrogéis para a viabilização destas aplicações depende fortemente da sua flexibilidade quando hidratado e da sua resistência à compressão. Estas propriedades, por sua vez, estão associadas ao grau de intumescimento do hidrogel e dependem diretamente do grau de reticulação da sua rede polimérica devido à presença de grupamentos químicos como os de ácidos carboxílicos, amidas, hidroxilas, entre outros na sua estrutura (70,71,73).

Um polímero termo-sensível bastante estudado é o poli(N-isopropilacrilamida) (P(NIPAAm)). Em solução aquosa, este polímero apresenta separação de fases quando a solução é aquecida acima de 32 °C (temperatura consoluta inferior, LCST) (74). A adição de grupos ácidos como, por exemplo, o ácido acrílico, aumenta a temperatura de transição de fase com o aumento do pH da solução.

Baseado neste conceito químico, o desenvolvimento de redes de P(NIPAAm-co-AAc) densamente reticuladas podem funcionar como biomaterial para cirurgias, pois quando intumescido constitui um material macio e biocompatível (75).

Os hidrogéis podem ser quimicamente estáveis ou degradáveis e eventualmente desintegrados e dissolvidos (70,71). São muito utilizados no controle da liberação de drogas ingeridas via oral ao longo do trato digestivo, pois não só interagem com a mucosa gastrointestinal, mas também interagem com cólon, vagina e cartilagem nasal, pois são leves e ricos em água (76).

O hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) é uma rede tridimensional de polímeros hidrofílicos capaz de absorver de 10 a 20 % de água ou fluidos biológicos a mais que seu peso seco e são os polímeros que mais produzem hidrogéis para uso medicinal. Ele possui a capacidade de ser

reversível, pois, dependendo da temperatura em que ele se encontra, pode ficar sólido ou aquoso (70,77).

Os hidrogéis em uso terapêutico são atóxicos e bons candidatos a sistemas de entrega de drogas, além de servir como uma cobertura para ferimentos e proteção contra micróbios. Para servir como cobertura é necessário que o hidrogel se mantenha aderido à serosa quando aplicado sobre a alça intestinal, para isso, utilizam-se adesivos naturais a base de fibrina ou fibrinogênio (64).

A utilização de substâncias contendo fibrina ou fibrinogênio para homeostasia em cirurgias iniciou em 1915 e vários métodos vêm sendo desenvolvidos utilizando altas concentrações de fibrinogênio combinadas com fator XIII (78).

O Beriplast® P é uma substância sintética usada em procedimentos cirúrgicos. É constituído de um sistema de formação de selante de fibrina que simula a fase final do processo de coagulação sanguínea, possibilitando adesão de tecidos, suporte para sutura, hemostasia local e selagem de cavidades corporais. Neste adesivo sintético, o fibrinogênio humano é altamente purificado, concentrado, pasteurizado e converte-se em fibrina pela ação da trombina humana. Estes dois principais componentes na presença de íons de cálcio e fator XIII humano levam à formação de um coágulo de fibrina mecanicamente estável e com boas propriedades adesivas.

Para evitar uma fibrinólise excessivamente rápida, a aprotinina, derivada de tecido pulmonar bovino, é adicionada ao Beriplast® e o composto é metabolizado da mesma maneira que a fibrina endógena, por fibrinólise e fagocitose. Resultados clínicos mostraram que o Beriplast® P tem tido bom desempenho em procedimentos como cirurgia gastrointestinal, hepática, pancreática, biliar, plástica e neurocirúrgica (78,79).

Portanto, a utilização do hidrogel associado ao tratamento de NO no modelo de gastrosquise experimental em ratas poderia trazer subsídios para a possível aplicação do tratamento pré-natal na gastrosquise em humanos e contribuir para diminuir a morbi-mortalidade e o custo da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a eficácia do tratamento com GSNO e a sua combinação com hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) como protetores das alças intestinais contra o LA no modelo experimental de gastrosquise em fetos de rato.

2.2. Específico

Avaliar:

- a) O grau de proteção das alças intestinas pelas medidas morfológicas e histométricas intestinais.
- b) A expressão das enzimas nNOS, iNOS e eNOS por western blotting e imunoistoquímica.
- c) A quantificação de nitrato e nitrito no intestino e no LA.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Avaliação da Comissão de Ética em Experimentação Animal

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-UNICAMP) como projeto de pesquisa nº 1452-1.

3.2. Síntese de GSNO

O GSNO foi sintetizado no Laboratório de Físico Química do Instituto de Química, de acordo com de Oliveira (80). Conforme protocolo, 1,50 g de glutathione (GSH) foram adicionados a uma solução de HCl 0,5 M e esta solução foi mantida sob agitação constante até a completa dissolução da GSH. Em seguida, adicionou-se 0,35 g de nitrito de sódio a esta solução, mantendo-se a agitação constante por mais 40 min, em banho de gelo. A formação da GSNO foi constatada pelo desenvolvimento de cor vermelha alaranjada na solução. A GSNO foi então precipitada com a adição de 20 mL de acetona, lavada com pequenas quantidades de água gelada e acetona, filtrada à vácuo e seca por liofilização por 24h. A concentração final foi de 336 g/mol e a GSNO seca foi armazenada a -20 °C.

3.3. Diluição do GSNO

O composto foi diluído em solução de cloreto de cálcio, de modo que a concentração final foi de 0,1 mM. Para as outras concentrações usadas no presente estudo, a solução foi diluída em água de injeção, na proporção de 1:10, 1:100 e 1:1000 resultando nas concentrações de 0,01 mM, 0,001 mM e 0,0001 mM, respectivamente. Para cada feto, foram aplicados 15 µL da solução com GSNO e mais 15 µL somente de solução de cloreto de cálcio. Como o volume final é de 30 µL, a concentração final do GSNO aplicado no intestino foi de 50 µM para a solução-mãe. Já para as outras diluições citadas anteriormente, as concentrações finais foram de 5 µM, 0,5 µM e 0,05 µM, respectivamente.

3.4. Preparação do Selante de Fibrina com GSNO

O Beriplast[®] P foi preparado pela junção de dois conjuntos: a) fibrinogênio humano e fator XIII humano de coagulação diluídos em solução de aprotinina bovina e b) trombina humana diluída em solução de cloreto de cálcio já adicionada da concentração de 0,0001 mM GSNO que foi a única usada. A trombina é ativada pelos íons Ca^{2+} que são ativadores dessa proteína plasmática. A dose de 15 μL de cada conjunto foi aplicada com auxílio de pipetas analíticas Gilson[®], porém misturadas somente no momento da aplicação na alça intestinal. Como o volume final é de 30 μL , a concentração final do GSNO aplicado no intestino com adesivo foi de 0,05 μM .

3.5. Preparação do Hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc)

A preparação dos hidrogéis foi baseada no pH 9,0 do LA que foi medido antes do procedimento cirúrgico e foi caracterizada pela determinação de suas propriedades térmicas de gelificação e de separação de fases em soluções aquosas.

Os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) foram sintetizados no Laboratório de Físico Química do Instituto de Química, em solução aquosa contendo 80 mol % dos monômeros totais de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) previamente purificada com hexano, 20 mol % dos monômeros totais de Ácido acrílico (AAc) purificado por destilação, 5 mol % dos monômeros totais de N,N-metileno-bisacrilamida (MBAAm) que é agente reticulante, todos na presença de persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (43 mmol L^{-1}) e N,N,N-Tetrametilenodiamina (TEMED) ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) que foram mantidos sob agitação constante em presença de N_2 gasoso por 1 hora a temperatura ambiente e depois somente sob agitação por 24 horas.

A síntese e a purificação foram realizadas em água deionizada (pH 6,4) e em solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 para eliminar todos os monômeros e reagentes de membrana em excesso.

Os hidrogéis foram intumescidos em solução de persulfato de sódio e liofilizados para secagem. As membranas foram sintetizadas com tamanho de 10 x 15 cm e 0,4 cm de espessura,

porém as películas de hidrogel para inserção na cavidade abdominal dos fetos foram recortadas com tamanho de 1 x 1 cm e 5 mg de massa.

3.6. Animais

Fêmeas de ratos *Sprague-Dawley* provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB - UNICAMP, Campinas) com peso ao redor de 250 g foram submetidas ao acasalamento. O casal foi mantido em conjunto durante o período escuro do ciclo. No dia seguinte, a região genital da fêmea foi examinada para verificação da mancha vaginal de esperma e realizado esfregaço vaginal para observação de espermatozóides. A presença da mancha e de espermatozóides configurou o acasalamento e foi considerado dia zero de prenhez (o tempo de gestação normal de ratas até o termo é de 22 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas com oferecimento de ração e água *ad libitum*, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro), temperatura (média de 23 °C) e umidade relativa próxima de 55%.

3.7. Constituição dos Grupos

Para as análises morfométrica, histológica e imunoistoquímica foram operadas 38 ratas, para western blotting e quimioluminescência 16, perfazendo um total de 54 ratas prenhas. Foram comparados 11 grupos no total, cada um contendo 12 fetos. A seguir, a descrição dos onze grupos:

Grupo Controle Externo (CE) – Feto controle no qual nem ele e nem a rata mãe sofrem procedimento cirúrgico.

Grupo Gastrosquise (G) - Feto operado com gastrosquise.

Grupo Controle Interno (CI) - Feto controle interno (sem a realização de procedimento cirúrgico, mas dentro da rata mãe operada).

Grupo Sham (S) – Feto sham (manipulado, porém sem incisão da parede abdominal).

Grupo Gastrosquise + Adesivo de Fibrina (GA) - Feto operado com gastrosquise e cobertura com adesivo de fibrina (Beriplast[®]).

Grupo Gastrosquise + Adesivo de Fibrina + Hidrogel (GAH) - Feto operado com gastrosquise e cobertura com adesivo de fibrina (Beriplast[®]) mais hidrogel.

Grupo Gastrosquise + GSNO a 50 μ M (GNO1) – Feto operado com gastrosquise e aplicação de GSNO a 50 μ M.

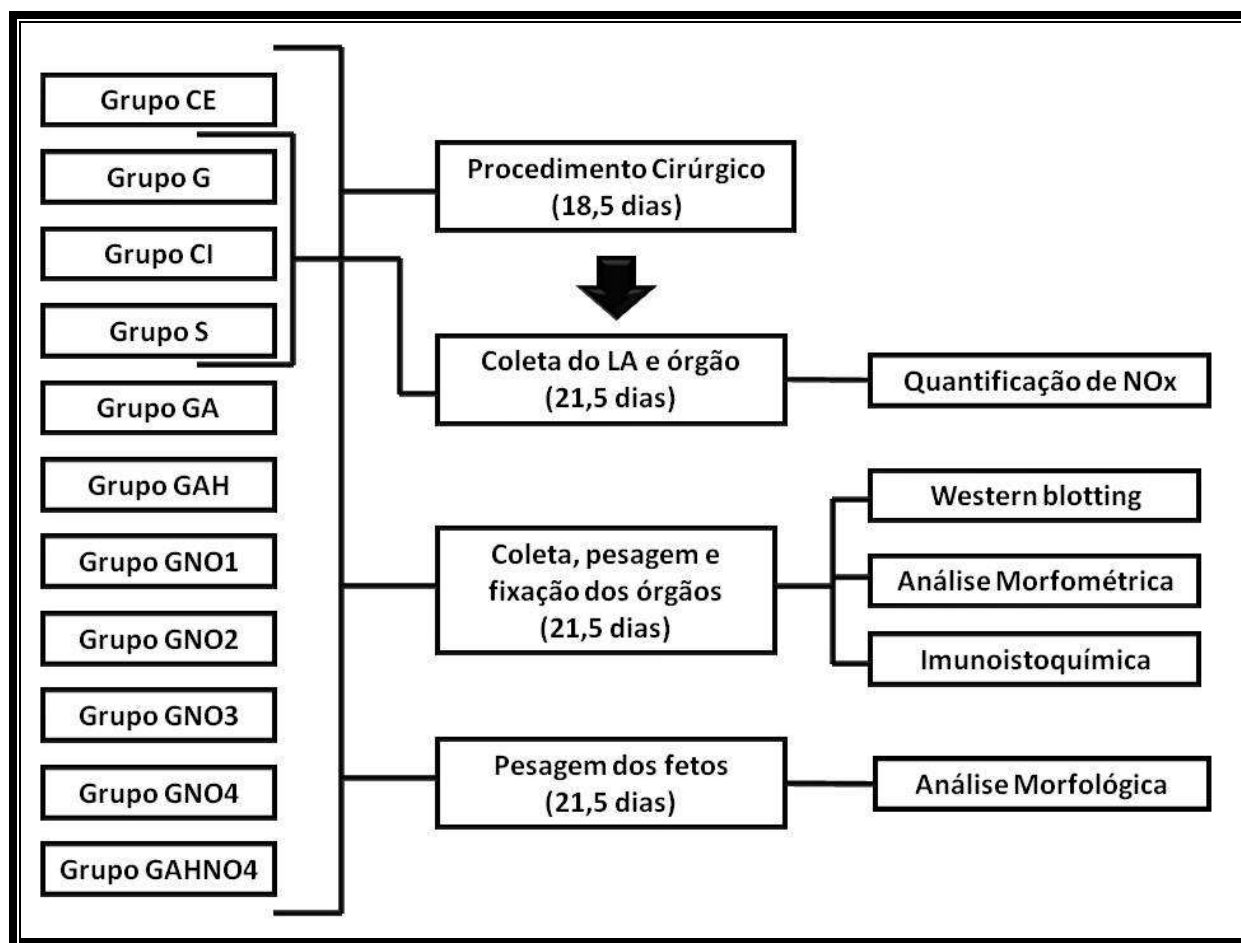
Grupo Gastrosquise + GSNO a 5 μ M (GNO2) - Feto operado com gastrosquise e aplicação de GSNO a 5 μ M.

Grupo Gastrosquise + GSNO a 0,5 μ M (GNO3) - Feto operado com gastrosquise e aplicação de GSNO a 0,5 μ M.

Grupo Gastrosquise + GSNO a 0,05 μ M (GNO4) - Feto operado com gastrosquise e aplicação de GSNO a 0,005 μ M.

Grupo Gastrosquise + Adesivo de Fibrina + Hidrogel + GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4) - Feto operado com gastrosquise e cobertura com adesivo de fibrina (Beriplast[®]) misturado com 0,005 μ M de GSNO mais hidrogel.

3.8. Esquema de estudo do experimento



3.9. Cirurgia

Os procedimentos cirúrgicos ocorreram pela manhã, com idade gestacional de 18,5 dias de gestação. Após aclimação no laboratório, as ratas grávidas foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina base – 50 mg/mL (Ketamina® - Pfizer do Brasil) associada com xilazina 10 mg/mL (Rompum® - Bayer do Brasil Ltda) na dose de 0,6 mL por animal via intra-muscular aplicado na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha de calibre 20 G. Esta composição anestésica (180 mg/kg de ketamina e 1,25 mg/kg de

xilazina) mantém o animal sob anestesia profunda durante um período de três horas e o pós-operatório transcorre de maneira indolor durante o período compreendido entre 6 e 12 horas.

O abdome foi submetido à raspagem dos pêlos com tosquadeira elétrica *Sunbeam*[®] com cuidado para não ferir os mamilos. Os animais foram colocados sobre placa aquecida por resistência elétrica, marca *Harvard Apparatus*[®], e previamente regulada na temperatura de 38 °C. Após assepsia com clorohexidina (*Chlorohex*[®]) solução aquosa e colocação de campos estéreis, o animal foi submetido à laparotomia mediana em dois planos (pele e aponeurose/peritônio). Em seguida, o útero bicornio foi delicadamente exposto e protegido com gaze estéril embebida em solução salina fisiológica aquecida a 38 °C (Figura 3). 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 no experimento pelo risco de abortamento relacionado à manipulação desses animais. Nas ratas dos grupos GA, GAH, GNO1, GNO2, GNO3, GNO4 e GAHNO4, o segundo feto, contado a partir do istmo uterino direito, foi considerado o primeiro feto da numeração, sendo submetido à gastrosquise e a aplicação de NO e/ou adesivo de fibrina e/ou hidrogel, o feto seguinte foi controle, seguido de novamente gastrosquise nas mesmas condições anteriores. Nas ratas que continham os grupos G, CI e S, o segundo feto foi submetido à gastrosquise apenas, o terceiro foi controle e o quarto foi sham, formando uma tríade que era repetida caso houvesse quantidade de fetos suficientes. Este cuidado prévio na decisão da numeração dos fetos permite que não haja viés na decisão do feto a ser operado. Esta sequência foi sucessivamente repetida, para o corno direito e para o corno esquerdo (Figura 4). Em geral, ratas *Sprague-Dawley* concebem de 8 a 10 filhotes por gestação. O número de fetos submetidos à realização da gastrosquise foi de 3 a 4 fetos por rata grávida, sendo divididos em tratados (aplicação do GSNO e/ou biomaterial) e não-tratados (apenas gastrosquise).

A confecção da gastrosquise foi realizada de acordo com Correia-Pinto (48). Sob microscopia óptica estereoscópica (microscópio JF-Vasconcellos[®] - 4,5 X), uma sutura em bolsa com fio de Prolene[®] calibre 6-0 foi realizada na parede uterina. 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. Em seguida, 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 dos vasos umbilicais durante o procedimento da gastrosquise.

Por meio de uma incisão de laparotomia para-umbilical direita, com extensão aproximada de 3 mm, abriu-se a cavidade abdominal fetal, com o cuidado de não lesar os vasos umbilicais e o fígado. As alças intestinais foram expostas com facilidade pela compressão delicada do abdome fetal com hastes flexíveis 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. O feto seguinte, denominado controle, não foi submetido à cirurgia e nem retirado do útero. Os fetos que receberam o adesivo de fibrina foram submetidos ao mesmo procedimento de gastrosquise, mas sobre o intestino exposto foram aplicados 30 µL, sendo 15 µL do conjunto I e 15 µL do conjunto II. O feto que recebeu o adesivo de fibrina com ou sem GSNO e o hidrogel também foi submetido ao mesmo procedimento de gastrosquise, mas sobre o intestino exposto foram aplicados 15 µL do conjunto II e no biomaterial foram aplicados 15 µL do conjunto I, de modo que a mistura dos dois conjuntos se deu imediatamente após a cobertura das alças pelo hidrogel. O feto que recebeu apenas doses de GSNO, teve 30 µL de solução de cloreto de cálcio aplicado sobre o intestino, sendo 15 µL contendo GSNO e 15 µL sem GSNO (Figura 5). Antes de retornar o feto na cavidade uterina, o hidrogel foi mantido por aproximadamente 1 minuto na área de aplicação para permitir a reação de polimerização da fibrina e o intumescimento parcial do biomaterial. Para todos os casos, o adesivo foi aplicado com auxílio de pipetas analíticas Gilson®.

Durante o procedimento, o útero materno e a porção exposta do feto foram mantidos aquecidos com solução salina (NaCl 0,9 %) a 38 °C gotejada com seringa de 5 mL.

Ao final da realização do procedimento nos fetos disponíveis, a parede abdominal da rata mãe foi fechada em 2 planos, com utilização de fio mononylon 4-0 com sutura contínua. As ratas foram recuperadas com oxigênio inalado em máscara apropriadamente adaptada a 1L/minuto, até estarem completamente acordadas e movimentando-se sem problemas. O período pós-operatório se deu nas gaiolas de acrílico, em baias individuais, com água e ração oferecidas *ad libitum*.

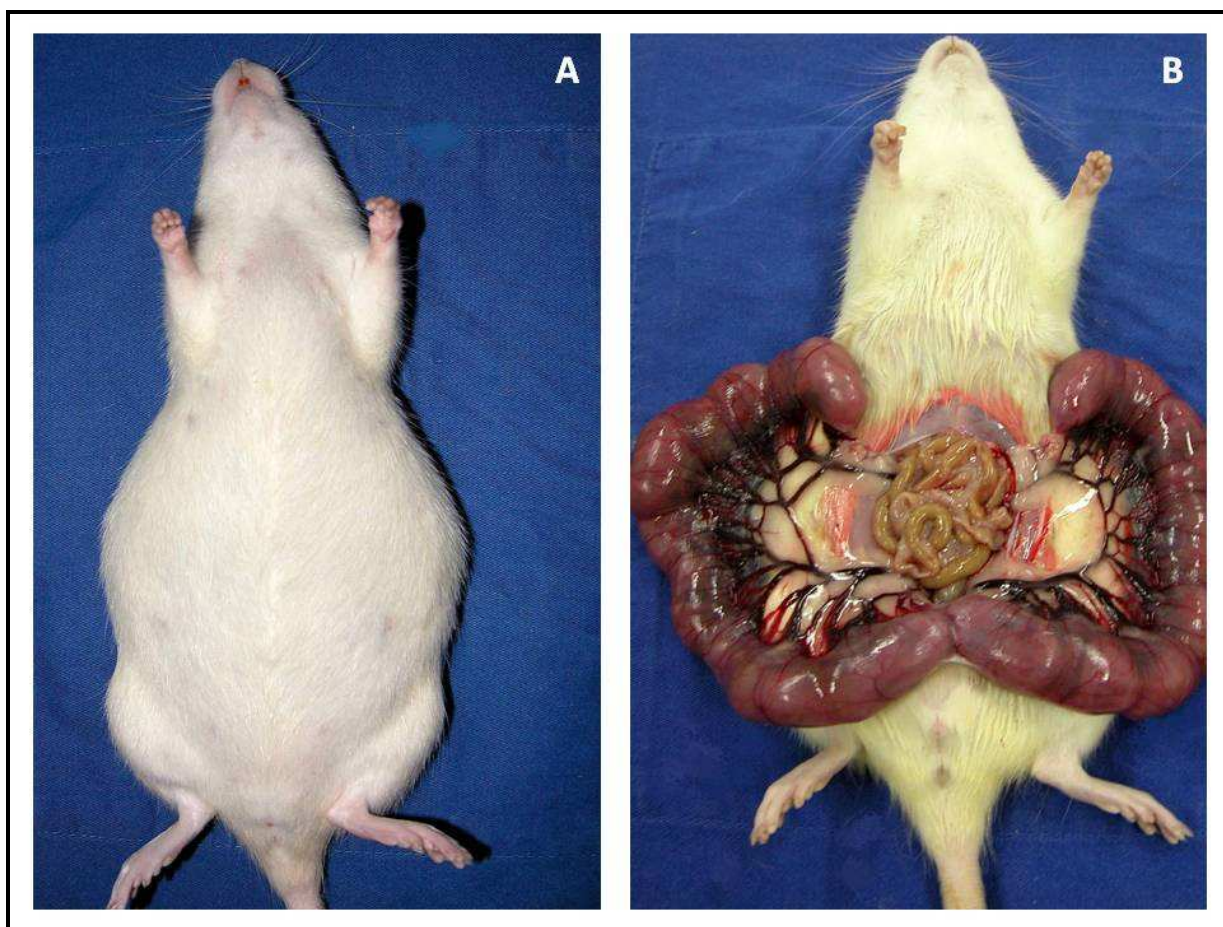


Figura 3 – Em **A**, fotografia da rata *Sprague-Dawley* prenha já anestesiada para início do procedimento cirúrgico. Em **B**, fotografia do útero bicorno exposto.

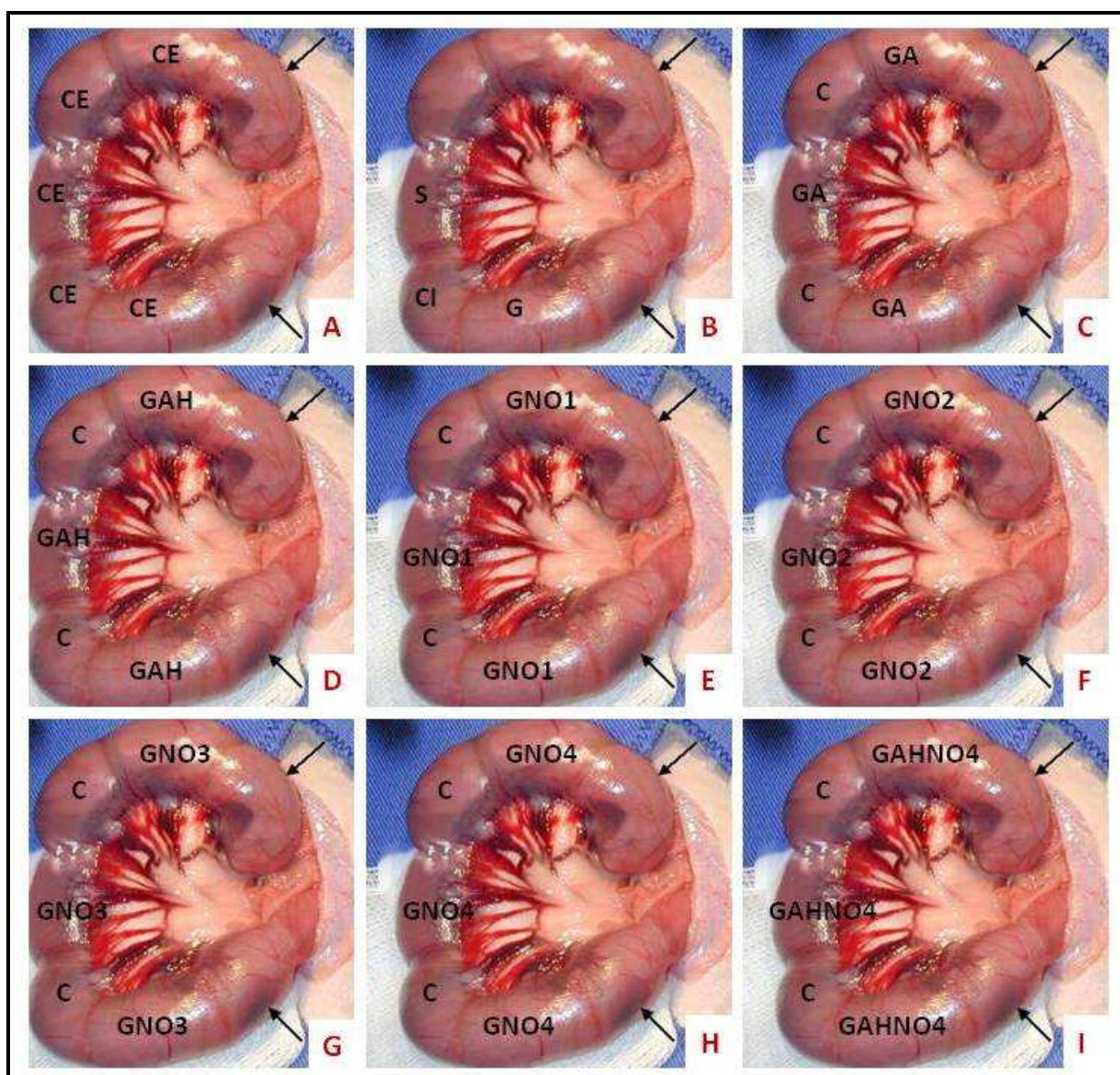


Figura 4 – Sequência para coleta dos fetos no útero, sendo cada figura representante de uma rata diferente. **(A)** rata controle que não sofre intervenção cirúrgica. **(B)** tríade formada pelos grupos G, C e S. **(C – I)** fetos de ratas que receberam biomateriais e GSNO, sendo **C** e **D**, adesivo de fibrina e hidrogel; **E, F, G** e **H**, dosagens diferentes de GSNO e **I**, adesivo de fibrina, hidrogel e GSNO juntos no mesmo feto.

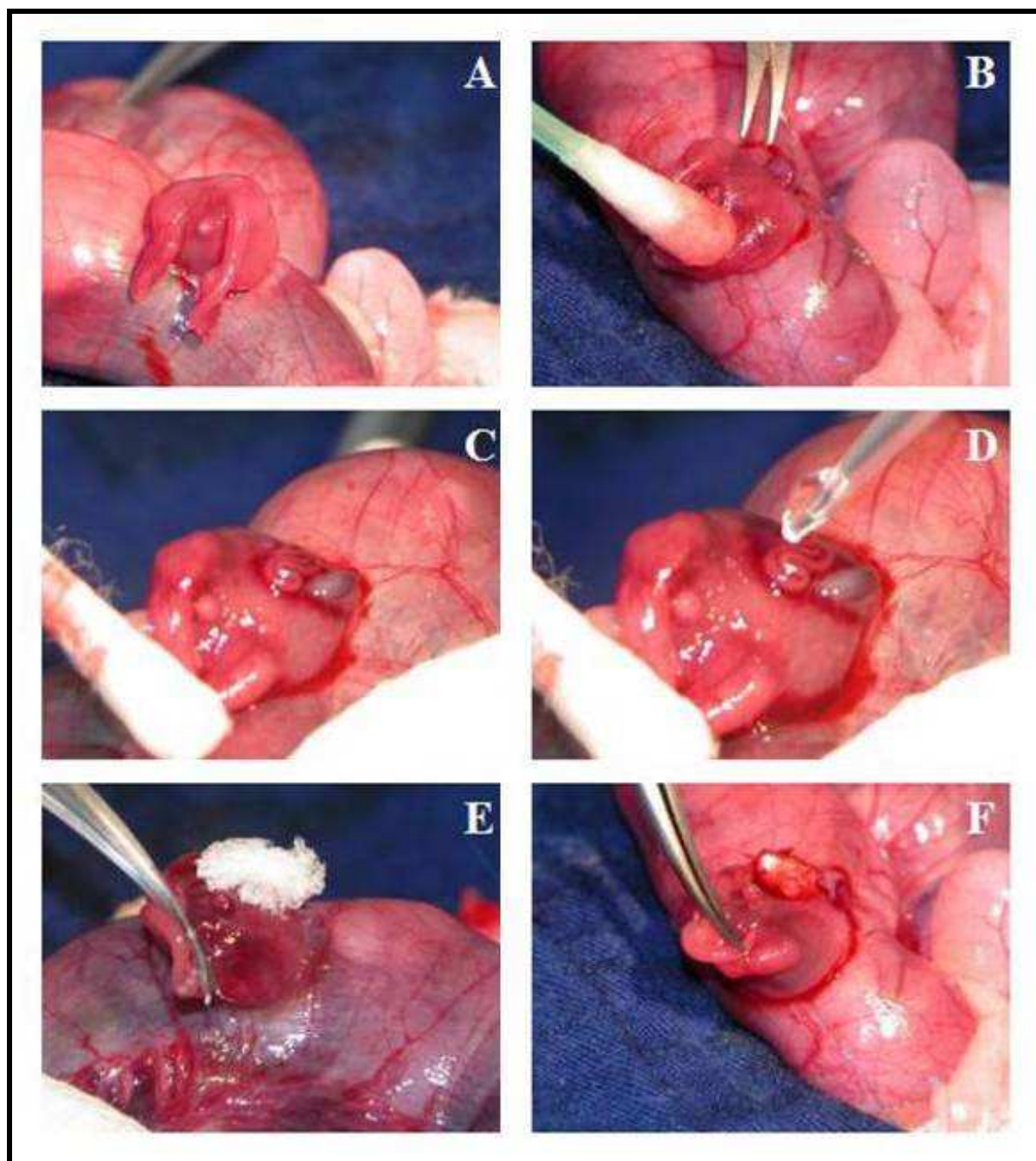


Figura 5 – Procedimento cirúrgico realizado com 18,5 dias de gestação. (A) Exposição do feto após abertura da cavidade uterina, (B) incisão à direita do cordão umbilical, (C) exposição das alças intestinais como na gastrosquise (Grupo G), (D) aplicação do adesivo de fibrina Beriplast[®] e/ou GSNO (Grupos GA, GAH, GNO1, GNO2, GNO3 e GNO4), (E) aplicação do hidrogel seco (Grupo GHNO4) e (F) adesão e intumescimento do hidrogel.

3.10. Coleta de Dados

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, modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) e obtidos os pesos corporais (PC) em mg. O abdome fetal foi aberto por incisão mediana e dissecado sob foco de luz e com auxílio de lupa, expondo as alças. As alças intestinais foram removidas desde o piloro até a região do reto superior, na reflexão peritoneal. O hidrogel que recobria as alças intestinais dos grupos GAH e GAHNO₄ foi retirado com auxílio de hastes flexíveis de algodão embebidas com soro fisiológico gelado. O intestino de todos os grupos foi removido e pesado (g) para análise do peso intestinal (PI) e da relação peso intestinal / peso corporal (PI/PC) e em seguida foi fixado para estudo microscópico ou congelado em nitrogênio líquido para análise molecular (Figura 6).

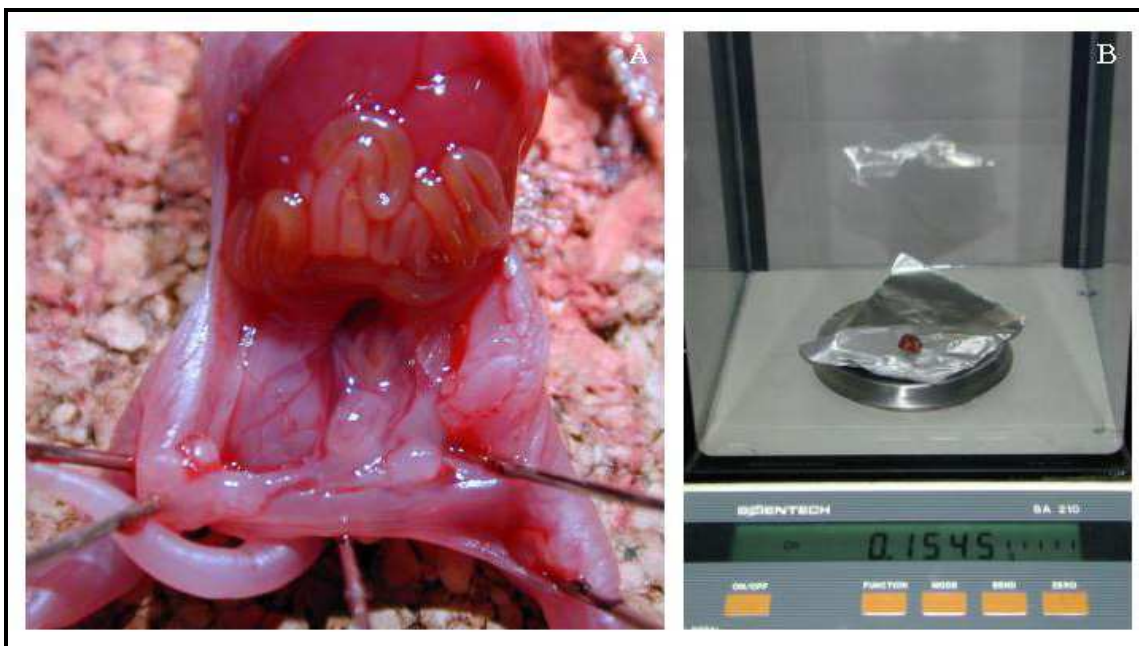


Figura 6 – Em **A**, fotografia da dissecação do intestino desde o piloro ao reto. Em **B**, fotografia da balança analítica, onde foram medidos todos os pesos corporais em gramas (PC) de todos os fetos estudados, e também a pesagem sobre papel alumínio do intestino dissecado (PI).

3.11. Coleta de LA para análise por quimioluminescência

O LA foi coletado nos grupos **G**, **C** e **S** para análise de quimioluminescência. A coleta foi realizada no dia 21,5 de gestação da rata, antes da abertura total da cavidade uterina para coleta dos fetos. O LA foi colhido com seringa de 5 mL e agulha de calibre 20 G e estocado a -80°C para futura análise.

3.12. Avaliação morfológica dos intestinos

A obtenção do PC e do PI permitiu o estudo estatístico dessas variáveis nos onze grupos. A relação PI/PC foi criada entre estes dois parâmetros com o objetivo de se excluir a variável do PC sobre a avaliação do PI (81).

3.13. Processamento para análise morfológica e imunoistoquímica

O intestino foi dividido em quatro segmentos a partir do ângulo de Treitz em direção ao íleo distal, cada segmento com aproximadamente 2 a 3 cm de comprimento. O primeiro segmento compreendeu a porção de jejuno proximal. O segundo segmento compreendeu a porção de jejuno distal. O terceiro, de íleo e o quarto da região da válvula íleocecal e intestino grosso, até o reto extra-peritoneal. Todos os segmentos foram numerados, acomodados paralelamente em sequência, da esquerda para a direita, da porção proximal para a distal, em molduras próprias de histologia. Após a fixação em solução de paraformaldeído 4 % as amostras foram desidratadas em um gradiente crescente de etanol, sendo 70 %, 80 %, 90 % e 100 % respectivamente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo Leica - Modelo RM 2145, no sentido transversal, com espessura de 5 µm para os segmentos intestinais e posteriormente coletados em lâminas histológicas pré-tatadas com Poli-L-lisina para melhor aderência. Os cortes foram corados por Hematoxilina de Erlich/Eosina (H/E) para identificação histológica e as lâminas foram montadas em Entellan[®].

Foi convencionada a análise dos segmentos intestinais intermediários (jejuno-ileal), desta forma assegurando que, nos casos de fetos com gastrosquise, o segmento exposto ao LA fosse analisado comparando com os respectivos: controle, sham, e os tratamentos com GSNO e/ou hidrogel.

3.14. Análise da morfometria intestinal

Os cortes histológicos intestinais transversais corados com H/E foram fotografados utilizando o fotomicroscópio Nikon Eclipse E800, com ampliação de 20 vezes para a avaliação do diâmetro intestinal externo I (medida externa vertical desde a serosa), diâmetro intestinal interno I (medida interna vertical desde a mucosa), diâmetro intestinal externo II (medida externa horizontal desde a serosa) e diâmetro intestinal interno II (medida interna horizontal desde a mucosa) e 200 vezes para a medida das camadas da parede intestinal. As imagens foram digitalizadas, possibilitando a medida dos diâmetros intestinais, espessura total da parede, camadas mucosa e submucosa, muscular circular, muscular longitudinal e serosa por meio do

programa Image Pro Plus® (72,82,83). As medidas, em μm , foram realizadas em orientação radial, nos quatro quadrantes de cinco cortes seqüenciais, de cada variável para cada feto (Figura 7).

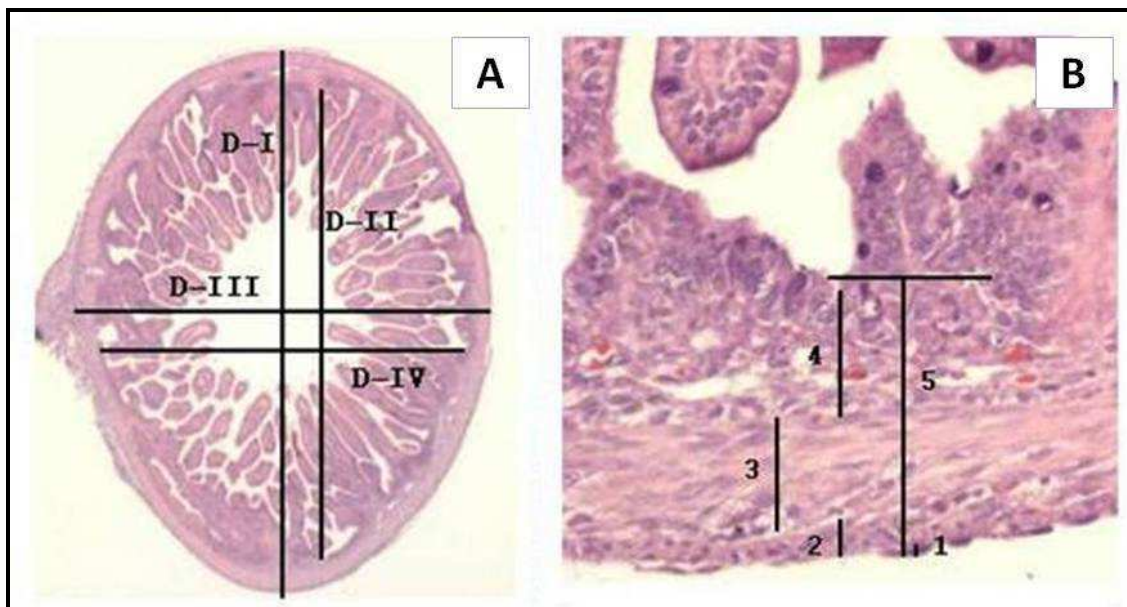


Figura 7 – Esquema das medidas em cortes histológicos transversais de intestino para a análise estatística. Em **A**, aumento de 20x para medida dos diâmetros, observando que no D-I e D-III é desde a serosa e em D-II e D-IV é desde a mucosa. Em **B**, aumento de 200x para medida das camadas, sendo 1- Serosa, 2 – Muscular Longitudinal, 3 – Muscular Circular, 4 – Submucosa e mucosa e 5 – Espessura total da parede.

3.15. Imunoistoquímica para as enzimas nNOS, iNOS e eNOS.

Cortes histológicos obtidos em parafina foram desparafinizados em xilol e re-hidratados em série decrescente de etanol. Em seguida, os cortes foram incubados em borato de sódio 0,1M em PBS 0,01 M (pH 7,4) por uma hora em temperatura ambiente para exposição dos epítomos. Posteriormente, os cortes foram separados e tratados com peróxido de hidrogênio a 10% em PBS 0,01 M (pH 7,4) por 30 minutos, visando eliminar as peroxidases endógenas, seguido pela

incubação com albumina bovina sérica (BSA) a 1% em PBS por uma hora. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados a 4 °C por 12 horas com o anticorpo primário anti-nNOS (sc-648, Santa Cruz Biotechnology, California), anti-iNOS (sc-651, Santa Cruz Biotechnology, California) ou anti-eNOS (sc-654, Santa Cruz Biotechnology, California) diluídos 1:200 em PBS/BSA 3%. Com o término desta etapa os cortes foram lavados em PBS e incubados em anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-rabbit feito em cabra (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, California) diluído 1:200 em PBS/BSA 1% por uma hora. Após a incubação os cortes foram lavados em TBS 0,05 M pH 7,4 e tratados com avidina-biotina (Vectastain ABC kit, Vector Labs, California) diluído 1:20 em TBS 0,05M pH 7,4 por 45 minutos. A revelação foi realizada com solução de tetrahidrocloreto de diaminobenzidina 0,01% (Sigma Aldrich) e peróxido de hidrogênio 0,03% em TBS 0,05M pH 7,4 por 25 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados, contra corados com Hematoxilina de Harris, desidratados e montados com Entellan®.

3.16. Análise semiquantitativa da imunoistoquímica

Foram analisados três cortes por feto de três fetos por grupo. Os cortes histológicos que receberam tratamento imunoistoquímico, foram analisados em microscópio de luz em magnificação de 200X quanto à intensidade da marcação. De acordo com a intensidade foi feita pontuação de 0 a 4, sendo 0 = negativo, 1 = marcação fraca, 2 = marcação moderada, 3 = marcação forte e 4 = marcação muito forte. As lâminas foram analisadas por dois avaliadores cegos e independentes.

3.17. Extração de proteína total das amostras de intestino para western blotting e quimioluminescência

Foram utilizados seis fetos por grupo para cada análise molecular, no qual os intestinos coletados foram homogenizados em tampão de extração contendo: Tris 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio

10 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 2 mM, 0,1 mg de aprotinina e Triton-X100 1 % a 4°C com homogenizador para pequenas amostras TE-103 (Tecnal, Paulínia) a 30000 rpm por 30s. Para as amostras destinadas a quimioluminescência, não foi acrescentado o detergente Triton-X100, pois as bolhas formadas prejudicam a leitura do aparelho. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em centrífuga Mikro 200R (Hettich, Alemanha) por 12000 rpm a 4 °C por 30 minutos e então foram realizadas leituras da concentração de proteínas de cada amostra pelo método de Bradford (84).

3.18. Quantificação de proteínas pelo método de Bradford para western blotting e quimioluminescência

O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95 % e em seguida, adicionando 100 mL de ácido fosfórico 85 %. Após completar o volume para 1 L, a solução foi filtrada em papel de filtro e guardada em frasco âmbar.

Para a realização do macroensaio foi preparada uma curva de calibração com uma solução de BSA (soro de albumina bovina) 2,0 mg/mL. As diluições foram realizadas conforme a tabela abaixo:

Tabela 2 – Diluição da curva de calibração com BSA para análise da concentração de proteínas pelo método de Bradford (84).

Concentração (mg/mL)	Fator de Diluição	Volume BSA 1,0mg/mL (µL)	Volume de água (µL)
0,00	—	0	1000
0,10	20	50	950
0,20	10	100	900
0,40	5	200	800
0,60	3,3	300	700
0,80	2,5	400	600
1,00	2,0	500	500
2,00	1	1000	0

Após a confecção da curva de calibração, as amostras de LA (grupos G, C e S) e intestino (todos os dez grupos estudados) foram medidas em triplicata, transferindo 20 µL de cada amostra para microtubos e adicionando 1000 µL do reagente de Bradford. Em seguida, esperou-se 10 minutos para a reação ocorrer. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, model 8453, Palo Alto, CA, USA) em comprimento de onda de 595 nm com cubetas de plástico.

3.19. Expressão das enzimas nNOS, iNOS e eNOS por western blotting

Para a análise por western blotting, um volume de amostra dos homogenatos de intestino de cada grupo contendo 120 µg de proteína de cada grupo foi diluído com 12 µl de tampão de Laemmli (0.0625 M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2 % de SDS, 10 % de glicerol, 0.001 % de azul de bromofenol e 5 % de 2-mercaptoetanol) e fervido durante 5 minutos. Após rápida centrifugação a 10.000 x g (30 s), as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8 % contendo 0,1 % de lauril sulfato de sódio (SDS - PAGE) e tampão de corrida. A composição do tampão utilizado na corrida eletroforética foi: Tris (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1%) ajustado para pH 8,3. A separação eletroforética das proteínas foi realizada com uma intensidade de corrente constante (100 V), durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência a 120 V durante 90 minutos. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi: Tris (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0,1%) e metanol (20%).

Para comprovar a transferência, os géis foram corados com corante azul de Commassie (solução à 0,1 % em solução aquosa de ácido acético 5 % contendo 25 % de etanol). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados por incubação da mesma em solução a 0,2 % de albumina bovina sérica em tampão PBS 0,01 M pH 7,4 sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 12 horas a 4 °C com os anticorpos primários anti-nNOS (sc-648, Santa Cruz Biotechnology, California), anti-iNOS (sc-651, Santa Cruz Biotechnology, California) ou anti-eNOS (sc-654, Santa Cruz Biotechnology, California) diluídos 1:200 em PBS/BSA 3 %.

Após o término da incubação, as membranas foram lavadas com tampão PBS 0,01M pH 7,4 e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-rabbit feito em cabra (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, California) diluído em 1:5000 PBS/BSA 3 %, por duas horas. Em seguida, as membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens e foi adicionado kit de Quimioluminescência (Pierce, EUA) por 5 minutos. As membranas foram expostas a filmes radiográficos (Kodak, EUA) por 15 minutos, os quais foram revelados.

3.20. Quantificação de nitrito e nitrato no intestino e no LA por quimiluminescência

O nitrito e o nitrato presentes em homogenato de intestino e LA dos grupos G, C e S foram quantificados, após sua redução à NO, pela técnica de quimiluminescência, como marcadores indiretos dos níveis de NO. Após a quantificação inicial de proteínas, as amostras foram centrifugadas em dois ciclos de 12.000 rpm a 4 °C por 50 minutos cada, a fim de eliminar quaisquer partículas que poderiam prejudicar a análise das amostras. O sobrenadante foi armazenado a -80 °C.

As amostras descongeladas foram injetadas no frasco de reação do aparelho Nitric Oxide Analyzer NOATM 280i da Sievers, preenchido com solução redutora de cloreto de vanádio (III) em ácido clorídrico que reduz o nitrito e nitrato à NO. O NO liberado é arrastado por um fluxo de nitrogênio para a unidade de detecção quimioluminescente, onde o NO reage rapidamente com o ozônio (O₃), gerando NO₂^{*} em um estado excitado, segundo as equações (3) e (4).



Quando o elétron excitado retorna ao estado fundamental, um fóton é emitido e esse é detectado por uma célula fotomultiplicadora. A corrente gerada é proporcional à quantidade de NO e, portanto, à quantidade inicial de nitrito ou nitrato. A calibração do aparelho foi feita utilizando solução de nitrato de sódio. Os dados obtidos foram corrigidos pela quantidade de proteínas totais da amostra.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos através das pesagens e da morfometria foram avaliados pelo método de ANOVA com pós-teste Tukey-Kramer considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão. Os cálculos foram feitos por meio do programa *GraphPad Prism* 3.02.

5. RESULTADO

As primeiras ratas operadas do grupo GNO1 após o primeiro dia da aplicação do GSNO apresentaram-se muito doentes, com olhos e focinho com aspectos um pouco hemorrágicos, o que na maior parte resultou em óbito dos animais. Aquelas que sobreviveram até 21,5 dias, estavam bastante debilitadas e a maioria dos fetos mortos. Sendo assim, decidiu-se não continuar com o grupo, trabalhando a partir do grupo GNO2. Das 59 ratas utilizadas 5 (8,48 %) apresentaram o útero muito hemorrágico com 18,5 dias de gestação e sendo assim no dia da coleta, todos os fetos estavam mortos. As 54 ratas que gestaram até o fim da gravidez sem problemas, forneceram 264 fetos, dos quais 49 (18,56 %) morreram e foram excluídos, sendo 13 fetos do grupo G, 2 fetos do grupo sham, 6 fetos do grupo GA, 4 fetos do grupo GAH, 8 fetos do grupo GNO2, 6 fetos do grupo GNO3, 5 fetos do grupo GNO4 e 4 fetos do grupo GAHNO4. Dos 216 fetos vivos (81,82 %), 132 foram direcionados para o estudo da morfometria, histologia e imunoistoquímica com 12 fetos em cada grupo e 84 fetos foram direcionados para o estudo de biologia molecular, sendo 66 para análise por western blotting e 18 para análise por quimioluminescência.

Durante a coleta, no dia do sacrifício, observou-se que, macroscopicamente, os intestinos dos fetos dos grupos G, GA, GNO2, GNO3 e alguns do grupo GNO4 eram edemaciados, avermelhados, aderidos e recobertos por uma película esbranquiçada, muito similar ao defeito observado em humanos. Já os fetos dos grupos GAH, GAHNO4 e a maioria do grupo GNO4 quando retirados do útero materno apresentaram o hidrogel intumescido (com exceção do grupo GNO4), com aspecto gelatinoso diferente da consistência original recobrimdo quase ou totalmente as alças intestinais que estavam parecidas com as do grupo CE e CI, sendo em poucos casos, um pouco mais edemaciadas e avermelhadas. Os fetos do grupo S apresentaram o intestino parecido também com os últimos grupos citados (Figuras 8 e 9).

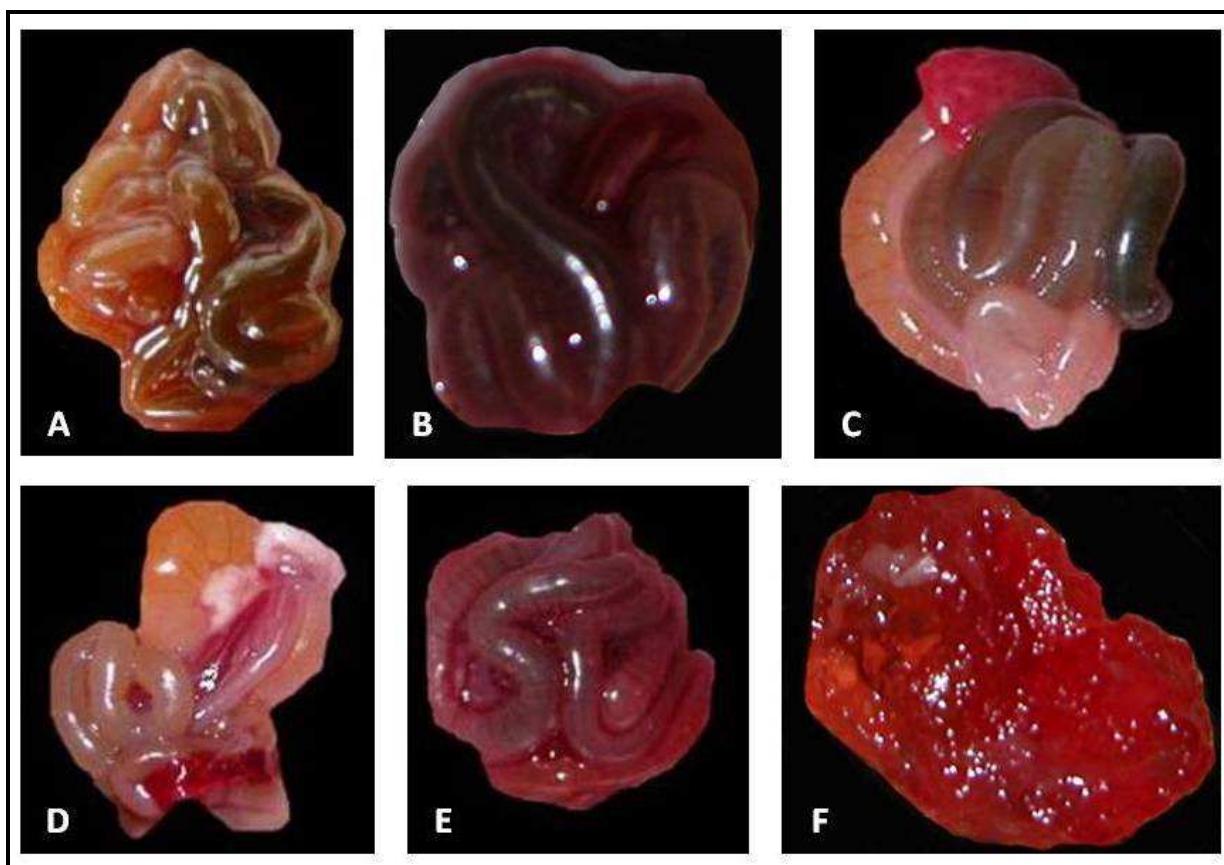


Figura 8 – Fotografias de alguns exemplares de intestinos de fetos de rato retirados do útero materno com 21,5 dias de gestação. **A** – Exemplo de intestino dos fetos dos grupos CE e CI; **B** – Exemplo de intestino dos fetos dos grupos G e GA; **C** – Exemplo de intestino dos fetos do grupo GNO4; **D** – Exemplo de intestino dos fetos dos grupos S, GAH e GAHNO4. **E** - Exemplo de intestino dos fetos dos grupos GA, GNO2 e GNO3. **F** – Hidrogel intumescido após ser retirado do intestino. Nota-se inflamação mais intensa nos grupos representados pela figura 8B e 8E.

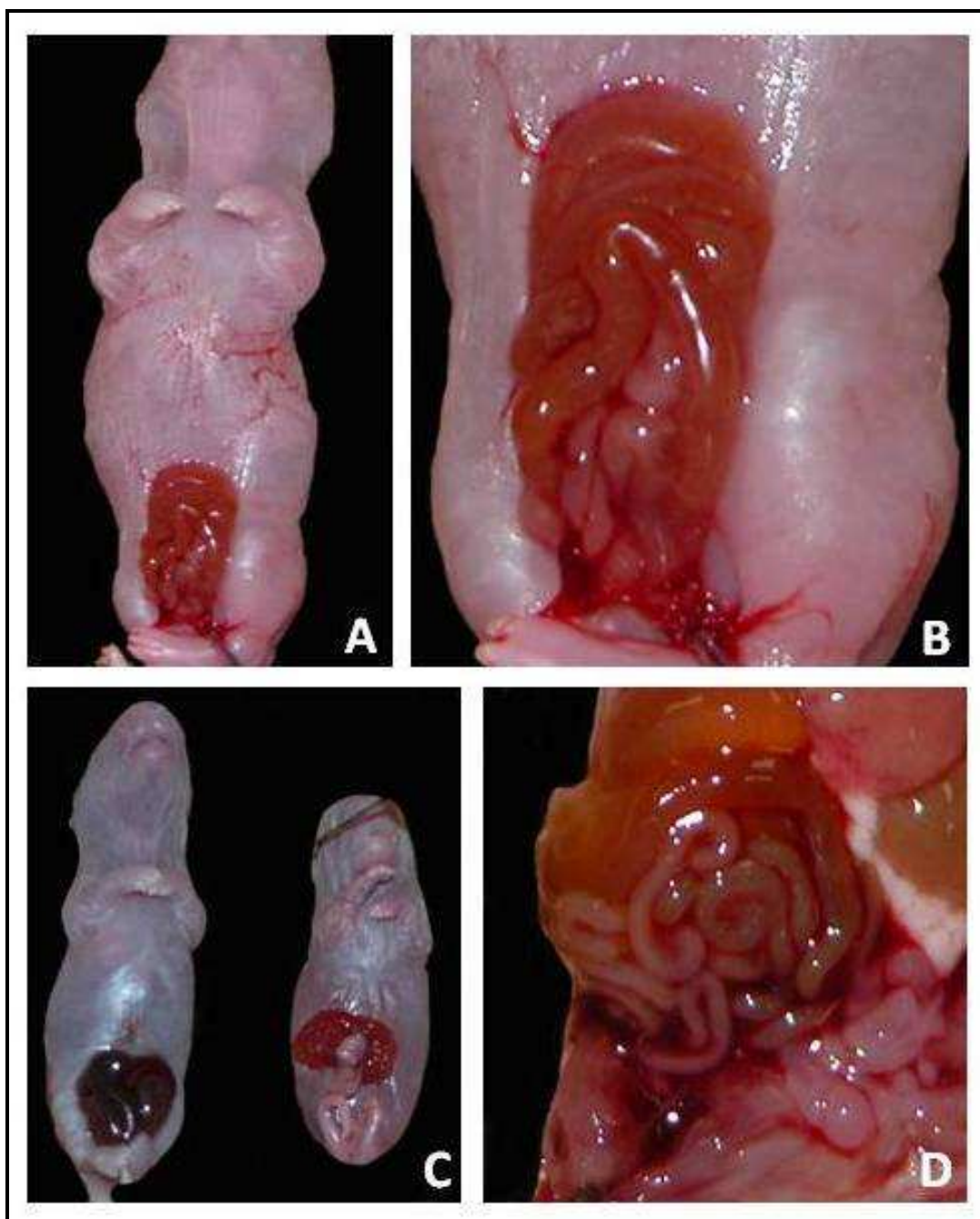


Figura 9 – Fotografia dos fetos de rato após a cesárea com 21,5 dias de gestação. **A** – Feto do grupo GNO4 com intestino exposto. **B** – Intestino do grupo GNO4 não muito inflamado, mesmo após exposição ao LA. **C** – Feto do grupo G com o intestino totalmente inflamado e ao seu lado o feto do grupo GAH com o intestino ainda coberto pelo hidrogel. **D** – Dissecção do feto do grupo GAH expondo o intestino que não apresenta inflamação das alças.

5.1. Análise morfológica

Primeiro, foram realizadas as comparações entre o feto dos grupos G, CE e CI com os fetos controle de cada grupo com dosagens diferentes de GSNO, ou seja, fetos GNO2C, GNO3C, GNO4C e GAHNO4C. Para esta análise, o texto faz referencia somente entre as diferenças dos grupos CE, CI e G com os demais, pois se trata de grupos com fetos saudáveis e doentes, para assim verificar se o tratamento foi eficiente ou não. O resultado da estatística entre todos os grupos estudados encontra-se na Tabela 3. O método utilizado também foi ANOVA seguido de pós-teste de Tukey-Kramer e o nível de significância foi estabelecido em 0,05.

As médias de PC, em miligramas, para os fetos dos sete grupos foram: CE = $5916 \pm 506,89$, variando de 5070 a 6603; CI = 5126 ± 1019 , variando de 3355 a 6490; G = 4386 ± 842 , variando de 3237 a 5776; GNO2C = $4899 \pm 738,44$, variando de 4149 a 6010; GNO3C = $5355 \pm 603,34$, variando de 4583 a 6128; GNO4C = $4538 \pm 809,06$, variando de 3529 a 5521; GAHNO4C = $4036 \pm 588,28$, variando de 3160 a 4912. Existe diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

O grupo CE foi maior que os grupos G, GNO4C, GAHNO4C ($p < 0,001$, em relação a todos) e GNO2C ($p < 0,05$). Além de menor que o grupo CE, o grupo G também foi menor que o grupo GNO3C ($p < 0,05$), porém semelhante aos demais ($p > 0,05$). Por outro lado, o grupo CI foi maior apenas que o grupo GAHNO4C ($p < 0,05$). O gráfico a seguir mostra a diferença estatística somente entre os grupos CE e G e os demais grupos, a fim de facilitar a visualização do resultado (Gráfico 1).

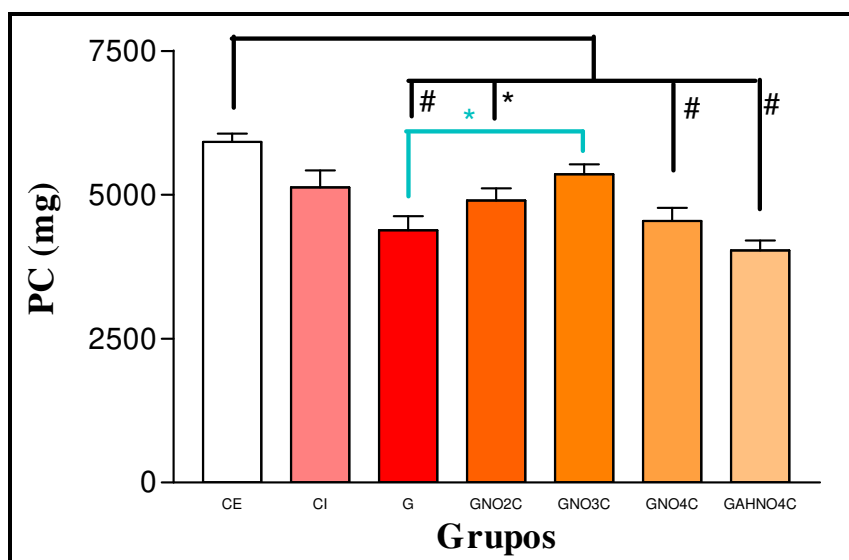


Gráfico 1 – Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4C) e Controle do feto com Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4C), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. * ($p < 0,05$), # ($p < 0,001$).

As médias de PI, em miligramas, para os fetos dos sete grupos foram: CE = $177 \pm 21,56$ variando de 155 a 216; CI = $148 \pm 36,72$ variando de 90 a 199; G = $207 \pm 38,80$, variando de 139 a 272; GNO2C = $156 \pm 28,86$, variando de 127 a 213; GNO3C = $172 \pm 35,41$, variando de 122 a 231; GNO4C = $150 \pm 27,86$, variando de 94 a 200; GAHNO4C = $132 \pm 11,08$, variando de 107 a 145. Existe diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

O grupo CE foi maior que o grupo GAHNO4C ($p < 0,01$) e semelhante aos demais grupos ($p > 0,05$). O grupo CI foi menor que o grupo G ($p < 0,001$) e este por sua vez, foi maior que os grupos GNO2C ($p < 0,01$), GNO4C e GAHNO4C ($p < 0,001$, em relação a ambos). O gráfico a seguir mostra a diferença estatística somente entre os grupos CE e G e os demais grupos, a fim de facilitar a visualização do resultado (Gráfico 2).

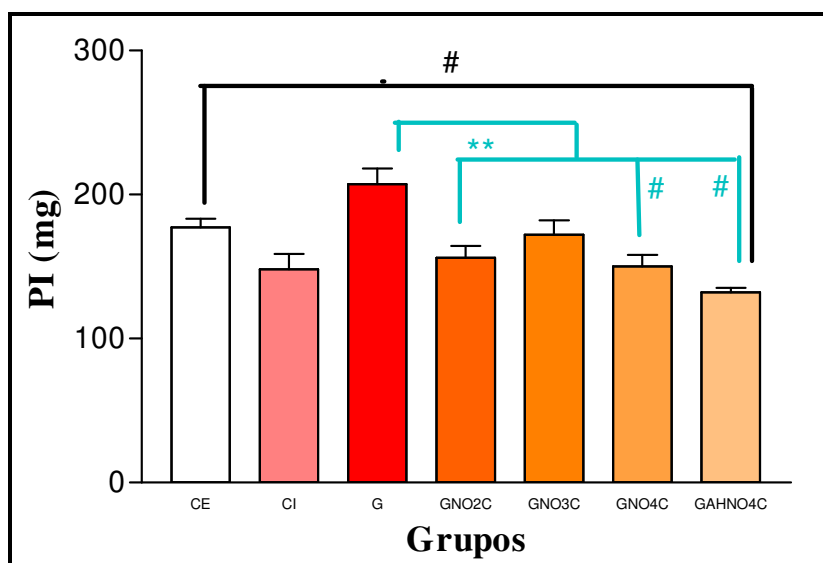


Gráfico 2 – Comparação entre as medidas do peso intestinal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4C) e Controle do feto com Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4C), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. ** ($p < 0,01$), # ($p < 0,001$).

As médias das relações PI/PC, em porcentagem, para os fetos dos sete grupos foram: CE = $3,00 \pm 0,24$ variando de 2,61 a 3,31; CI = $2,89 \pm 0,38$ variando de 2,10 a 3,42; G = $4,80 \pm 0,86$, variando de 3,32 a 5,51; GNO2C = $3,17 \pm 0,29$, variando de 2,81 a 3,66; GNO3C = $3,22 \pm 0,63$, variando de 2,64 a 4,93; GNO4C = $3,33 \pm 0,43$, variando de 2,80 a 4,13; GAHNO4C = $3,33 \pm 0,55$, variando de 2,81 a 4,51. Existe diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

Ao fazer a relação, o grupo G apresentou-se maior que os fetos controles de todos os grupos ($p < 0,001$, em relação a todos). O gráfico a seguir mostra a diferença estatística do grupo G com os demais grupos (Gráfico 3).

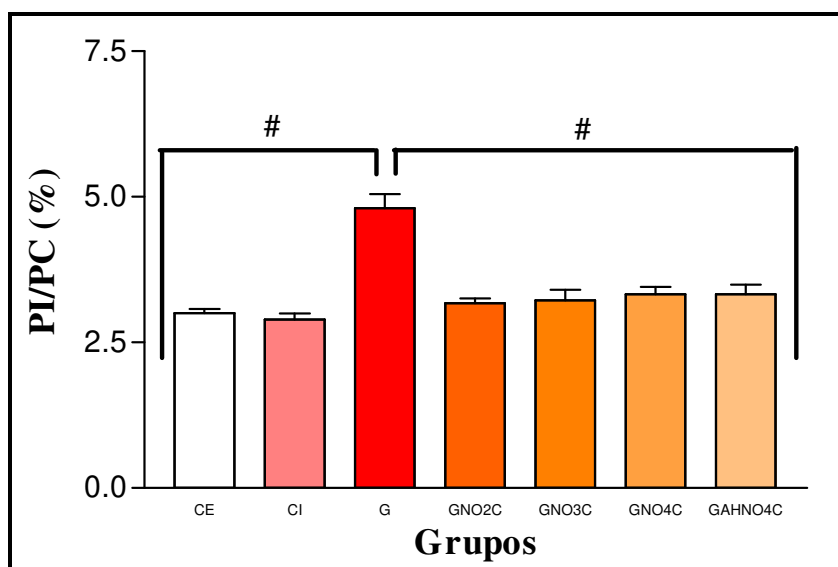


Gráfico 3 – Comparação entre as medidas da relação do peso intestinal/peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3C), Controle do feto com Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4C) e Controle do feto com Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4C), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. # ($p < 0,001$).

Tabela 3– Distribuição dos valores de PC, PI e da relação PI/PC para os grupos CE, CI, G e todos os controles dos grupos com diferentes dosagens de GSNO, expressos por médias $\pm$ desvio-padrão. PC: Peso Corporal; PI: Peso Intestinal; PI/PC: relação de Peso Intestinal pelo Peso Corporal; CE: Controle Externo; G: Gastrosquise; CI: Controle Interno; GNO2C: feto vizinho ao feto operado (Gastrosquise + 5 μ M de GSNO); GNO3C: feto vizinho ao feto operado (Gastrosquise + 0,5 μ M de GSNO); GNO4C: feto vizinho ao feto operado (Gastrosquise + 0,05 μ M de GSNO); GAHNO4C: feto vizinho ao feto operado (Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel + 0,05 μ M de GSNO).

	PC (g)	PI (g)	PI/PC (%)
CE	5,92 $\pm$ 0,51	0,18 $\pm$ 0,02	3,00 $\pm$ 0,24
G	4,39 $\pm$ 0,84	0,21 $\pm$ 0,04	4,80 $\pm$ 0,86
CI	5,13 $\pm$ 1,02	0,15 $\pm$ 0,04	2,89 $\pm$ 0,38
GNO2C	4,90 $\pm$ 0,74	0,16 $\pm$ 0,03	3,17 $\pm$ 0,29
GNO3C	5,36 $\pm$ 0,60	0,17 $\pm$ 0,04	3,22 $\pm$ 0,63
GNO4C	4,54 $\pm$ 0,81	0,15 $\pm$ 0,03	3,33 $\pm$ 0,43
GAHNO4C	4,04 $\pm$ 0,59	0,13 $\pm$ 0,01	3,33 $\pm$ 0,55

Grupos de comparação: **1** = CE x G; **2** = CE x GNO4C; **3** = CE x GAHNO4C; **4** = G x CI; **5** = G x GNO2C; **6** = G x GNO3C; **7** = G x GNO4C; **8** = G x GAHNO4C; **9** = CI x GAHNO4C; **10** = GNO4C x GAHNO4C.

Valores de p : **PC**: < 0,001^{1,2,3,10} e < 0,05^{4,9,6}; **PI**: < 0,001^{1,4,5,6,7,8}; **PI/PC**: < 0,001^{4,7,8} e < 0,01^{3,5} e < 0,05¹⁰.

Após a comparação realizada entre os fetos controles de todos os grupos com aplicação de GSNO, procedeu-se a análise das mesmas variáveis, porém com todos os grupos participantes do estudo. Neste caso também, o texto destaca a diferença entre CE, CI e G com os demais grupos para verificar a eficácia ou não dos tratamentos utilizados. O resultado da estatística na sua totalidade encontra-se na Tabela 4.

As médias de PC, em miligramas, para os fetos dos dez grupos foram: CE = $5916 \pm 506,89$, variando de 5070 a 6603; G = 4386 ± 842 , variando de 3237 a 5776; CI = 5126 ± 1019 , variando de 3355 a 6490; S = $4473 \pm 929,29$, variando de 3350 a 6138; GA = $4135 \pm 448,77$, variando de 3631 a 4562; GAH = $4461 \pm 705,38$, variando de 3422 a 5719; GNO2 = $4554 \pm 726,63$, variando de 3348 a 5120; GNO3 = $4533 \pm 730,85$, variando de 3348 a 5828; GNO4 = $4086 \pm 638,75$, variando de 3053 a 5110; GAHNO4 = $3715 \pm 401,29$, variando de 3055 a 4749. Existe diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

O grupo CE foi maior que os grupos G, S, GA, GAH, GNO2, GNO3, GNO4, GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos). O grupo CI também foi maior dos grupos GA, GNO4 ($p < 0,05$, em relação a ambos) e GAHNO4 ($p < 0,001$). O grupo G foi semelhante a todos os grupos ($p > 0,05$). Sendo assim, apenas CE se mostrou com maior peso com relação aos outros grupos. O gráfico a seguir mostra a diferença estatística somente entre os grupos CE e G e os demais grupos, a fim de facilitar a visualização do resultado (Gráfico 4).

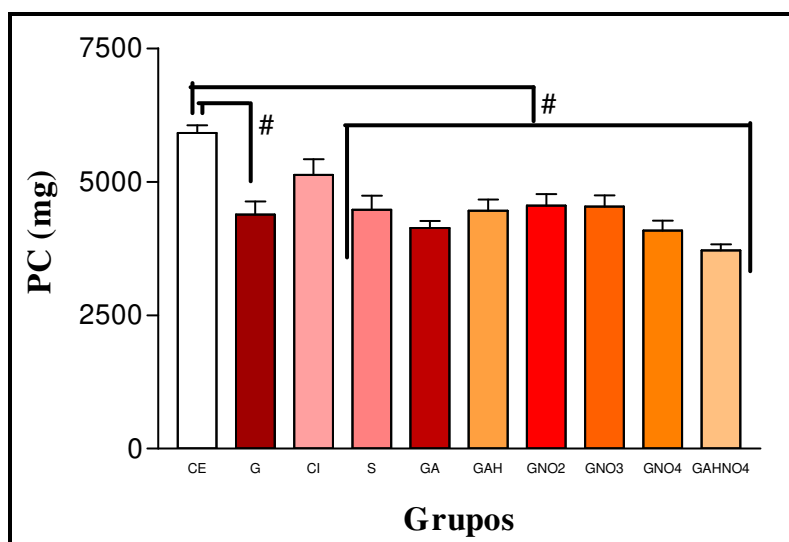


Gráfico 4 – Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. # ($p < 0,001$).

As médias de PI, em miligramas, para os fetos dos dez grupos foram: CE = $177 \pm 21,56$, variando de 155 a 216; G = $207 \pm 38,80$, variando de 139 a 272; CI = $148 \pm 36,72$, variando de 90 a 199; S = $141 \pm 31,68$, variando de 99 a 185; GA = $143 \pm 30,19$, variando de 88 a 188; GAH = $169 \pm 28,17$ variando de 128 a 213; GNO2 = $218 \pm 38,90$, variando de 137 a 259; GNO3 = $181 \pm 47,96$, variando de 134 a 278; GNO4 = $167 \pm 52,74$, variando de 94 a 261; GAHNO4 = $140 \pm 24,89$, variando de 99 a 176. Existe diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

O grupo CE foi semelhante a todos os grupos ($p > 0,05$). Já o grupo G foi maior que os grupos CI, GA ($p < 0,01$, em relação a ambos), S e GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a ambos). O grupo CI foi diferente apenas do grupo GNO2 ($p < 0,001$). O gráfico a seguir mostra a diferença estatística somente entre o grupo G e os demais grupos, uma vez que CE não teve diferença com nenhum (Gráfico 5).

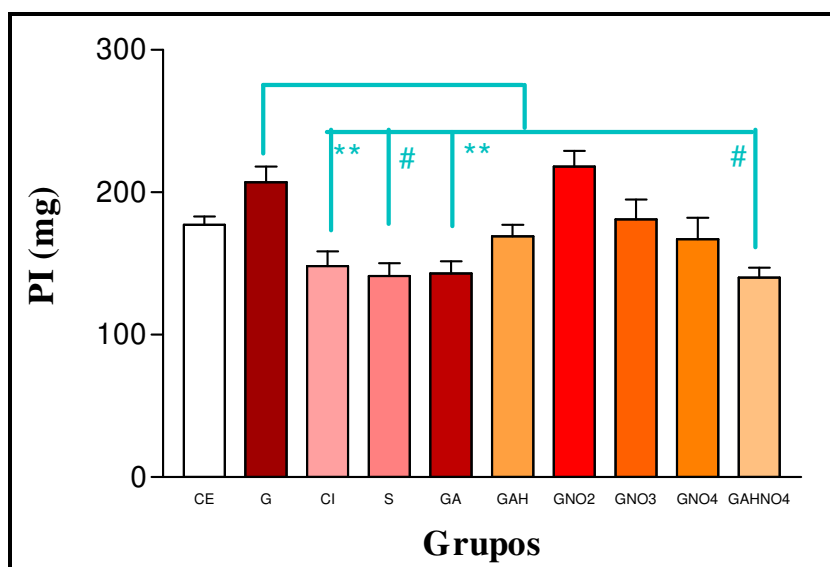


Gráfico 5 – Comparação entre as medidas do peso intestinal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. **($p < 0,01$) # ($p < 0,001$).

As médias das relações PI/PC, em porcentagem, para os fetos dos dez grupos foram: CE = $3,00 \pm 0,24$ variando de 2,61 a 3,31; G = $4,80 \pm 0,86$, variando de 3,32 a 5,51; CI = $2,89 \pm 0,38$ variando de 2,10 a 3,42; S = $3,22 \pm 0,85$, variando de 2,47 a 4,43; GA = $3,46 \pm 0,67$, variando de 2,22 a 4,61; GAH = $3,75 \pm 1,17$ variando de 2,24 a 6,24; GNO2 = $4,83 \pm 0,88$, variando de 3,79 a 6,77; GNO3 = $4,02 \pm 0,95$, variando de 2,87 a 5,79; GNO4 = $4,04 \pm 0,85$, variando de 2,89 a 5,94; GAHNO4 = $3,76 \pm 0,54$, variando de 2,93 a 4,56. Existe diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

A relação PI/PC do grupo CE foi menor que dos grupos G, GNO2 ($p < 0,001$) e GNO4 ($p < 0,05$). O grupo G foi maior que os grupos CI, S, ($p < 0,001$, em relação a ambos), GA ($p < 0,01$), GAH e GAHNO4 ($p < 0,05$). Já o grupo CI também foi menor que os grupos GNO2 ($p < 0,001$), GNO3 e GNO4 ($p < 0,05$, em relação a ambos). Os únicos grupos tratados que foram

iguais a CE e CI e ao mesmo tempo diferente de G, foram os grupos GA, GAH e GAHNO4. O gráfico a seguir mostra a diferença estatística somente entre os grupos CE e G e os demais grupos, a fim de facilitar a visualização do resultado (Gráfico 6).

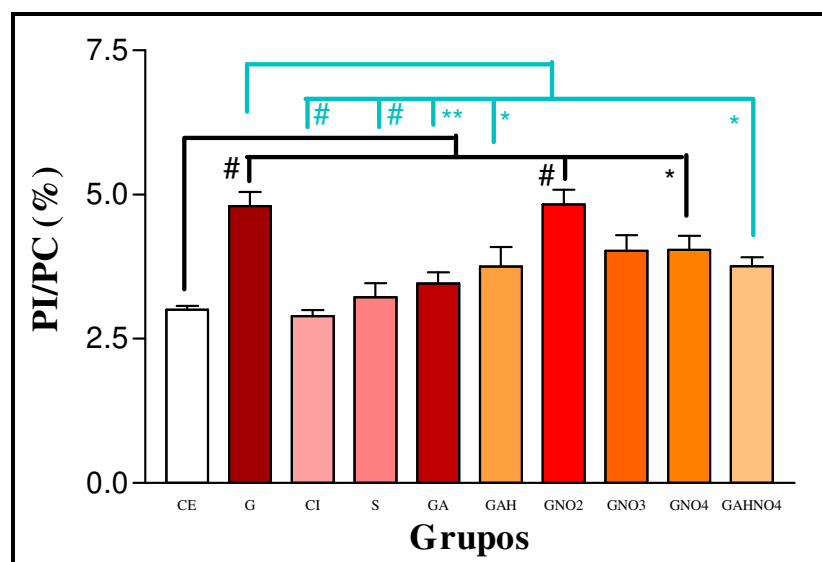


Gráfico 6 – Comparação entre as medidas da relação peso intestinal/peso corporal dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4), com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. * ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$) # ($p < 0,001$).

Tabela 4 – Distribuição dos valores de PC, PI e da relação PI/PC para todos os grupos de estudo, expressos por médias $\pm$ desvio-padrão. PC: Peso Corporal; PI: Peso Intestinal; PI/PC: relação de Peso Intestinal pelo Peso Corporal; CE: Controle Externo; G: Gastrosquise; CI: Controle Interno; S: Sham; GA: Gastrosquise + Adesivo; GAH: Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel; GNO2: Gastrosquise + 5 μ M de GSNO; GNO3: Gastrosquise + 0,5 μ M de GSNO; GNO4: Gastrosquise + 0,05 μ M de GSNO; GAHNO4: Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel + 0,05 μ M de GSNO.

	PC (g)	PI (g)	PI/PC (%)
CE	5,92 $\pm$ 0,51	0,18 $\pm$ 0,02	3,00 $\pm$ 0,24
G	4,39 $\pm$ 0,84	0,21 $\pm$ 0,04	4,80 $\pm$ 0,86
CI	5,13 $\pm$ 1,02	0,15 $\pm$ 0,04	2,89 $\pm$ 0,38
S	4,47 $\pm$ 0,93	0,14 $\pm$ 0,03	3,22 $\pm$ 0,85
GA	4,14 $\pm$ 0,45	0,14 $\pm$ 0,03	3,46 $\pm$ 0,67
GAH	4,46 $\pm$ 0,71	0,17 $\pm$ 0,03	3,75 $\pm$ 1,17
GNO2	4,55 $\pm$ 0,73	0,22 $\pm$ 0,04	4,83 $\pm$ 0,88
GNO3	4,53 $\pm$ 0,73	0,18 $\pm$ 0,05	4,02 $\pm$ 0,95
GNO4	4,09 $\pm$ 0,64	0,17 $\pm$ 0,05	4,04 $\pm$ 0,85
GAHNO4	3,72 $\pm$ 0,40	0,14 $\pm$ 0,02	3,76 $\pm$ 0,54

Grupos de comparação: **1** = CE x G; **2** = CE x CI; **3** = CE x S; **4** = CE x GA; **5** = CE x GAH; **6** = CE x GNO2; **7** = CE x GNO3; **8** = CE x GNO4; **9** = CE x GAHNO4; **10** = G x CI; **11** = G x S; **12** = G x GA; **13** = G x GAH; **14** = G x GAHNO4; **15** = CI x GA; **16** = CI x GNO2; **17** = CI x GNO3; **18** = CI x GNO4; **19** = CI x GAHNO4; **20** = S x GNO2; **21** = GA x GNO2; **22** = GAH x GNO2; **23** = GNO2 x GNO4; **24** = GNO2 x GAHNO4.

Valores de *p*: **PC**: < 0,001^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,19} e < 0,05^{15,18}; **PI**: < 0,001^{11,14,16,20,21,24} e < 0,01^{10,12} e < 0,05^{22,23}; **PI/PC**: < 0,001^{1,6,10,11,16,20} e < 0,01^{12,21} e < 0,05^{8,13,14,17,18,22,24}.

5.2. Análise da morfometria intestinal

Para esta análise, o texto faz referencia somente entre as diferenças dos grupos CE, CI e G com os demais, pois se trata de grupos com fetos saudáveis e doentes, para assim verificar se o tratamento foi eficiente ou não. O resultado da estatística entre todos os grupos estudados encontra-se na Tabela 5. O método utilizado também foi ANOVA seguido de pós-teste de Tukey-Kramer e o nível de significância foi estabelecido em 0,05.

As medidas em micrômetros (μm) obtidas para as quatro medidas do diâmetro nos fetos dos dez grupos estudados foram: Diâmetro Externo I: CE = $749,34 \pm 111,85$ variando de 630,32 a 963,94; G = $1314,00 \pm 72,03$ variando de 1210,82 a 1432,82; CI = $812,23 \pm 80,94$ variando de 703,97 a 917,04; S = $897,38 \pm 123,59$ variando de 691,96 a 1025,71; GA = $1220,12 \pm 324,73$ variando de 1155,69 a 1450,79; GAH = $817,51 \pm 94,68$ variando de 692,93 a 965,85; GNO2 = $1275,57 \pm 177,64$ variando de 1032,50 a 1562,30; GNO3 = $1101,52 \pm 190,53$ variando de 821,41 a 1309,64; GNO4 = $816,20 \pm 98,55$ variando de 706,85 a 1078,71 e GAHNO4 = $815,42 \pm 126,34$ variando de 632,38 a 1042,61. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

O Diâmetro Externo I do grupo CE foi menor que dos grupos G, GA, GNO2 e GNO3 ($p < 0,001$, em relação a todos). O grupo CI se apresentou menor que os grupos GA, GNO2 e GNO3 ($p < 0,001$, em relação a todos). Entretanto, o Diâmetro Externo I do grupo G foi maior que dos grupos CI, S, GAH, GANO4 e GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos). Sendo assim, os grupos tratados que possuem menor diâmetro e semelhantes aos controles CE e CI são GAH, GNO4 e GAHNO4 (Gráfico 7).

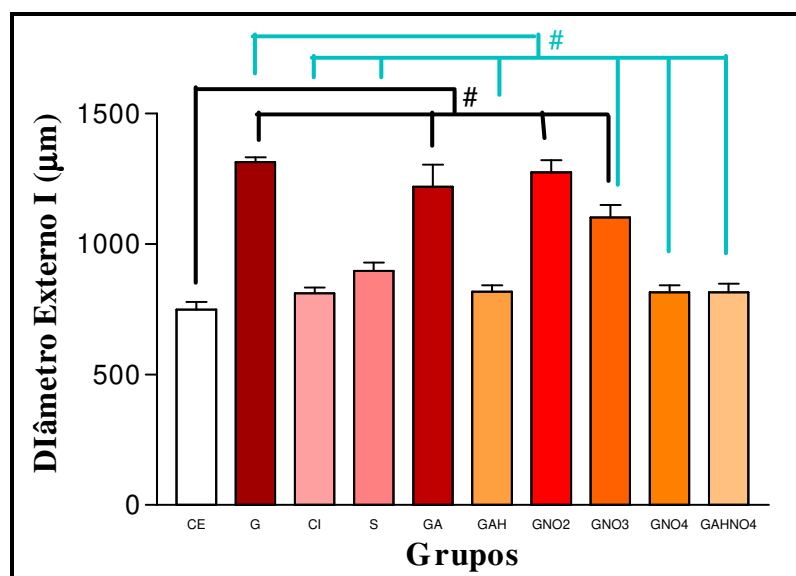


Gráfico 7 – Diâmetro Externo I, em μm , em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a $5 \mu\text{M}$ (GNO2), Gastrosquise e GSNO a $0,5 \mu\text{M}$ (GNO3), Gastrosquise e GSNO a $0,05 \mu\text{M}$ (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a $0,05 \mu\text{M}$ (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$).

Os valores de Diâmetro Externo II foram: CE = $657,30 \pm 89,79$ variando de 597,22 a 857,20; G = $1206,38 \pm 46,81$ variando de 1126,46 a 1287,17; CI = $759,20 \pm 35,13$ variando de 699,08 a 803,34; S = $792,53 \pm 77,65$ variando de 681,62 a 883,94; GA = $1196,57 \pm 123,80$ variando de 990,75 a 1391,87; GAH = $769,03 \pm 64,60$ variando de 677,65 a 911,81; GNO2 = $1087,34 \pm 123,88$ variando de 959,20 a 1393,77; GNO3 = $891,05 \pm 132,30$ variando de 694,32 a 1202,33; GNO4 = $690,94 \pm 80,66$ variando de 583,85 a 855,26 e GAHNO4 = $650,87 \pm 127,97$ variando de 485,72 a 890,10. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

O Diâmetro Externo II dos grupos CE e CI foi menor que dos grupos G, GA, GNO2 e GNO3 ($p < 0,001$, em relação a todos). Além dos grupos CE e CI, o grupo G também foi maior que os grupos S, GAH, GNO3, GNO4 e GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos). Sendo assim,

os grupos tratados que possuem menor diâmetro e semelhantes aos controles CE e CI são GAH, GNO4 e GAHNO4 (Gráfico 8).

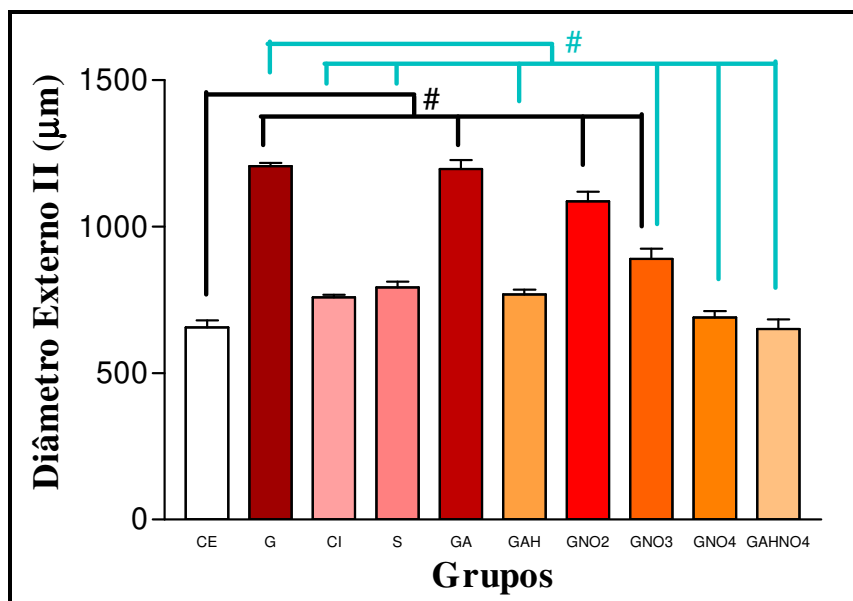


Gráfico 8 – Diâmetro Externo II, em µm, em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 µM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 µM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 µM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 µM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$).

Os valores de Diâmetro Interno I foram: CE = $652,95 \pm 106,68$ variando de 527,70 a 833,42; G = $1109,44 \pm 86,02$ variando de 1007,01 a 1247,77; CI = $711,68 \pm 86,16$ variando de 600,93 a 813,03; S = $771,95 \pm 120,24$ variando de 576,78 a 892,90; GA = $1057,41 \pm 57,14$ variando de 950,79 a 1187,34; GAH = $702,57 \pm 70,32$ variando de 602,79 a 821,23; GNO2 = $1124,69 \pm 167,83$ variando de 911,11 a 1384,49; GNO3 = $892,35 \pm 191,87$ variando de 667,70 a 1230,32; GNO4 = $684,05 \pm 74,09$ variando de 593,61 a 817,17 e GAHNO4 = $724,00 \pm 103,92$ variando de 583,94 a 919,16. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

O Diâmetro Interno I do grupo CE foi menor que dos grupos G, GA, GNO2 e GNO3 ($p < 0,001$, em relação a todos). O grupo CI também foi menor que os mesmos grupos ($p < 0,001$, em relação a todos), com exceção do grupo GNO3, ao qual foi semelhante ($p < 0,05$). Por sua vez, o grupo G também foi maior que os grupos S, GAH, GNO2, GNO3, GNO4 e GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos). Sendo assim, por mais uma vez, os grupos tratados que possuem menor diâmetro e semelhantes aos controles CE e CI são GAH, GNO4 e GAHNO4 (Gráfico 9).

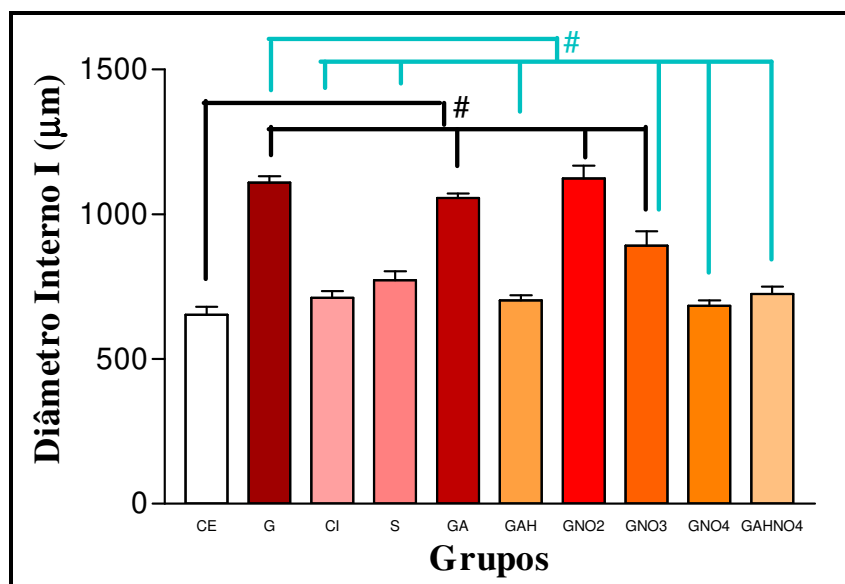


Gráfico 9 – Diâmetro Interno I, em µm, em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 µM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 µM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 µM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 µM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$).

Os valores de Diâmetro Interno II foram: CE = $576,39 \pm 69,80$ variando de 529,07 a 746,88; G = $1013,62 \pm 78,39$ variando de 865,99 a 1112,40; CI = $682,00 \pm 55,75$ variando de 615,50 a 786,46; S = $691,58 \pm 94,84$ variando de 543,35 a 797,73; GA = $999,95 \pm 92,02$ variando de 829,00 a 1163,03; GAH = $661,15 \pm 65,95$ variando de 576,71 a 789,80; GNO2 = $957,28 \pm$

135,90 variando de 814,35 a 1254,48; GNO3 = 711,57 ± 144,76 variando de 532,94 a 1023,24; GNO4 = 593,15 ± 99,73 variando de 492,30 a 878,40 e GAHNO4 = 546,80 ± 82,09 variando de 424,22 a 654,30. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

O Diâmetro Interno II do grupo CE foi menor que dos grupos S ($p < 0,05$), G, GA, GNO2 ($p < 0,001$, em relação a todos) e GNO3 ($p < 0,01$). O grupo CI foi menor que os grupos G, GA, GNO2 ($p < 0,001$, em relação a todos) e GAHNO4 ($p < 0,01$). Por sua vez, o grupo G também foi maior que os grupos S, GAH, GNO3, GNO4 e GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos). Sendo assim, novamente, os grupos tratados que possuem menor diâmetro e semelhantes aos controles CE e CI são GAH, GNO4 e GAHNO4 (Gráfico 10).

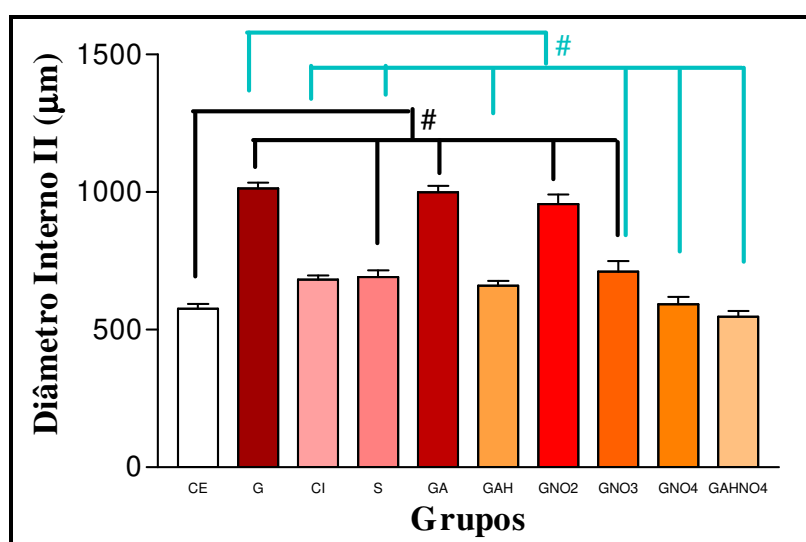


Gráfico 10 – Diâmetro Interno II, em µm, em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 µM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 µM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 µM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 µM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$).

A figura 10 mostra os diâmetros dos cortes histológicos dos dez grupos.

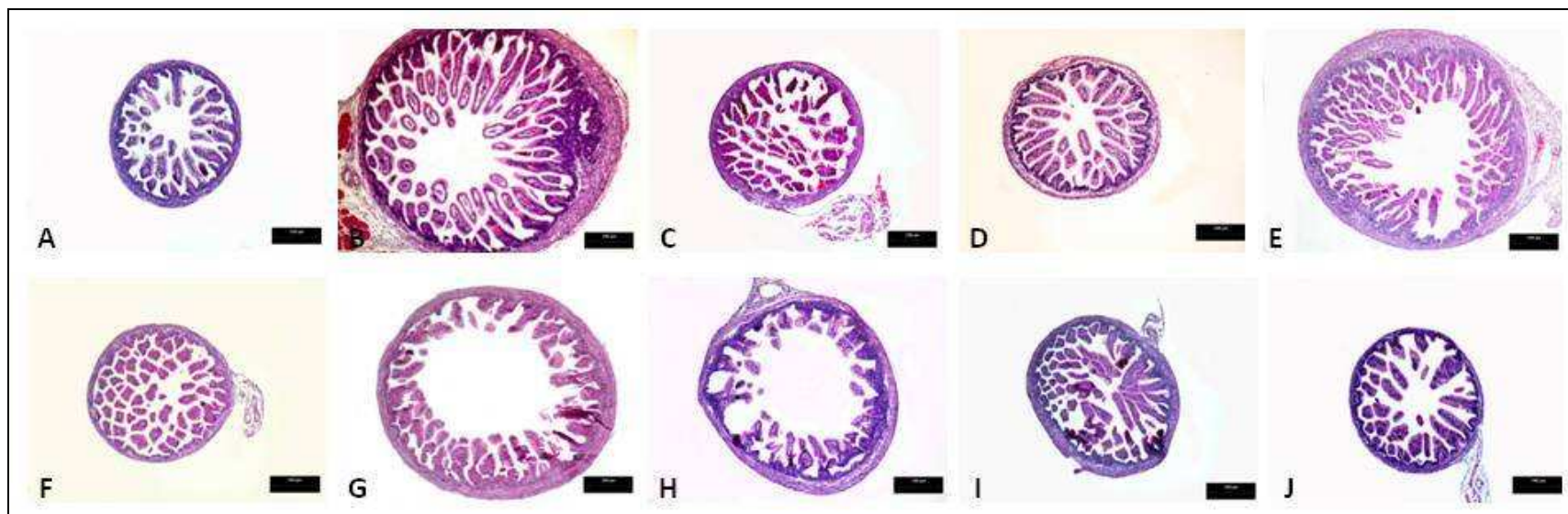


Figura 10 – Fotomicrografia dos diâmetros dos intestinos dos fetos dos dez grupos. **A** – Controle Externo (CE); **B** – Gastrosquise (G); **C** – Controle Interno (CI); **D** – Sham (S); **E** – Gastrosquise e adesivo (GA); **F** – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); **G** – Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2); **H** - Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3); **I** - Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4); **J** – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4). Nota-se que os intestinos dos fetos dos grupos G, GA e GNO2 são maiores que dos outros grupos, enquanto que os grupos GAH, GNO4 e GAHNO4 apresentam diâmetro menor igual aos grupos CE e CI. Barra de 200 μm .

As medidas, em μm , obtidas para a espessura total da parede intestinal foram: CE = $52,39 \pm 9,64$ variando de 39,22 a 73,54; G = $122,95 \pm 20,04$ variando de 88,57 a 154,16; CI = $58,64 \pm 10,67$ variando de 35,90 a 80,76; S = $60,57 \pm 12,59$ variando de 36,80 a 90,32; GA = $99,67 \pm 12,26$ variando de 80,38 a 126,48; GAH = $59,52 \pm 11,02$ variando de 32,71 a 59,49; GNO2 = $91,25 \pm 22,33$ variando de 57,17 a 143,91; GNO3 = $93,70 \pm 22,13$ variando de 53,79 a 136,72; GNO4 = $95,23 \pm 32,99$ variando de 56,13 a 193,56 e GAHNO4 = $64,11 \pm 14,03$ variando de 43,03 a 90,92. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

A espessura total da parede dos grupos CE e CI foi menor que dos grupos G, GA, GNO2, GNO3 e GNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos). O grupo G se mostrou diferente de todos os grupos envolvidos no estudo ($p < 0,001$, em relação a todos). Todas as camadas na G tiveram aumento na espessura, começando pela serosa, uma vez que a inflamação começa de fora para dentro (Gráfico 11 e Figura 11).

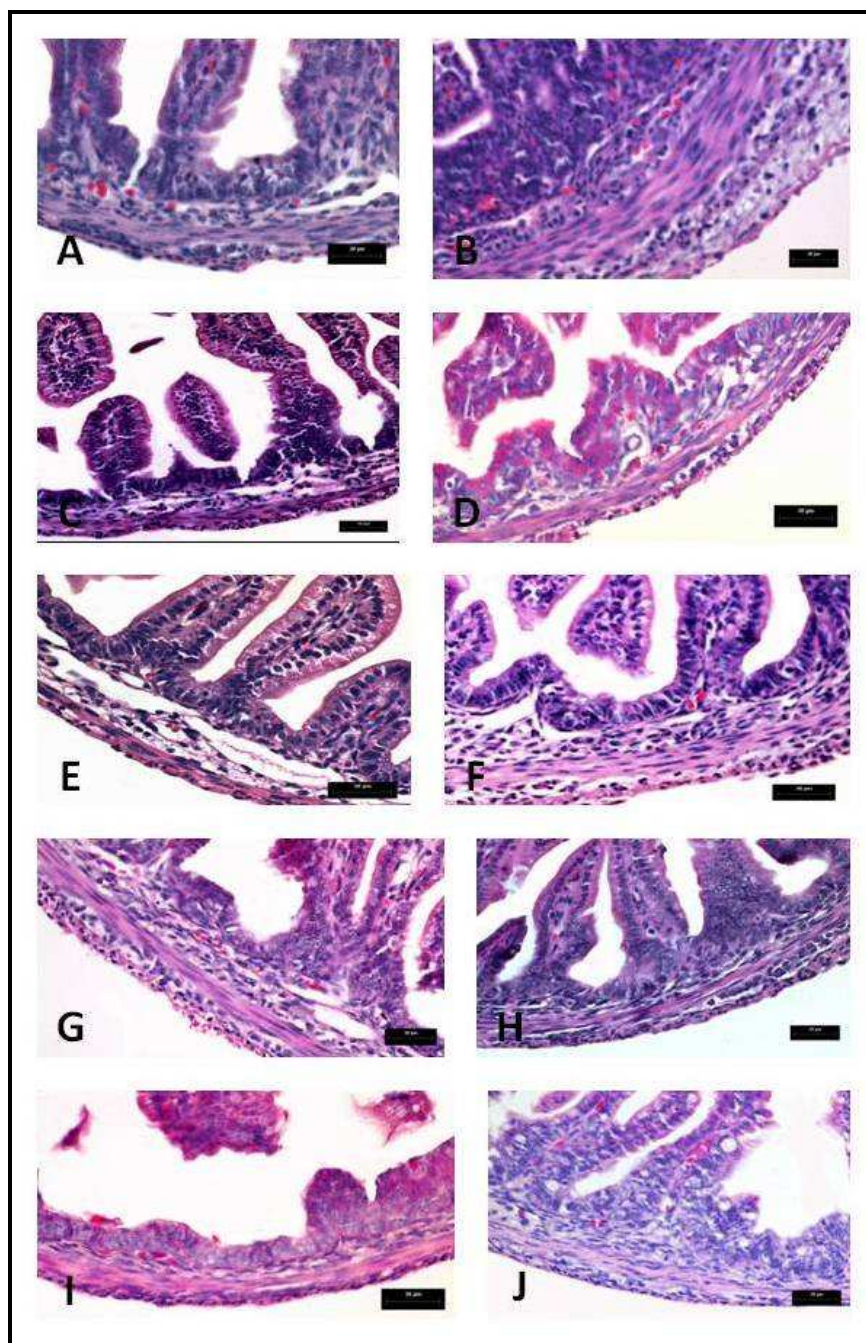


Figura 11 – Fotomicrografia das paredes intestinais dos fetos dos dez grupos. **A** – Controle Externo (CE); **B** – Gastrosquise (G); **C** – Controle Interno (CI); **D** – Sham (S); **E** – Gastrosquise e adesivo (GA); **F** – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); **G** – Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2); **H** - Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3); **I** - Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4); **J** – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4). As paredes dos grupos GAH e GAHNO4 são iguais dos grupos CE e CI. Barras de 30 μ m.

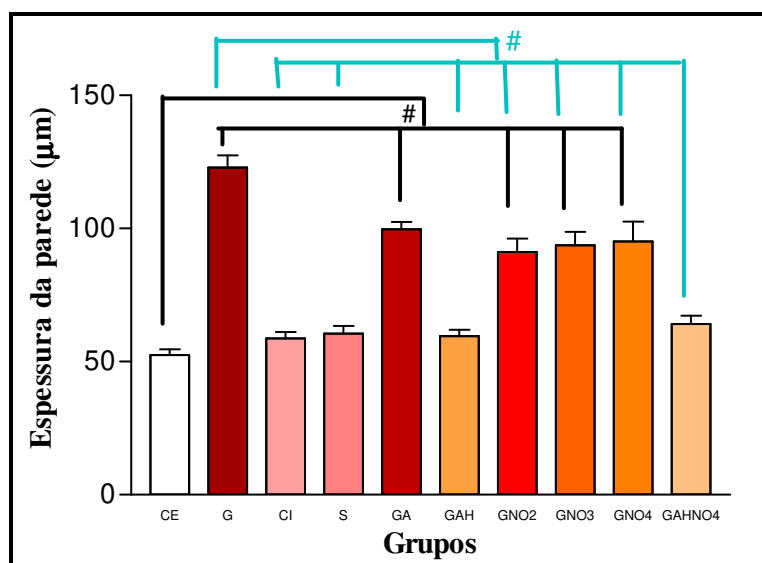


Gráfico 11 – Espessura, em μm , da parede intestinal em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a $5 \mu\text{M}$ (GNO2), Gastrosquise e GSNO a $0,5 \mu\text{M}$ (GNO3), Gastrosquise e GSNO a $0,05 \mu\text{M}$ (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a $0,05 \mu\text{M}$ (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$).

As medidas, em μm , obtidas para a espessura da serosa foram: CE = $3,07 \pm 0,74$ variando de 1,16 a 4,06; G = $4,98 \pm 1,32$ variando de 3,34 a 8,86; CI = $2,47 \pm 0,46$ variando de 1,80 a 3,40; S = $3,42 \pm 1,06$ variando de 1,33 a 5,21; GA = $4,58 \pm 0,85$ variando de 3,40 a 6,55; GAH = $3,48 \pm 0,66$ variando de 2,53 a 4,95; GNO2 = $4,78 \pm 1,28$ variando de 2,54 a 7,61; GNO3 = $4,60 \pm 1,36$ variando de 2,83 a 6,75; GNO4 = $4,01 \pm 1,12$ variando de 2,11 a 6,70 e GAHNO4 = $3,16 \pm 1,08$ variando de 1,89 a 5,68. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

A espessura da serosa do grupo CE foi menor que dos grupos G, GA, GNO2 e GNO3 ($p < 0,001$, em relação a todos). O grupo CI se mostrou menor que os mesmos grupos acima e também do grupo GNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos). O grupo G se mostrou maior também aos grupos S, GAH e GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos) (Gráfico 12 e Figura 12).

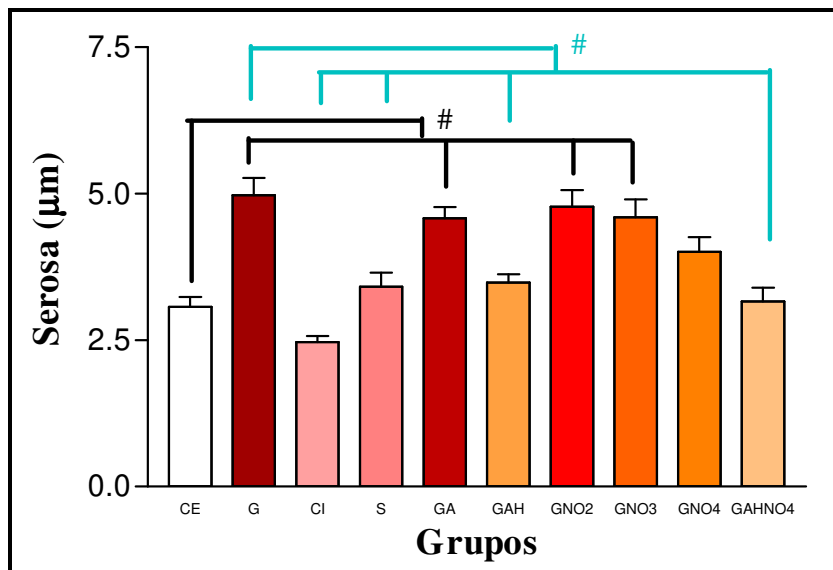


Gráfico 12 – Espessura, em μm , da camada serosa em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a $5 \mu\text{M}$ (GNO2), Gastrosquise e GSNO a $0,5 \mu\text{M}$ (GNO3), Gastrosquise e GSNO a $0,05 \mu\text{M}$ (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a $0,05 \mu\text{M}$ (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$).

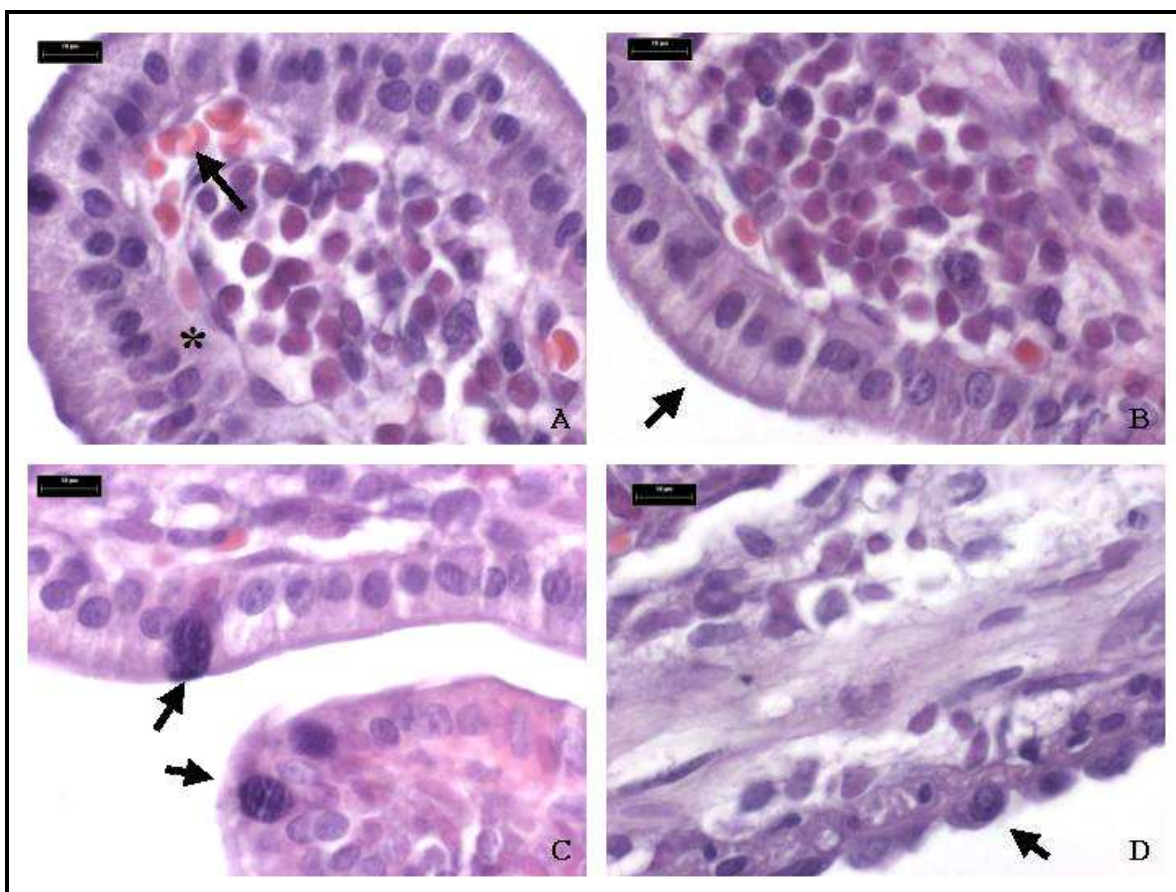


Figura 12 – Fotomicrografia da vilosidade intestinal e da camada serosa na G. **A** – Vilosidade intestinal evidenciando o epitélio prismático (*) e o tecido conjuntivo com hemáceas (seta). **B** – Epitélio de revestimento possui as células com bordas estriadas, constituídas por microvilos para aumentar a absorção (seta). **C** – Célula caliciforme em evidência (setas). **D** – Na G, a camada serosa é a primeira que aumenta em espessura (seta). Barra de 10 µm.

As medidas, em µm, obtidas para a espessura da muscular longitudinal foram: CE = $6,45 \pm 1,40$ variando de 4,35 a 10,35; G = $16,60 \pm 3,43$ variando de 10,03 a 24,25; CI = $5,62 \pm 0,98$ variando de 4,03 a 7,61; S = $7,65 \pm 2,32$ variando de 4,86 a 13,58; GA = $12,67 \pm 2,11$ variando de 8,12 a 17,17; GAH = $8,08 \pm 1,46$ variando de 4,86 a 11,05; GNO2 = $13,75 \pm 4,04$ variando de 6,60 a 21,53; GNO3 = $12,81 \pm 3,82$ variando de 5,19 a 18,89; GNO4 = $11,56 \pm 3,15$ variando de 5,97 a 17,90 e GAHNO4 = $8,10 \pm 3,39$ variando de 3,40 a 14,65. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

A espessura da camada muscular longitudinal dos grupos CE e CI foi menor que dos grupos G, GA, GNO2, GNO3 e GNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos). Entretanto, o grupo G se mostrou maior também aos grupos S, GA, GAH e GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos) (Gráfico 13).

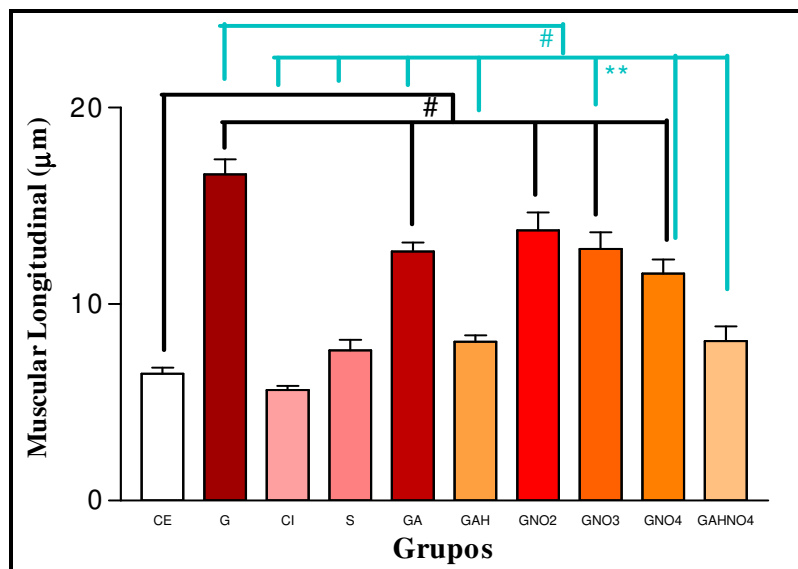


Gráfico 13 – Espessura, em μm , da camada muscular longitudinal em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a $5 \mu\text{M}$ (GNO2), Gastrosquise e GSNO a $0,5 \mu\text{M}$ (GNO3), Gastrosquise e GSNO a $0,05 \mu\text{M}$ (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a $0,05 \mu\text{M}$ (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. ** ($p < 0,01$) # ($p < 0,001$).

As medidas em μm obtidas para a espessura da muscular circular foram: CE = $11,34 \pm 3,02$ variando de 8,50 a 19,75; G = $38,16 \pm 9,36$ variando de 20,60 a 51,64; CI = $11,84 \pm 1,98$ variando de 8,14 a 16,35; S = $14,11 \pm 5,18$ variando de 8,06 a 31,28; GA = $26,58 \pm 4,06$ variando de 19,35 a 37,76; GAH = $13,97 \pm 3,04$ variando de 6,55 a 18,78; GNO2 = $20,91 \pm 6,67$ variando de 9,68 a 37,08; GNO3 = $24,87 \pm 9,64$ variando de 10,38 a 47,93; GNO4 = $23,91 \pm 8,33$ variando

de 9,92 a 40,38 e GAHNO4 = 13,92 ± 4,82 variando de 8,00 a 29,34. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

A espessura da camada circular dos grupos CE e CI foi menor que dos grupos G, GA, GNO2, GNO3 e GNO4 ($p < 0,001$, em relação a ambos). Já o grupo G também apresentou-se maior que os grupos S, GA, GAH, GNO4, GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a ambos) e GNO3 ($p < 0,01$) (Gráfico 14).

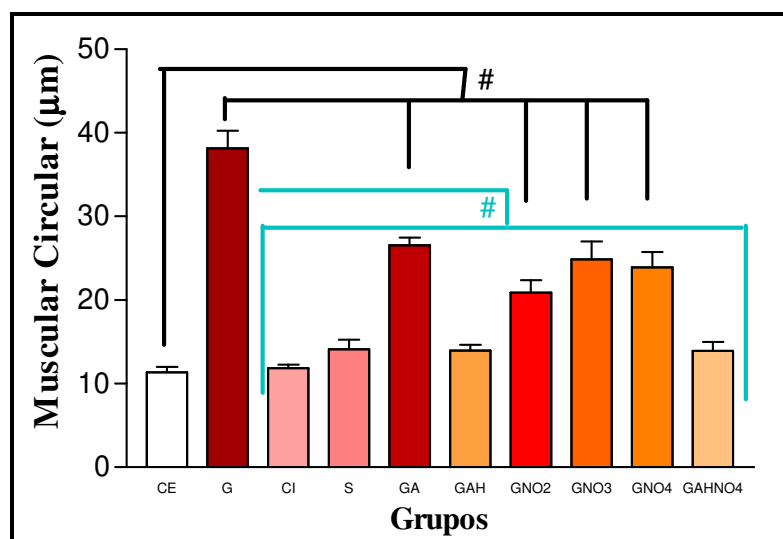


Gráfico 14 – Espessura, em µm, da camada muscular circular em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 µM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 µM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 µM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 µM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$).

As medidas, em µm, obtidas para a espessura da submucosa e mucosa foram: CE = 31,38 ± 8,13 variando de 18,40 a 55,23; G = 58,33 ± 19,22 variando de 23,70 a 99,40; CI = 36,81 ± 8,53 variando de 14,53 a 63,50; S = 35,68 ± 10,23 variando de 18,20 a 53,63; GA = 53,85 ± 7,40 variando de 34,92 a 68,68; GAH = 32,45 ± 4,66 variando de 23,88 a 40,59; GNO2 = 50,98 ± 17,13 variando de 20,88 a 81,46; GNO3 = 50,27 ± 15,46 variando de 31,26 a 86,82; GNO4 =

51,22 ± 17,06 variando de 22,84 a 90,98 e GAHNO4 = 39,35 ± 10,19 variando de 21,74 a 61,11. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$).

A espessura da mucosa e submucosa do grupo CE foi menor que dos grupos G, GA, GNO2, GNO3 e GNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos). O grupo CI também foi menor que os grupos G ($p < 0,001$), GA ($p < 0,01$), GNO2, GNO3 e GNO4 ($p < 0,05$, em relação a todos). Entretanto, o grupo G foi, além de CE e CI, maior que os grupos S, GAH e GAHNO4 ($p < 0,001$, em relação a todos) (Gráfico 15).

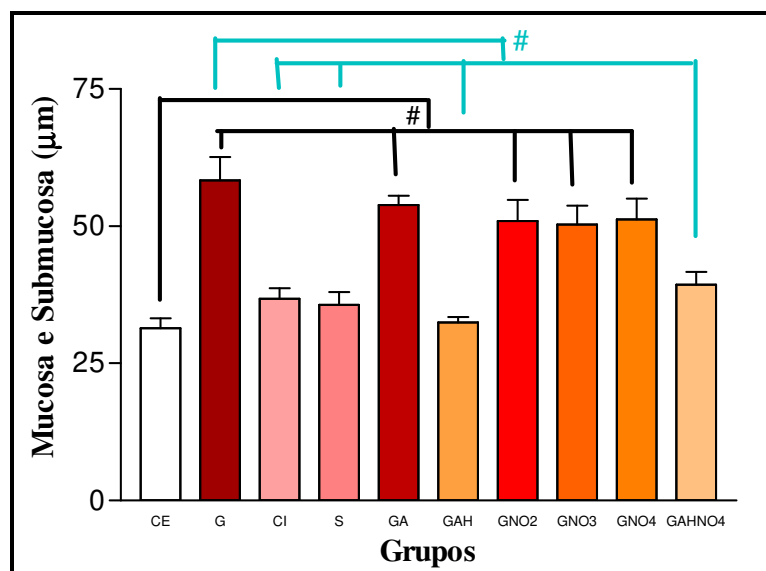


Gráfico 15 – Espessura, em μm , das camadas submucosa e mucosa juntas em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4) com desvio padrão e diferença estatística. Traçado preto, diferença do grupo CE com demais grupos. Traçado azul, diferença do grupo G com demais grupos. # ($p < 0,001$).

A tabela 5 apresenta todos os resultados morfométricos dos diâmetros e das camadas dos grupos estudados. O método utilizado foi ANOVA seguido de pós-teste de Tukey-Kramer e o nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Tabela 5 – Distribuição dos valores de DE-I, DE-II, DI-I, DI-II, ETP, SE, CML, CMC e CMS para todos os grupos de estudo, expressos por médias $\pm$ desvio-padrão.

CE: Controle Externo; G: Gastrosquise; CI: Controle Interno; S: Sham; GA: Gastrosquise + Adesivo; GAH: Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel; GNO2: Gastrosquise + 5 μ M de GSNO; GNO3: Gastrosquise + 0,5 μ M de GSNO; GNO4: Gastrosquise + 0,05 μ M de GSNO; GAHNO4: Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel + 0,05 μ M de GSNO;
DE-I: Diâmetro Externo I; DI-I: Diâmetro Interno I; DE-II: Diâmetro Externo II; DI-II: Diâmetro Interno 2; ETP: Espessura Total da Parede; SE: Serosa; CML: Camada Muscular Longitudinal; CMC: Camada Muscular Circular; CMS: Camadas Mucosa e Submucosa.

Grupos de comparação: **1** = CE x G; **2** = CE x GA; **3** = CE x GNO2; **4** = CE x GNO3; **5** = CE x GNO4; **6** = G x CI; **7** = G x S; **8** = G x GA; **9** = G x GAH; **10** = G x GNO2; **11** = G x GNO3; **12** = G x GNO4; **13** = G x GAHNO4; **14** = CI x S; **15** = CI x GA; **16** = CI x GAH; **17** = CI x GNO2; **18** = CI x GNO3; **19** = CI x GNO4; **20** = CI x GAHNO4; **21** = S x GA; **22** = S x GNO3; **23** = S x GNO4; **24** = S x GAHNO4; **25** = GA x GAH; **26** = GA x GNO2; **27** = GA x GNO3; **28** = GA x GNO4; **29** = GA x GAHNO4; **30** = GAH x GNO2; **31** = GAH x GNO3; **32** = GAH x GNO4; **33** = GAH x GAHNO4; **34** = GNO2 x GNO3; **35** = GNO2 x GNO4; **36** = GNO2 x GAHNO4; **37** = GNO3 x GNO4; **38** = GNO3 x GAHNO4; **39** = GNO4 x GAHNO4.

Valores de *p*: **DE-I:** < 0,001^{1,3,4,5,7,8,10,13,14,16,19,20,22, 24,28,31,32,33,34,38,39,40,41};
DI-I: < 0,001^{1,3,4,5,7,15,16,17,18,19,20,21, 22,24,28,31,32,33,34,37,38,39} e < 0,01^{30,41};
DE-II: < 0,001^{1,3,4,5,7,8,10,12,13,14,16,18,19, 22,28,30,31,32,33,37,38,39,41} e < 0,01²⁷ e < 0,05^{34,36};
DI-II: < 0,001^{1,3,4,7,8,10,12,13,14,16,18, 22,24,28,30,31,32,33,37,38,39,41} e < 0,01^{5,21,27} e < 0,05^{52,36,40}
ETP: < 0,001^{1,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13,14,16,18,19, 20,22,24,25,26,28,32,33,34,35,39,41,42} e < 0,01⁹
SE: < 0,001^{1,3,4,5,7,8,10,14,16,18,19,20,39,41} e < 0,01^{24,32,33} e < 0,05^{22,25,28,34}
CML: < 0,001^{1,3,4,5,6,7,8,9,10,13,14,16,18,19, 20,22,24,25,26,32,33,34,39,41} e < 0,01^{12,35,42}
CMC: < 0,001^{1,3,4,5,6,7,8,9,10,13,14,16,18,19, 20,22,25,26,28,32,34,35,39,41,42} e < 0,01²⁴ e < 0,05^{33,39}
CMS: < 0,001^{1,3,4,5,6,7,8,10,14,22,28} e < 0,01^{16,24,26} e < 0,05^{18,19,20,25,36}

	CE	G	CI	S	GA	GAH	GNO2	GNO3	GNO4	GAHNO4
DE-I	749 ±	1314,00 ±	812,2±	897,38 ±	1220,12 ±	817,51 ±	1275,57 ±	1101,52 ±	816,20 ±	815,42 ±
	111,85	72,03	80,94	123,59	324,73	94,68	177,64	190,53	98,55	126,34
DI-I	652,95 ±	1109,44 ±	711,68 ±	771,95 ±	1057,41 ±	702,57 ±	1124,69 ±	892,35 ±	684,05 ±	724,00 ±
	106,68	86,02	86,16	120,24	57,14	70,32	167,83	191,87	74,09	103,92
DE-II	657,30 ±	1206,38 ±	759,20 ±	792,53 ±	1196,57 ±	769,03 ±	1087,34 ±	891,05 ±	690,94 ±	650,87 ±
	89,79	46,81	35,13	77,65	123,80	64,60	123,88	132,30	80,66	127,97
DI-II	576,39 ±	1013,62 ±	682,00 ±	691,58 ±	999,95 ±	661,15 ±	957,28 ±	711,57 ±	593,15 ±	546,80 ±
	69,80	78,39	55,75	94,84	92,02	65,95	135,90	144,76	99,73	82,09
ETP	52,39 ±	122,95 ±	58,64 ±	60,57 ±	99,67 ±	59,52 ±	91,25 ±	93,70 ±	95,23 ±	64,11 ±
	9,64	20,04	10,67	12,59	12,26	11,02	22,33	22,13	32,99	14,03
SE	3,07 ±	4,98 ±	2,47 ±	3,42 ±	4,58 ±	3,48 ±	4,78 ±	4,60 ±	4,01 ±	3,16 ±
	0,74	1,32	0,46	1,06	0,85	0,66	1,28	1,36	1,12	1,08
CML	6,45 ±	16,60 ±	5,62 ±	7,65 ±	12,67 ±	8,08 ±	13,75 ±	12,81 ±	11,56 ±	8,10 ±
	1,40	3,43	0,98	2,32	2,11	1,46	4,04	3,82	3,15	3,39
CMC	11,34 ±	38,16 ±	11,84 ±	14,11 ±	26,58 ±	13,97 ±	20,91 ±	24,87 ±	23,91 ±	13,92 ±
	3,02	9,36	1,98	5,18	4,06	3,04	6,67	9,64	8,33	4,82
CMS	31,38 ±	58,33 ±	36,81 ±	35,68 ±	53,85 ±	32,45 ±	50,98 ±	50,27 ±	51,22 ±	39,35 ±
	8,13	19,22	8,53	10,23	7,40	4,66	17,13	15,46	17,06	10,19

5.3. Análise por imunistoquímica

A pontuação baseada na intensidade de marcação gerou valores arbitrários expressos nos gráficos a seguir.

Na avaliação da expressão de nNOS por imunistoquímica os fetos tratados do grupo GAH apresentaram diminuição em relação aos grupos G, GA, GNO2 e GNO3, sendo iguais aos grupos CE e CI. O tratamento com GSNO só foi satisfatório na concentração de 0,05 μ M (grupo GNO4), sendo melhor quando associado ao biomaterial (grupo GAHNO4), apresentando baixa intensidade da imunomarcação em relação aos fetos com alta inflamação intestinal, no caso, dos grupos G e GA (Figura 13 e Gráfico 16).

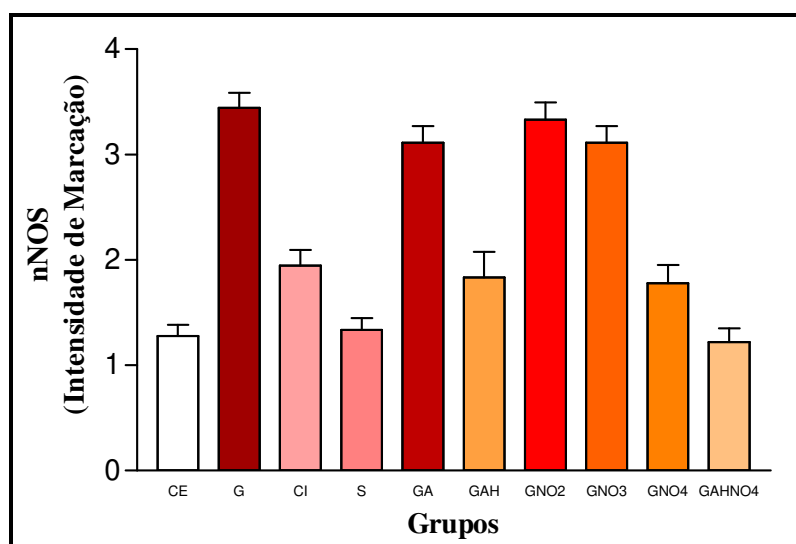


Gráfico 16 – Intensidade de marcação, expressa em valores arbitrários das médias, da expressão de nNOS em imunistoquímica para os fetos dos grupos: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4).

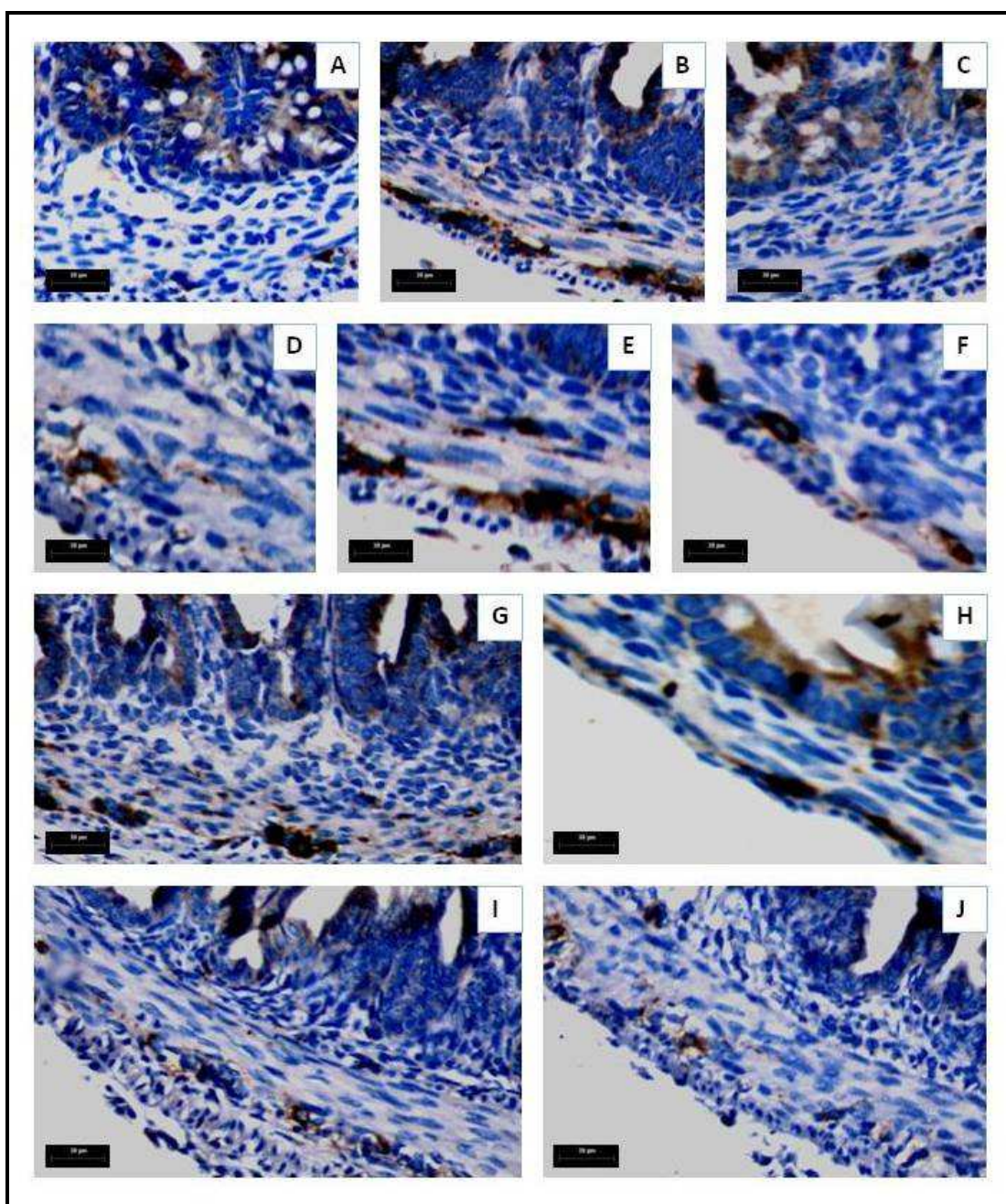


Figura 13 – Imunoistoquímica para análise da expressão de nNOS nos grupos estudados. **A** – Controle Externo (CE); **B** – Gastrosquise (G); **C** – Controle Interno (CI); **D** – Sham (S); **E** – Gastrosquise e adesivo (GA); **F** – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); **G** – Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2); **H** - Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3); **I** - Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4); **J** – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4). Barra de 30 μm .

Da mesma forma, na avaliação da expressão de iNOS por imunoistoquímica houve diferença entre os grupos estudados. O grupo GAH apresentou diminuição da imunomarcação, sendo diferente dos grupos G e GA, mas não chegou a ser igual aos grupos CE e CI. O tratamento com GSNO só foi significativo na concentração de 0,05 μM e mesmo assim, somente quando combinado com o uso de hidrogel (grupo GAHNO4) apresentando baixa intensidade da imunomarcação em relação aos fetos com intensa inflamação intestinal, no caso, dos grupos G e GA. (Figura 14 e Gráfico 17).

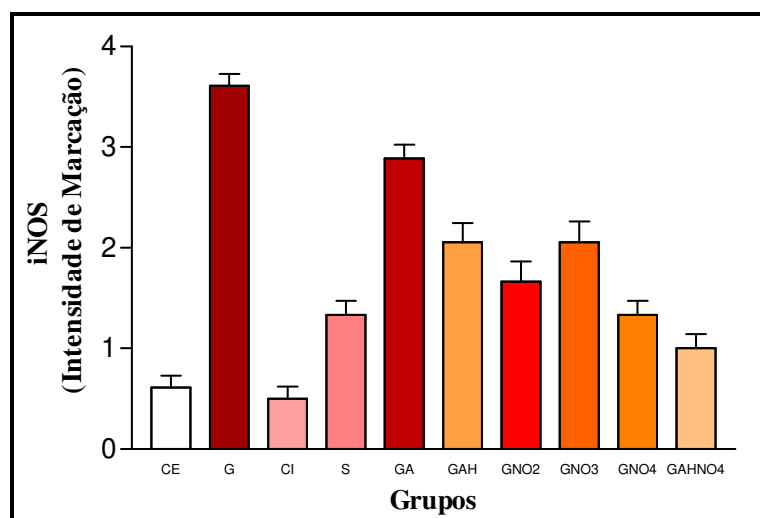


Gráfico 17 – Intensidade de marcação, expressa em valores arbitrários das médias, da expressão de iNOS em imunoistoquímica para os fetos dos grupos: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μM (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μM (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μM (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μM (GAHNO4).

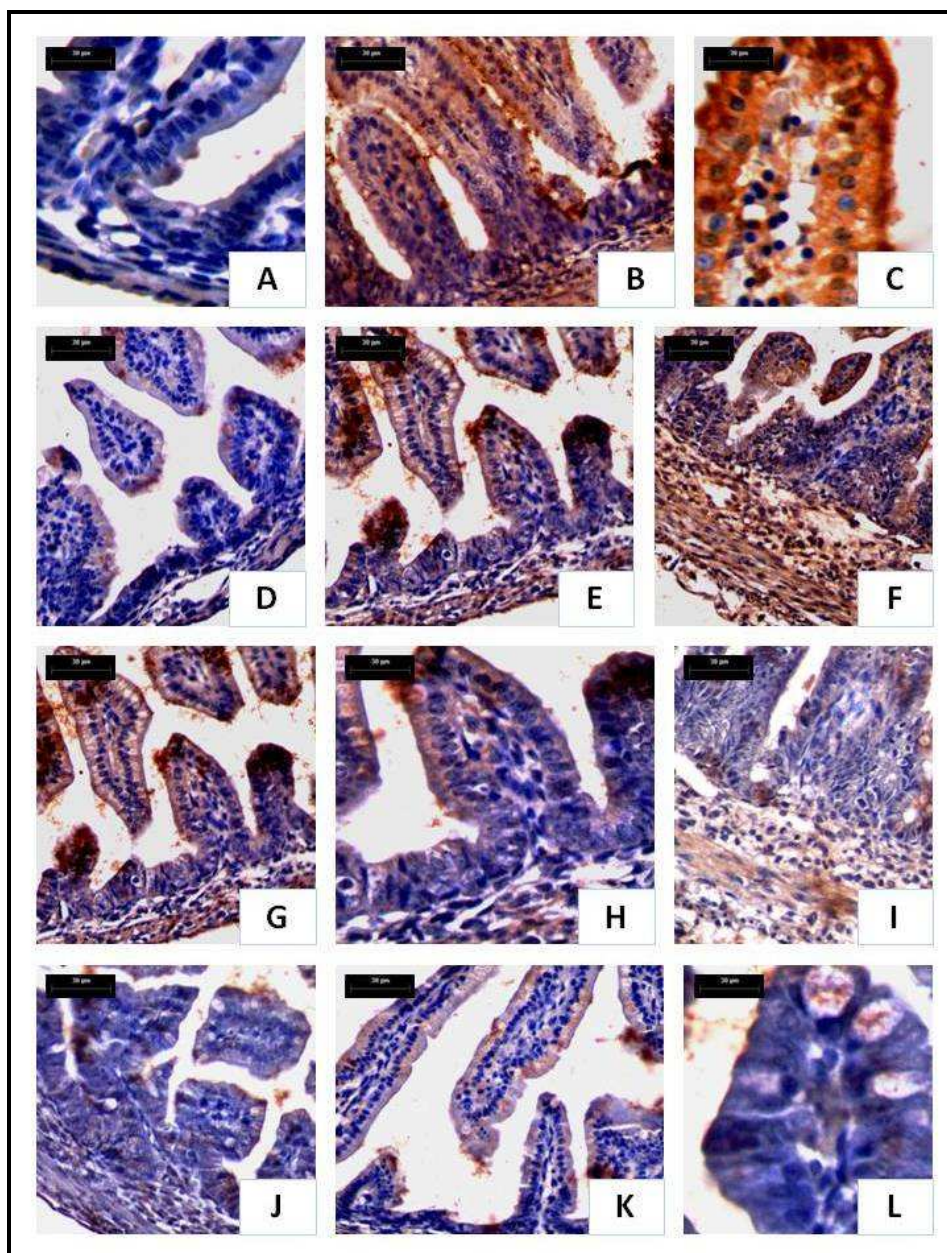


Figura 14 – Imunoistoquímica para análise da expressão de iNOS nos grupos estudados. **A** – Controle Externo (CE); **B** – Gastrosquise (G); **C** – Vilosidade intestinal em evidência mostrando a forte imunomarcção na Gastrosquise; **D** - Controle Interno (CI); **E** – Sham (S); **F** – Gastrosquise e adesivo (GA); **G** – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); **H** – Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2); **I** - Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3); **J** - Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4); **K** – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4); **L** – Vilosidade intestinal em evidência mostrando a fraca marcação no grupo GAHNO4. Barra de 30 μ m.

Na avaliação da expressão de eNOS por imunohistoquímica também houve diferença entre os grupos estudados. O resultado foi semelhante ao apresentado pela expressão da eNOS. O grupo GAH apresentou diminuição em relação aos grupos G, GA, GNO2 e GNO3, sendo igual aos grupos CE e CI. O tratamento com GSNO só foi significativo na concentração de 0,05 μ M (grupo GNO4), sendo melhor quando associado ao biomaterial (grupo GAHNO4), apresentando baixa intensidade da imunomarcacão em relação aos fetos com alta inflamação intestinal, no caso, dos grupos G e GA. (Figura 15 e Gráfico 18).

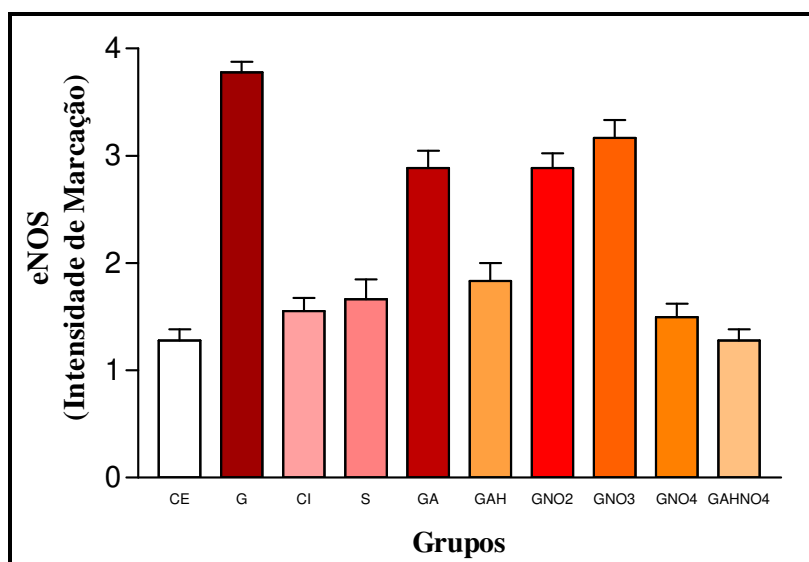


Gráfico 18 – Intensidade de marcação, expressa em valores arbitrários das médias, da expressão de eNOS em imunohistoquímica para os fetos dos grupos: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4).

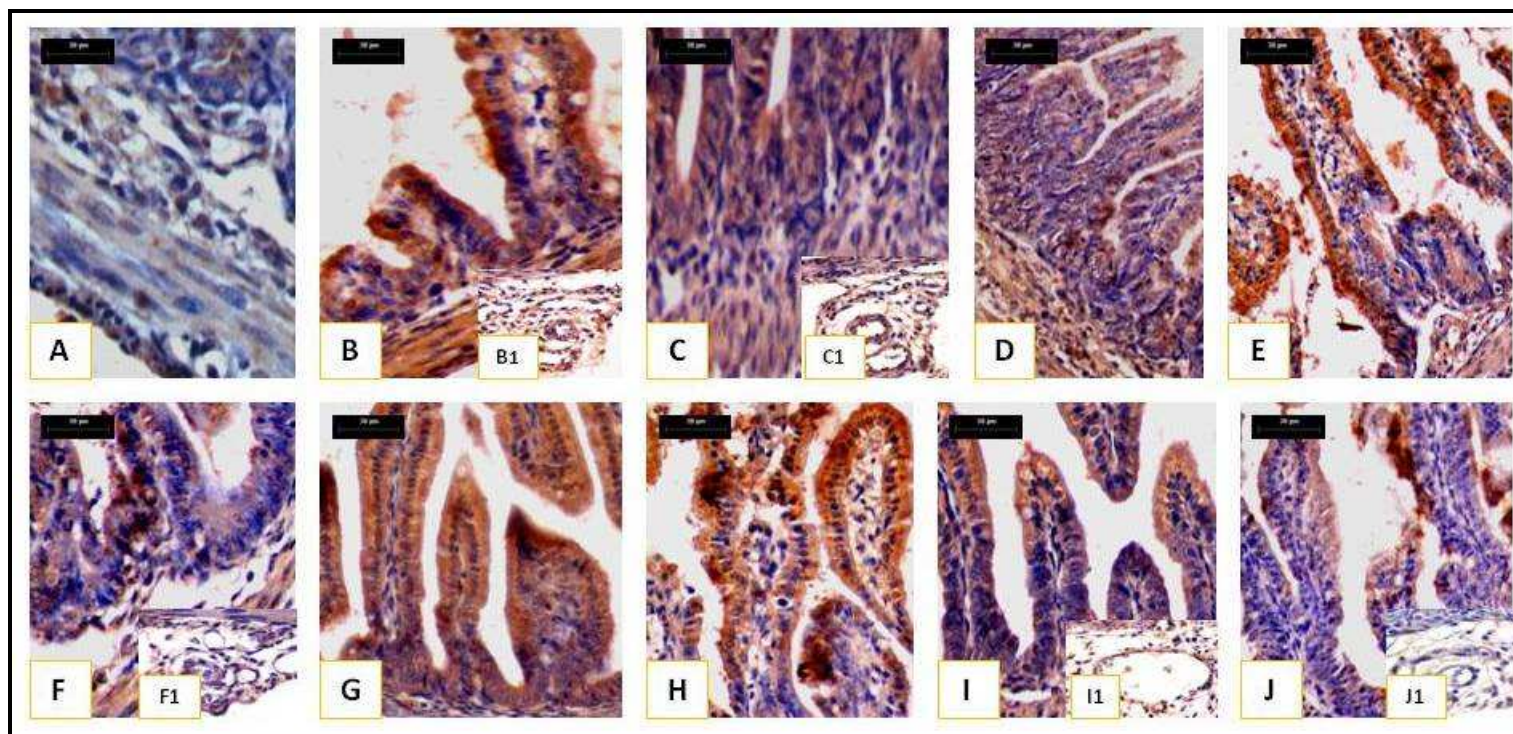


Figura 15 – Imunoistoquímica para análise da expressão de eNOS nos grupos estudados. **A** – Controle Externo (CE); **B** – Gastrosquise (G); **C** – Controle Interno (CI); **D** – Sham (S); **E** – Gastrosquise e adesivo (GA); **F** – Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH); **G** – Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2); **H** - Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3); **I** - Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4); **J** – Gastrosquise, hidrogel, adesivo e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4). Barra de 30 μ m.

5.4. Análise por western blotting

Na análise da expressão de nNOS por western blotting observou-se que os tratamentos com GSNO a 0,05 μ M e o mesmo combinado com hidrogel foram aqueles que apresentaram menor expressão da nNOS, semelhante os controles externo e interno. O uso de apenas o adesivo e das outras concentrações de GSNO não foi suficiente para manter a baixa expressão da enzima, que ficou parecida com o grupo G (Figura 16 e Gráfico 19).

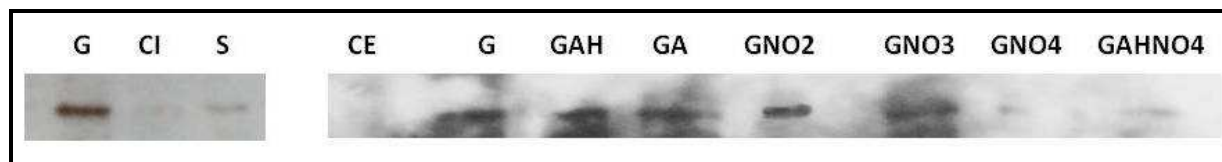


Figura 16 – Análise da expressão de nNOS por Western blotting para todos os grupos estudados. A tríade formada por G, CI e S correu separadamente em outro gel, porém no mesmo dia, na mesma cuba e nas mesmas condições.

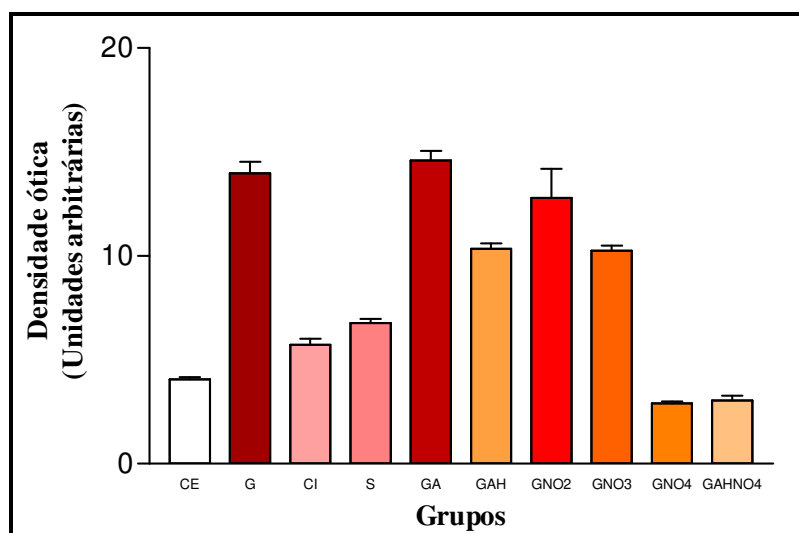


Gráfico 19 – Valores das medias de densidade ótica das bandas de western blotting para nNOS de todos os grupos estudados: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4).

Na análise da expressão da iNOS, foi observada diminuição da expressão apenas nos grupos que receberam o hidrogel e o biomaterial combinado com GSNO a 0,05 μ M. A enzima teve alta expressão na gastrosquise e nos grupos que receberam as dosagens diferentes de GSNO (Figura 17 e Gráfico 20).

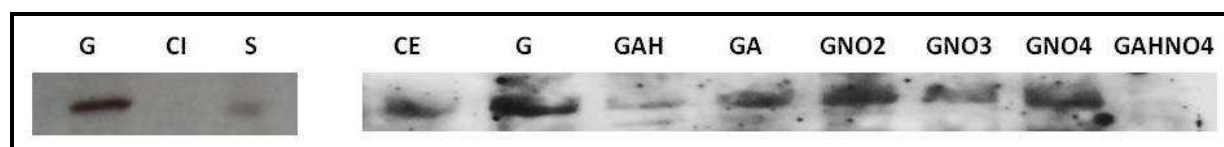


Figura 17 – Análise da expressão de iNOS por Western blotting para todos os grupos estudados. A tríade formada por G, CI e S correu separadamente em outro gel, porém no mesmo dia, na mesma cuba e nas mesmas condições.

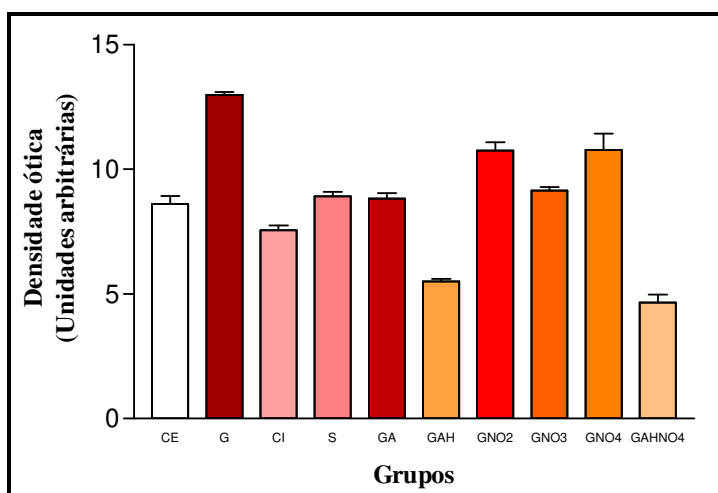


Gráfico 20 – Valores das medias de densidade ótica das bandas de western blotting para iNOS de todos os grupos estudados: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4).

Já para a enzima eNOS, todos os grupos apresentaram expressão da enzima menor que o grupo com gastrosquise, porém os grupos contendo apenas GSNO a 0,05 μ M e o mesmo combinado com hidrogel foram aqueles que apresentaram menor expressão da eNOS, semelhante os controles. O restante dos grupos apresentou um ligeiro aumento na expressão quando comparados com os tratamentos citados acima (Figura 18 e Gráfico 21).

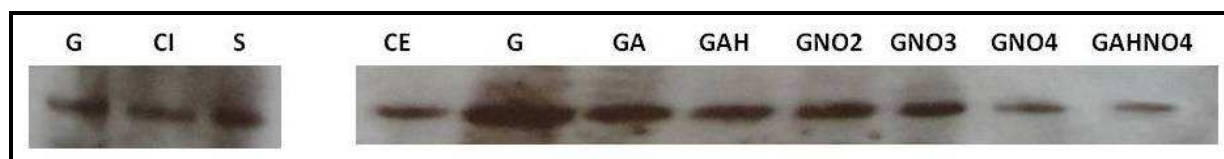


Figura 18 – Análise da expressão de eNOS por Western blotting para todos os grupos estudados. A tríade formada por G, CI e S correu separadamente em outro gel, porém no mesmo dia, na mesma cuba e nas mesmas condições.

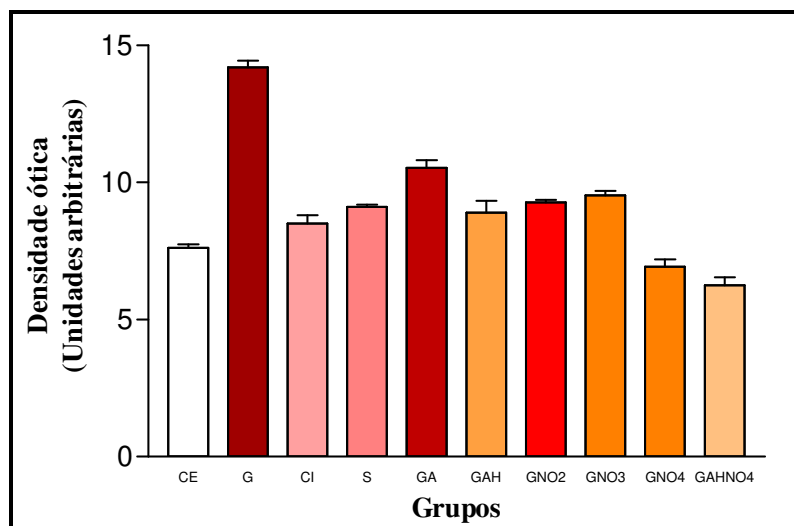


Gráfico 21 – Valores das medias de densidade ótica das bandas de western blotting para eNOS de todos os grupos estudados: Controle Externo (CE), Controle Interno (CI), Gastrosquise (G), Sham (S), Gastrosquise com adesivo (GA), Gastrosquise com adesivo e hidrogel (GAH), Gastrosquise e GSNO a 5 μ M (GNO2), Gastrosquise e GSNO a 0,5 μ M (GNO3), Gastrosquise e GSNO a 0,05 μ M (GNO4) e Gastrosquise, hidrogel e GSNO a 0,05 μ M (GAHNO4).

5.5. Análise por quimioluminescência

O intestino do grupo G apresentou menor nível de NOx em relação aos grupos CI e S ($p < 0,05$). No entanto, no LA, houve uma maior quantidade de NOx do grupo G em relação aos grupos CI e S ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos CI e S da quantidade de NOx nos intestinos ou no LA (Tabela 6 e Gráficos 22 e 23).

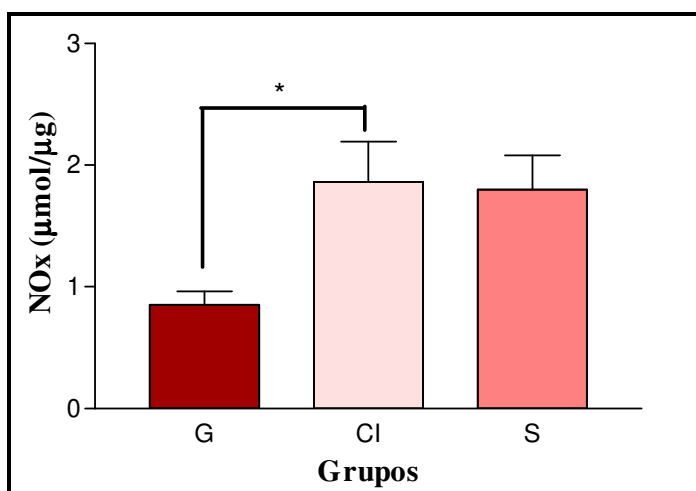


Gráfico 22 – Quantificação de NOx no intestino por Quimioluminescência dos grupos G ,CI e S, com desvio padrão e diferença estatística. * $p < 0,05$

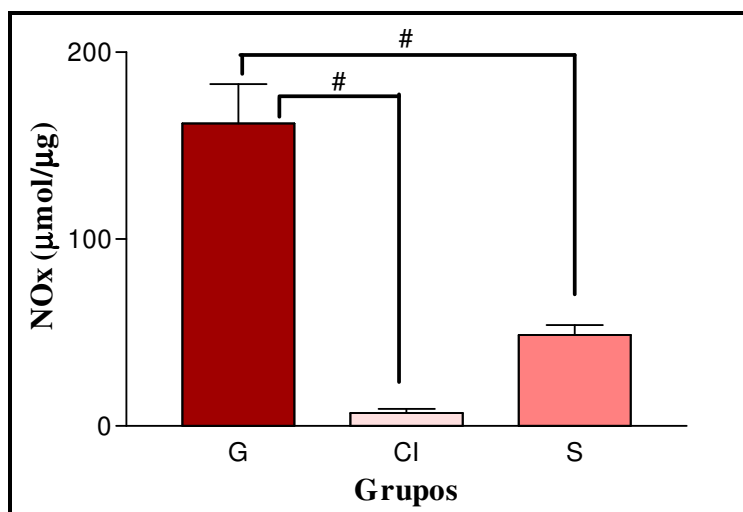


Gráfico 23 – Quantificação de NOx no LA por Quimioluminescência dos grupos G ,CI e S, com desvio padrão e diferença estatística. # $p < 0,001$

Tabela 6 - Distribuição dos valores de quantificação de NOx no intestino e no LA de fetos de ratos dos grupos G, CI e S, expressos por médias $\pm$ desvio-padrão. G: Gastrosquise; CI: Controle Interno; S: Sham.

	Intestino	LA
G	0,85 $\pm$ 0,28	161,87 $\pm$ 52,11
CI	1,86 $\pm$ 0,82	6,99 $\pm$ 5,45
S	1,80 $\pm$ 0,69	48,73 $\pm$ 13,18

Grupos de comparação: **1** = G x CI; **2** = G x S.

Valores de p : **Intestino:** $< 0,05^1$; **LA:** $< 0,001^{1,2}$

5. DISCUSSÃO

Gastrosquise é uma doença congênita rara e de etiologia não esclarecida na qual as alças intestinais expostas ao LA levam a alterações funcionais no período neonatal causando hipomotilidade e distúrbios da capacidade de absorção de nutrientes (5,85).

O dano intestinal é responsável pela elevada morbidade e eventualmente pela mortalidade destes neonatos. Os fatores que contribuem para a morbi-mortalidade da doença são conseqüências diretas ou indiretas do processo inflamatório iniciado intra-útero, decorrente da prolongada exposição das alças intestinais ao LA (5,26,86).

Acredita-se que a inflamação intestinal é conseqüência do contato com componentes do LA e não uma lesão primariamente isquêmica pela compressão das alças na saída do óstio na parede abdominal (48,85,87,88,89,90).

Na gastrosquise ocorre encurtamento, dilatação e espessamento intestinal principalmente no último trimestre da gestação. Neste período o LA sofre modificações na sua composição relacionada à função renal fetal, com isso os níveis de uréia, creatinina e mecônio no LA se elevam, enquanto que a osmolaridade e o sódio diminuem (15,40,91).

Tais alterações na composição do LA desempenham papel importante na gênese do processo inflamatório intestinal da gastrosquise (15,32). Estudos experimentais comprovam que a presença de mecônio no LA está relacionada ao dano intestinal, o mesmo não ocorrendo em relação à presença de urina (34,48).

A compreensão da fisiopatologia do dano intestinal causado pela exposição das alças ao LA, especialmente no final da gestação, é de fundamental importância para traçar estratégias no tratamento deste defeito congênito. Vários autores já demonstraram que as alças intestinais apresentam-se inflamadas, com conseqüentes alterações funcionais, como perda da contratilidade, diminuição da atividade enzimática das vilosidades e alterações da síntese de colágeno da região submucosa (15,92,93).

Sendo assim, uma forma de evitar tais alterações e diminuir as complicações pós-operatórias seria impedir que as alças intestinais entrassem em contato com o LA, desta forma, utilizando um biomaterial como o hidrogel, contribui para proteger o intestino da ação lesiva do LA. Isso já foi feito previamente relatado em nosso estudo (72) destacando os aspectos histológicos desta proteção e dando continuidade a esta linha de investigação nós associamos o óxido nítrico ao hidrogel e focamos nas suas mudanças bioquímicas para ajudar na comprovação da eficácia do biomaterial.

Os hidrogéis são redes poliméricas capazes de absorver grande quantidade de água sem se dissolver. Devido ao seu alto caráter hidrofílico os hidrogéis apresentam consistência macia semelhante aos tecidos biológicos e biocompatibilidade. O hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) ofereceu uma proteção mecânica com fácil remoção da parede do intestino sem causar lesão à serosa. Além disso, o hidrogel após intumescimento apresentou-se 26 vezes menor que o peso corporal do feto após o nascimento, demonstrando que o aumento proporcional do biomaterial foi pequeno e possibilitou um recobrimento fixo, suave e macio às alças do intestino sem impedir os movimentos fetais e sem que houvesse desprendimento do hidrogel e possível risco de embolia pulmonar.

O adesivo de fibrina não proporcionou uma proteção adequada sendo absorvido pelo organismo. É importante ressaltar que o hidrogel não aderiu por si só as alças do intestino sendo necessário o uso de um adesivo cirúrgico. O adesivo de fibrina utilizado da marca Beriplast® P teve como função colar o hidrogel à parede intestinal mantendo um contato íntimo com o órgão (72).

Com relação às dosagens de GSNO utilizadas, a princípio, a dose inicial seria de 50 μ M. Porém, após a administração de GSNO no intestino fetal com 18,5 dias de gestação, a rata mãe apresentou-se doente, com olhos e focinho com aspecto hemorrágico e as poucas sobreviventes tiveram seus fetos mortos. Neste caso, a dosagem inicial de GSNO que difundiu pelo intestino fetal, como também atingiu a circulação placentária e do organismo materno, foi muito alta. Quando a quantidade de NO é muito grande, há vasodilatação pronunciada, choque e redução da atividade plaquetária, ficando a homeostase prejudicada (94). Por outro lado, qualquer NO difundido para o sangue é rapidamente inativado pela hemoglobina, formando metahemoglobina. Essa conversão impede um efeito vasodilatador sistêmico. Entretanto, a formação excessiva de metahemoglobina pode comprometer seriamente a capacidade de transporte de oxigênio no sangue. Em seres humanos, pelo menos, os níveis máximos de segurança de metahemoglobina no sangue são de apenas 3% da hemoglobina total (95). As outras dosagens de GSNO não foram suficientes para causar alterações no organismo materno, mesmo sabendo que a difusão pode ocorrer.

Neste estudo, verificamos não só a relação PI/PC entre os dez grupos estudados, mas também entre os controles internos de cada grupo que recebeu dosagens de GSNO. Essa análise entre os controles foram realizadas para verificar se há diferença entre os controles com os

grupos CE e CI. Caso não houvesse diferença, significa que as dosagens de NO não alteraram o intestino ou qualquer outro órgão dos fetos vizinhos considerados saudáveis. Ao verificarmos a relação PI/PC entre os grupos CE, G, CI, GNO2C, GNO3C, GNO4C e GAHNO4C notamos que o peso intestinal de todos os fetos controles foi estatisticamente igual ao dos fetos CE e CI ($p > 0,05$) e diferente de G ($p < 0,001$), logo todos os grupos tratados foram comparados sempre com os grupos CE e CI.

Quando comparada a relação PI/PC entre todos os grupos estudados, notamos que os únicos grupos que foram estatisticamente iguais aos fetos CE e CI foram GA e GAH ($p > 0,05$). O grupo GAHNO4 também foi diferente estatisticamente do grupo G, mas não chegou a ser similar aos controles.

A primeira vez que os grupos GA e GAH foram estudados (72) houve diferença entre eles, mas desta vez o mesmo não ocorreu. Talvez porque os dados de PI e PC para estes grupos foram novamente obtidos, já se notou que a nova ninhada de ratos apresentou menor peso e tamanho dos fetos, seja de qualquer grupo estudado. Sendo assim, as outras análises serviram para comprovar se o grupo GA poderia ter apresentado alguma melhora somente com adição do adesivo. Mas, de qualquer forma, o hidrogel pareceu continuar melhorando a relação PI/PC.

O intestino inflamado dos fetos G é mais curto e mais pesado do que o controle, pois ocorrem dois efeitos: constrição do intestino pelo óstio da parede abdominal que ocasiona dilatação e espessamento da mucosa e ação tóxica direta do LA que ocasiona formação de uma camada fibrosa com edema e espessamento da camada serosa. Alguns autores acreditam que ambos os efeitos são independentes (88).

Pudemos verificar na análise histológica que os diâmetros intestinais externos I e II dos fetos GAH, GANO4 e GAHNO4 ficaram iguais aos grupos CE e CI, diferentes dos grupos G, GA e GNO2 ($p < 0,001$). Ao medirmos os diâmetros internos I e II, verificamos que a luz intestinal dos fetos G também aumenta, assim como dos fetos GA e GNO2 ($p < 0,001$), não havendo qualquer modificação nos fetos CE, CI, S, GAH, GNO4 e GAHNO4 ($p > 0,05$). O grupo GNO3 foi estatisticamente diferente de G, mas não chegou a ser igual estatisticamente aos grupos CE e CI, considerados saudáveis.

Em todas as medidas da parede intestinal: espessura total, mucosa e submucosa, camada muscular longitudinal, camada muscular circular e serosa os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos. Na camada serosa, os grupos que mantiveram a espessura igual ao

grupos CE e CI foram S, GAH, GNO4 e GAHNO4 ($p > 0,05$). Já os grupos G, GA, GNO2 e GNO3 aumentaram em espessura da serosa ($p < 0,001$). Neste caso, dentre as dosagens, a concentração de GSNO de 0,05 μ M foi a única que conseguiu ajudar no processo inflamatório das alças intestinais, já o mesmo acontece de fora para dentro. O mesmo ocorreu no uso do hidrogel com ou sem GSNO.

Nas outras camadas, também se obteve resultado semelhante, sendo que os únicos grupos que apresentaram as camadas estatisticamente iguais ao CE e CI foram S, GAH e GAHNO4 ($p > 0,05$). Os grupos que aumentaram nas medidas das camadas foram G, GA e GNO2, principalmente ($p < 0,001$). O grupo GAHNO4 apresentou um leve declínio em relação ao grupo GAH, mas não chegou a ser diferente estatisticamente. O grupo GNO3 não apresentou melhoras nas espessuras medidas, sendo igual ao grupo G nas medidas das camadas mucosa e submucosa e serosa ($p > 0,05$). Achados semelhantes para os fetos G foram encontrados nos modelos de coelhos e embriões de galinhas, reforçando o efeito nocivo do LA na evolução da gestação sobre as alças intestinais (34,90). Portanto, mais uma vez, os tratamentos eficazes até o momento são aqueles que usamos o hidrogel como proteção e também com o uso concomitante de GSNO a 0,05 μ M.

Para avaliar estes tratamentos, também foi analisada a expressão das enzimas nNOS, iNOS e eNOS para todos os grupos, doentes, saudáveis e tratados, por meio de imunistoquímica e western blotting. Na gastrosquise, estas enzimas estão muito expressas, logo a avaliação da expressão destas enzimas pode ser indício de que a inflamação nos grupos tratados melhorou ou não (4,47).

Pela análise de imunistoquímica e western blotting, a enzima nNOS foi mais expressa nos grupos G, GA, principalmente e nos grupos GNO2 e GNO3 também. E foi menos expressa nos grupos S, GAH, GNO4 e GAHNO4. A outra enzima constitutiva, a eNOS, também foi mais expressa nos grupos G e GA e menos nos grupos S, GAH, GNO4 e GAHNO4. A enzima iNOS, que é induzível e produzida em processos inflamatórios, teve alta expressão nos grupos G e GA, principalmente e nos grupos S, GNO2, GNO3 e GNO4. A baixa expressão foi mais evidenciada nos grupos GAH e GAHNO4, que chegou a ser mais baixa que nos grupos CE e CI.

Pela análise de todos os resultados encontrados, os tratamentos mais eficazes para melhora da inflamação das alças intestinais na gastrosquise foram GAH, GNO4 e GAHNO4, sendo que o grupo que teve a associação do hidrogel e GSNO a 0,05 μ M, o mais diluído, foi aquele cujo

intestino se mostrou menos inflamado. Há evidências na literatura que a ligação de NO auto-gerado ao grupo heme da iNOS leva à inibição catalítica desta enzima e é um mecanismo negativo provável de *feed-back* para reduzir a inflamação mediada por NO (96). Logo, esta concentração de NO doado pelo GSNO foi suficiente para causar uma inibição principalmente da enzima iNOS, reduzindo consideravelmente a inflamação das alças intestinais.

As outras dosagens de GSNO não mostraram serem eficazes no tratamento e isso pode ser em decorrência da alta concentração de NO doado, que mesmo que inibisse a enzima iNOS de alguma forma, foi suficiente ainda para causar os efeitos mais tóxicos do NO, como danos na mucosa (97).

Esses resultados mostram que usando um doador de NO em baixa concentração, pode-se também ajudar no tratamento da inflamação na gastrosquise, tanto quanto ou até melhor que o uso apenas do biomaterial e inclusive pode ser até melhor que o uso de inibidores, como o L-NAME (NG-nitro-L-arginina éster metílico) que é não seletivo da NOS ou o NG (aminoguanidina), que é inibidor da iNOS. É possível que os inibidores da iNOS são eficazes como agentes de proteção somente quando administrados no momento da indução da inflamação intestinal e não exerça substancial atividade antiinflamatórias quando administrados após a inflamação já estiver se estabelecido e a iNOS expressa (98).

A expressão da NOS pode ser diretamente correlacionada com os níveis dos principais metabolitos primários de NO, isto é, nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) que pode ser medido coletivamente como NO_x , através de ensaio de quimioluminescência. Para este estudo, somente a tríade formada por G, CI e S foi analisada, pois queríamos saber se a técnica seria eficiente com o LA, uma vez que é viscoso e difícil de ser coletado principalmente no ultimo dia de gestação e nos grupos operados, já que não podia ficar em contato direto com o ar.

Traumas em tecidos devido à incisão no útero (grupos G e S) e na parede abdominal para a externalização das alças intestinais (grupo G) são esperados para levar ao aumento do nível de NO_x no LA. Esse aumento nos níveis de NO_x pode ser entendida como resultante do aumento da produção de NO pelos tecidos traumatizados, seguido por sua oxidação a NO_2^- e NO_3^- , que, por sua vez, difundem-se rapidamente ao LA. Pode-se considerar que em três dias após o procedimento cirúrgico, o LA permanece basicamente inalterado quanto ao seu teor de proteína em um volume de cerca de 0,5-0,6 mL por dia (99,100,101,102,103). Este fluxo é suficiente para alterar a concentração de NO_x durante o período de três dias. No entanto, deve-se considerar que

as concentrações de NOx estão num "estado estacionário" dentro de um ambiente dinâmico. O aumento significativo da concentração de NOx no grupo G, em comparação com os grupos CI e S, mostra que mesmo em tal situação de renovação do LA, a persistência da inflamação ao longo deste período, é responsável pela manutenção de um aumento da produção de NO e, portanto, a concentração de NOx aumenta no LA.

No grupo CI os níveis de NOx têm a mesma ordem de magnitude no tecido intestinal e no LA, o que reflete o nível basal de NOx devido às atividades constitutivas da NOS. No entanto, os níveis de NOx no LA são 200 e 30 vezes maior do que no tecido intestinal dos grupos G e S, respectivamente, o que reflete a difusão de NOx do útero inflamado, parede abdominal e alças intestinais expostas para o LA. Este resultado está de acordo com o fato de que a difusão passiva de NOx do tecido para o LA deve ser ampla e rápida, uma vez NO_2^- e NO_3^- são totalmente espécies solúveis de água.

Foi verificado também uma diminuição inesperada do nível de NOx no tecido intestinal do grupo G, em comparação com os tecidos do intestino dos grupos CI e S, que não têm correlação direta com os níveis de NOS, visto que a expressão das três isoformas foi maior no grupo G. É sabido que os mediadores pró-inflamatórios, incluindo a bradicinina, a histamina, complemento e derivados do NO, associados à infiltração inflamatória leva ao aumento da permeabilidade vascular (104). Sabe-se também que o aumento da produção de NO está diretamente relacionada com a inflamação e com fenômenos vasculares mediados principalmente pela histamina (105).

Por conseguinte, a diminuição do nível de NOx no tecido intestinal do grupo G pode ser devido ao aumento da permeabilidade vascular associada com a inflamação do tecido intestinal neste grupo, o que proporciona uma maior difusão e escape de NOx para o LA, com a qual o tecido do intestino está em contato direto. Esse contato não existe nos grupos CI e S, que acabam exibindo maiores níveis intestinais de NOx basal. Como citado anteriormente, há evidências na literatura de que o NO pode se ligar à iNOS gerando um mecanismo de *feed-back* para reduzir a inflamação mediada por NO (96). Assim, a diminuição do nível de NOx no tecido intestinal do grupo G pode também contribuir para manter a maior expressão das NOS constitutivas na inflamação neste modelo animal.

Em resumo, verificou-se que a inflamação intestinal na gastrosquise é associado com a difusão do NO para a LA, que pode ser a causa do aumento da expressão da NOS no intestino.

Sendo assim, o hidrogel P(NIPAAm-co-AAc) pode ser utilizado como matriz para a redução da espessura da alça intestinal e que associado ao uso de doador de NO ajuda no processo antiinflamatório no tecido. A utilização deste biomaterial com ou sem doador de NO no mesmo modelo da doença em animais de grande porte poderá aumentar a validação e a aplicação do hidrogel na prática clínica. Além disso, quantificando NOx no tecido intestinal e no LA, concluímos que a difusão do NO contribui para o aumento da expressão das NOS e que a análise de NO e de outras substâncias pode refletir o grau de exposição e inflamação do intestino em gastrosquise, contribuindo para a compreensão da fisiopatologia de gastrosquise e até mesmo como possível fator prognóstico em recém-nascidos com esta doença.

6. CONCLUSÕES

7.1. Geral

No modelo experimental de gastrosquise em fetos de rato, o uso de GSNO na concentração de 0,05 μ m combinado com hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) mostrou ser um bom tratamento, sendo uma boa opção para proteger as alças intestinais contra os danos causados pelo LA no modelo experimental de gastrosquise em fetos de rato.

7.2. Específico

a) O grau de proteção e tratamento das alças intestinais pelas medidas morfológicas e histométricas intestinais foi eficaz, com as medidas da relação PI/PC e espessura de todas as camadas da parede intestinal similares especialmente entre os fetos CE, CI, S, GAH e GAHNO4 e diferentes dos fetos G, GA, GNO2, GNO3 e GNO4.

b) A expressão das enzimas nNOS, iNOS e eNOS por meio de western blotting e imunoistoquímica aumentou principalmente para os grupos G e GA e para as altas dosagens como GNO2 e GNO3 e diminuiu nos grupos S, GAH, GNO4 e GAHNO4, ficando iguais aos grupos CE e CI. Atenção especial é dada ao resultado da iNOS, que teve alta expressão nos grupos S, G, GA, GNO2, GNO3 e GNO4 e baixa apenas nos grupos GAH e GAHNO4, que chegaram a expressar menos que nos grupos CE e CI.

c) A quantificação de nitrato e nitrito (NOx) no intestino e no LA por quimioluminescência, mostrou que o NO se difunde do tecido intestinal para o LA, no grupo G e isso pode ser a causa para o aumento da expressão da enzima NOS.

8. REFERÊNCIAS

1. Ambrose SS. The Anterior Body Wall In: Skandalakis JE, Gray SW. Embryology for Surgeons. The Embryological Basis for the Treatment of Congenital Anomalies ed. 2nd, Philadelphia, Pa: WB Saunders, 1972; p. 414-15.

2. Aoki Y, Ohshio T, Komi N. An experimental study on gastroschisis using fetal surgery. J Pediatr Surg 1980; 15:252-56.

3. Srinathan SK, Langer JC, Blennerhassett MG, Harrison MR, Pelletier GJ, LAGUNOFF D. Etiology of intestinal damage in gastroschisis. III: Morphometric analysis of the smooth muscle and submucosa. J Pediatr Surg 1995; 30(3): 379-83.

4. Dilsiz A, Gündogan AH, Aktan M, Duman S, AKTUNG T. Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Intestinal Damage in Gastroschisis: A Morphological Evaluation in Chick Embryos. J Pediatr Surg 1999; 34(8): 1248-52.

5. 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(10): 1506-1511.

5. Morrison JJ, Klein N, Chitty LS, Kocjan G, Walshe D, Goulding M, Geary MP. Intra-amniotic inflammation in human gastroschisis: possible aetiology of postnatal bowel dysfunction, Br J Obstet Gynecol 1998; 105: 1200-04.

7. Sydorak RM, Sbragia L, Nijagal A, Phibbs RH, Harrison MR Albanese CT. A Big Hole in the System: Gastroschisis. J Pediatr Surg 2002; 37(12):1669-72.

7. Saxena AK, Hülkamp G, Schleef J, Schaarschmidt K, Harms E, Willital GH. Gastroschisis: a 15-year, single-center experience. Pediatric Surg Int 2002; 18: 420-424.

8. Singh SJ, Fraser A, Leditschke JF, Spence K, Kimble R, Dalby-Payne J. Gastroschisis: determinants of neonatal outcome. Pediatric Surg Int 2003; 19: 260-5.

9. Davis MW, Kimble RM, Cartwright. Gastroschisis: ward reduction compared with traditional reduction under general anesthesia. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 523-27.

11. Hoyme EW, Higginbottom MC, Jones KL. The vascular pathogenesis of gastroschisis: Intrauterine interruption of the omphalomesenteric artery. *J Pediatrics* 1981; 98(2): 228-31.

12. Wilson D, Johnson MP. Congenital Abdominal Wall Defects: An Update. *Fetal Diag Ther* 2004; 19(5):385-398.

13. Kunz LH, Gilbert WM, Towner DR. Increased incidence of cardiac anomalies in pregnancies complicated by gastroschisis. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 1248-52.

14. How HY, Harris BJ, Pietrantonio M, Evans JC, Dutton S, Koury J, Siddiqi TA. Is vaginal delivery preferable to elective cesarian delivery in fetuses with a know ventral wall defect ? *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182(6): 1527-34.

15. Tibboel D, Vermey-Keers C, Kluck P, Gaillard JL, Koppenberg J, Molenaar JC. The natural history of gastroschisis during fetal life: development of the fibrous coating on the bowel loops. *Teratology* 1986; 33:267-72.

16. Fitzsimmons J, Nyberg DA, Cyr DR, Hastch E. Perinatal management of gastroschisis. *Obstet Gynecol* 1988; 71(6 pt 1): 910-13.

17. Stringer MD, Brerenton RJ, Wright VM. Controversies in the management of gastroschisis: a study of 40 patients. *Arch Dis Child* 1991; 66(1):34-6.

18. DiLorenzo C, Hyman PE. Gastrointestinal motility in neonatal and pediatric practice. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25(1): 203-24.

19. Vilela PC, Ramos DE, Amorim MM, Falbo GH, Santos LCJ. Risk factors for adverse outcome of newborns with gastroschisis in a Brazilian hospital. *Pediatr Surg* 2001; 36(4):559-64.

20. Schalatter M, Norris K, Uitvlugt N, Decou J, Connors R. Improved outcomes in the treatment of gastroschisis using a preformed silo and delayed repair approach. *J Pediatr Surg* 2003; 38(3): 459-64.
21. Tannuri AC, Sbragia L, Tannuri U, Silva LM, Leal AJ, Schmidt AF, Oliveira-Filho AG, Bustorff-Silva JM, Vicente YA, Tazima Mde F, Pileggi FO, Camperoni AL. Evolution of critically ill patients with gastroschisis from three tertiary centers. *Clinics (Sao Paulo)* 2011;66(1):17-20.
22. Langer JC, Bell JG, Castillo RO. Etiology of intestinal damage in gastroschisis, II. Timing and reversibility of histological changes, mucosal function, and contractility. *J Pediatr Surg*, 1990; 25:1122-26.
23. Vergunta RK, Wallace LJ, Leonardi MR, Gross TL, Renfro Y. Perinatal management of gastroschisis: analysis of a newly established clinical pathway. *J Pediatr Surg* 2005; 40:528-34.
24. Blakelock RT, Harding JE, Kolbe A, Pease PW. Gastroschisis: Can the Morbidity Be Avoided? *Pediatr Surg Int* 1997; 12: 276-82.
25. Skarsgard ED, Claydon J, Bouchard S, Kim PC, Lee SK, Laberge JM, McMillan D, Von Dadelszen P, Yanchar N. Canadian Pediatric Surgical Network. Canadian pediatric Surgical Network: a population-based pediatric surgery network and database for analyzing surgical birth defects. The first 100 cases of gastroschisis. *J Pediatr Surg* 2008. 43(1): 30-4. Suppl. 34. Discussion.
26. Driver CP, Bruce J, Bianchi A, Doig CM, Dickson AP, Bowen J. The contemporary outcome of gastroschisis. *J Pediatr Surg* 2000; 35:1719-23.
27. Allen RG, Wrenn JR, Silon As a Sac in the Treatment of Omphalocele and Gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1969; 4: 3.

28. Canty TG, Collins DL. Primary fascial closure in infants with gastroschisis and omphalocele: A superior approach. *J Pediatr Surg* 1983; 18: 707-12.
29. Lacey SR, Carris LA, Breyer III AJ. Bladder pressure monitoring significantly enhances care of infants with abdominal wall defects: a prospective clinical study. *J Pediatr Surg* 1993; 28: 1370.
30. Sherman NJ, Aschi MJ, Isaacs HJR, Rosenkrantz JG. Experimental gastroschisis in the fetal rabbit. *J Pediatr Surg* 1973; 8(2):165-9.
31. Potier M, Melancon SB, Dallaire I. Fetal intestinal disaccharidases in human amniotic fluid. *Biomedicine* 1976; 25: 167-9.
32. Kluck P, Tibboel D, van der Kamp AWM. The effect of fetal urine on the development of the bowel in gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1983; 18(1): 47-50.
33. Aktug T, Erdag G, Kargi A, Akgur FM, Tibboel D. Amnio-allantoic fluid exchange for the prevention of intestinal damage in gastroschisis: An experimental study on chick embryos. *J Pediatr Surg* 1995; 30(3):384-87.
34. Albert A, Margarit J, Julia V, Sancho MA, Galan X, Lopez D, Morales L. Morphology and mucosal biochemistry of gastroschisis intestine in urine-free amniotic fluid. *J Pediatr Surg* 2003; 38 (8):1217-20.
35. Olguner M, Akgür FM, Api A, Özer E, Aktung T. The Effects of Intraamniotic Human Neonatal Urine and Meconium on the Intestines of the Chick Embryo With Gastroschisis *J Pediatr Surg* 2000; 35(3): 458-61.
36. Api A, Olguner M, Hakgüder G, Ates O, Özer E, Akgür FM. Intestinal damage in gastroschisis correlates with the concentration of amniotic meconium *J Pediatr Surg* 2001; 36(12): 1811-15.

37. Kanmaz T, Yagmurlu A, Aktug T, Gökçora H. The effect of amnio-allantoic fluid pH on the intestines: An experimental study in the chick embryo gastroschisis model. *J Pediatr Surg* 2001; 36(9): 1341-45.
38. Nichol PF, Hayman A, Pryde PG, Go LL, Lund DP. Meconium staining of amniotic fluid correlates with intestinal peel formation in gastroschisis. *Pediatr Surg Int* 2004; 20(3):211-14.
39. Fasching G, Haeusler M, Mayr J, Schimpl G, Haas J, Puerstner P. Can levels of interleukins and matrix metalloproteinases in the amniotic fluid predict postnatal bowel function in the fetuses with gastroschisis ? *J Pediatr Surg* 2005; 40(12):1887-91.
40. Langer JC, Longaker MT, Crombleholme TM. Etiology of intestinal damage in gastroschisis. I. Effects of amniotic fluid exposure and bowel constriction in a fetal lamb model. *J Pediatr Surg* 1989; 24:992-97.
41. Vannucchi MG, Midrio P, Flake AW, Faussone-Pellegrini MS. Neuronal differentiation and myoenteric plexus organization are delayed in gastroschisis: an immunohistochemical study in a rat model. *Neurosci Lett* 2003; 339:77-81.
42. Vannucchi MG, Midrio P, Zardo C, Faussone-Pellegrini MS. Neurofilament formation and synaptic activity are delayed in the myenteric neurons of the rat fetus with gastroschisis. *Neurosci Lett* 2004; 364(2):81-5.
43. Dunn JCY, Fonkalsrud EW, Atkinson JB. The influence of gestational age and mode of delivery on infants with gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1999; 34(9): 1393-95.
44. Mills JA, Lin Y, Macnab YC, Skarsgard ED. Canadian Pediatric Surgery Network. Perinatal predictors of outcome in gastroschisis. *J Perinatol* 2010; 30(12):809-13.
45. Reigstad I, Reigstad H, Kiserud T, Berstad T. Preterm elective caesarean section and early enteral feeding in gastroschisis. *Acta Paediatr* 2011; 100(1):71-4.

46. Haller JA, Kehrer BH, Shaker IJ, Shermeta DW, Wyllie RG. Studies of the Pathophysiology of gastroschisis in fetal sheep. *J Pediatr Surg* 1974; 9(5): 627-32.
47. Bealer JF, Graf J, Bruch SW, Adzick NS, Harrison MR. Gastroschisis increases small bowel nitric oxide synthase activity. *J Pediatr Surg* 1996; 31:1043-45; discussion 1045-46.
48. Correia-Pinto J, Tavares ML, Baptista MJ, Estevao-Costa J, Flake AW, Leite-Moreira AF. A new fetal rat model of gastroschisis: development and early characterization. *J Pediatr Surg* 2001; 36(1):213-16.
49. Sencan A, Gümüstekin M, Gelal A, Arslan O, Özer E, Manisa EM. Effects of amnio-allantoic fluid exchange on bowel contractility in chick embryos with gastroschisis. *J Pediatr Surg* 2002; 37(11): 1589-93.
50. Campbell MK. O metabolismo em perspectiva. In: *Bioquímica*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. P. 652-684.
51. Champe PC, Harvey RA. Basic concepts of metabolism. In *Biochemistry* 1996. 2. Ed. Philadelphia: J.B. Lippincott. P. 75-86.
52. Wood J, Garthwaite J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology*. 1994; 33(11):1235-44.
53. Queiroz SL, Batista AA. Biological functions of nitric oxide. *Quím Nova* 1999; 22(4): 584-90.
54. Choi DW. Nitric oxide: Foe or friend to the injured brain? 1993; 90: 9741-43.
55. Cerqueira NF, Yoshida WB. Nitric oxide: review. *Acta Cir Bras* 2002; 17(6): 417-423.

56. Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine on nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 19654-58.
57. Pollock JS, Förstermann U, Mitchel JA, Warner TD, Schimidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 10480-4.
58. Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Mocanda S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases are L- arginine NG - CG - dioxygenases. *J Biol Chem* 1991; 266: 23790-5.
59. Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37: 339-59.
60. Rusche KM, Spiering MM, Marletta MA. Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase. *Biochemistry* 1998; 37: 15503-12.
61. Ricardo KFS, Shishido SM, Oliveira MG, Krieger MH. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide* 2002; 7:57-66.
62. Gobert AP, Cheng Y, Wang JY. Helicobacter pylori induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. *J Immunol* 2002; 168: 4692-700.
63. Cross RK, Wilson KT. Nitric Oxide in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2003; 9(3): 179-89.
64. Shishido SM, Seabra AB, Loh W, Oliveira MG. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release. *Biomaterials* 2003; 24:3543-3553.

65. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
66. Clancy R, Levartovsky D, Leszczynska-Piziak J, Yegudin J, Abramson S. Nitric oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose monophosphate shunt in human neutrophils: evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3680-84.
67. Belder A, Less C, Martin J, Moncada S. Treatment of help-syndrome with nitric oxide. *Lancet* 1995; 345: 124-8.
68. Dicks AP, Swift HR, Williams DLH, Butler AR, Al-Sadoni HH, Cox BG. Identification of Cu⁺ as the effective reagent in the nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO). *J Chem Socd, Perkin Trans* 1996; 2(4): 481-7.
69. Seabra AB, Fitzpatrick A, Paul J, Oliveira MG, Weller R. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *Bri J Dermat* 2004; 151:977-83.
70. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutics formulations. *Eur Jour Pharm and Biopharm* 2000; 50:27-46.
71. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Deliv Reviews* 2002; 43: 3-12.
72. Gonçalves FL, da Silva R, Schmidt AF, de Oliveira MG, Sbragia L. Hydrogel protection: a novel approach to reduce bowel inflammation in experimental gastroschisis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 148(1): 35-9.
73. Berger J, Reist M, Chenite A, Felt-Baeyens O, Mayer JM, Gurny R. Pseudo-termosetting chitosan hydrogels for biomedical application. *Int Jour Pharm* 2005; 288(1):17-25.

74. Schild HG. Poly(n-isopropylacrylamide) - experiment, theory and application. *Prog Polymer Sci* 1992; 17:163-249.
75. da Silva R, de Oliveira MG. Effect of the cross-linking degree on the morphology of poly(NIPAAm-co-AAc) hydrogels. *Polymer* 2007; 48:4114-22.
76. Gutowska A, Bark JS, Kwon C, Bai YH, Cha Y, Kim SW. Squeezing hhydrogels for controleed oral drug delivery. *J Controlled Oral Drug Deliv* 1997; 48:141-48.
77. Zhang XZ, Yang YY, Wang FJ, Chung TS. Thermosensitive Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) Hydrogels with Ecpanded Network Strusctures and Improved Oscillating Swelling-Deswelling Properties. *Langmuir* 2002; 18:2013-8.
78. Eberhard U, Broder M, Witzke G. Stability of Beriplast[®] P fibrin sealant: Storage and reconstitution. *Int Jour Pharm* 2006; 313:1-4.
79. Mouritzen C, Drömer M, Keinecke HO. The effect of fibrin glueing to seal bronchial and alveolar leakages after pulmonary resections and decortications. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 7(2):75-80.
80. de Oliveira MG, Shishido SM, Seabra AB, Morgon NH. Thermal stability of primary s-nitrosothiols: Roles of autocatalysis and sutructural effects on the rate of nitric oxide release. *J. Phys. Chem. A*, 2002; 106, 8963-70.
81. Bittencourt DG, Barreto MWG, França WMG, Gonçalves A, Pereira, LAV, Sbragia L. Impact of corticosteroid on intestinal injury in a gastroschisis rat model: morphometric analysis. *J Pediatr Surg* 2006; 41:547–53.
82. Ribeiro SR, Engler P JR, Miranda AC, Bromberg SH, Lopasso FP, Irya K. Original research weight loss and morphometric study of intestinal mucosa in rats after massive intestinal

resection. Influence of a glutamine-enriched diet. Rev Hosp Clin Pac Med S Paulo 2004; 59(6):349-56.

83. França WM, Langone F, de la Hoz CL, Gonçalves A, Bittencourt D, Pereira LV, Sbragia L. Maturity of the myenteric plexus is decreased in the gastroschisis rat model. Fetal Diagn Ther. 2008; 23(1):60-8.

84. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for a Quatitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem 1976; 72:248-54.

85. Guo W, Swaniker F, Fonkalsrud EW. Effect of intraamniotic dexamethasone asministration on intestinal absorption in a rabbit gastroschisis model. J Pediatr Surg 1995; 30:983-87.

86. Snyder CL. Outcome analysis for gastroschisis. J Pediatr Surg 1999; 34: 1253-6.

87. Albert A, Julia V, Morales L. Gastroschisis in the partially extraamniotic fetus: experimental study. J Pediatr Surg 1993; 28:656-59.

88. Albert A, Sancho MA, Juliá V, Díaz F, Bombí JA, Morales L. Intestinal damage in gastroschisis is independent of the size of the abdominal defect. Pediatr Surg Int. 2001; 17(2-3):116-19.

89. Yu J, Gonzalez_Reyes S, Diez-Pardo JA. Effects os prenatal dexamethasone on the intestine of rats with gastroschisis. J Pediatr Surg 2003; 38:1032-5.

90. Yu J, Gonzalez_Reyes S, Diez-Pardo JA. Local dexamethasone improves the intestinal lesions of gastroschisis in chick embryos. Pediatr Surg Int 2004; 19:780-4.

91. Shaw K, Buchmiller TL, Curr M. Impairment of nutrient uptake in a rabbit model of gastroschisis. J Pediatr Surg 1994; 29:376-8.

92. O'Neil AJR, Grosfeld JL. Intestinal malfunction after antenatal exposure of viscera. *Am J Surg* 1974; 127:128-32.
93. Stringel G, Filler RM. Prognostic factors in omphalocele and gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1979; 14:515-9.
94. Wennmalm A. Endotelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J Int Med* 1994; 235:317-27.
95. Jacobson J. Nitric oxide: platelet protectant properties during cardiopulmonary bypass/ECMO. *J Extra Corpor Technol* 2002; 34(2):144-7.
96. Abu-Soud HM, Ichimori K, Nakazawa, Stuehr DJ. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase by Self-Generated NO. *Biochemistry* 2001; 40: 6876-81.
97. Filho FR, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev Assoc Med Bras* 2000; 46(3):265-71.
98. Guslandi M. Nitric oxide and inflammatory bowel diseases. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(11): 904-7.
99. França WM, 1: França WM, Gonçalves A, Moraes SG, Pereira LA, Sbragia L. Esophageal atresia and other visceral anomalies in a modified Adriamycin rat model and their correlations with amniotic fluid volume variations. *Pediatr Surg Int* 2004; 20(8):602-8.
100. Cheung CY, Brace RA. Amniotic fluid volume and composition in mouse pregnancy. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12:558-62.
101. Shepard TH, Tanimura T, Park HW. Glucose absorption and utilization by rat embryos. *Int J Dev Biol* 1997; 41:307-14.

102. Wlodek ME, Westcott KT, Ho PW, Serruto A, Di Nicolantonio R, Farrugia W, Moseley JM. Reduced fetal, placental, and amniotic fluid PTHrP in the growth-restricted spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279:R31-8.
103. Dushi G, Lutz N, Hohlfeld J, Frey P. Morphogenesis of the ureterovesical junction: a histologic and microanatomic study in the rat. *Urology* 2002; 60:699-706.
104. Dvorak HF. Vascular permeability to plasma, plasma proteins and cells: an update. *Curr Opin Hematol* 2010; 17:225-9.
105. Di Lorenzo A, Fernandez-Hernando C, Cirino G, Sessa WC. Akt1 is critical for acute inflammation and histamina-mediated vascular leakage. *Proc Natl Acad Sci US A* 2009; 106: 14552-7.

9. APÊNDICES



CEEAA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1452-1, sobre "Avaliação da proteção das alças intestinais fetais utilizando hidrogel (biomaterial) e óxido nítrico no modelo experimental de gastrosquise", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto / Frances Lilian Lanhellas Gonçalves, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em 31 de março de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1452-1, entitled "Evaluation of hydrogel (biomaterial) and nitric oxide in the protection of the fetal bowel in the animal model of gastroschisis", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 31, 2008.

Campinas, 31 de março de 2008.

Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEAA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Tabela 7 - Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g) e Relação Peso Intestinal/Peso Corporal para os 14 grupos comparados.

Feto	Grupo	PC	PI	PI/PC
1	CE	6,6029	0,1790	0,0271
2	CE	6,3040	0,1893	0,0300
3	CE	5,9308	0,1593	0,0269
4	CE	5,9436	0,1551	0,0261
5	CE	5,9773	0,1917	0,0321
6	CE	5,2566	0,1587	0,0302
7	CE	5,3992	0,1596	0,0296
8	CE	5,7513	0,1661	0,0289
9	CE	5,0698	0,1575	0,0311
10	CE	5,7270	0,1851	0,0323
11	CE	6,5230	0,2125	0,0326
12	CE	6,5076	0,2156	0,0331
MÉDIA	CE	5,9161	0,1775	0,0299
DP	CE	0,5069	0,0216	0,0016
MÍN	CE	5,0698	0,1551	0,0278
MÁX	CE	6,6029	0,2156	0,0327
13	G	4,8096	0,2163	0,0450
14	G	5,7755	0,2411	0,0418
15	G	5,5097	0,1828	0,0332
16	G	4,995	0,2716	0,0544
17	G	3,237	0,1552	0,0480
18	G	3,4934	0,1923	0,0551
19	G	4,2611	0,224	0,0526
20	G	3,7250	0,1394	0,0374
21	G	4,6543	0,2565	0,0551
22	G	4,9087	0,1923	0,0392
23	G	3,6543	0,2009	0,0550
24	G	3,6108	0,2167	0,0600
MÉDIA	G	4,3862	0,2074	0,0474
DP	G	0,8418	0,0388	0,0029
MÍN	G	3,2470	0,1394	0,0431
MÁX	G	5,7755	0,2716	0,0526
25	CI	6,4900	0,1945	0,0300
26	CI	5,3756	0,1836	0,0342
27	CI	5,6507	0,1189	0,0210
28	CI	5,8241	0,1605	0,0276
29	CI	6,3586	0,1873	0,0295
30	CI	5,9295	0,1991	0,0336
31	CI	4,7925	0,1151	0,0240
32	CI	4,8867	0,138	0,0282

33	CI	3,6526	0,1115	0,0305
34	CI	3,3554	0,0898	0,0268
35	CI	4,0824	0,1298	0,0318
36	CI	5,1170	0,151	0,0295
MÉDIA	CI	5,1263	0,1483	0,0289
DP	CI	1,0186	0,0367	0,0038
MÍN	CI	3,3554	0,0898	0,0248
MÁX	CI	6,4900	0,1991	0,0316
37	S	5,7375	0,1787	0,0311
38	S	3,8857	0,1720	0,0443
39	S	4,0371	0,1324	0,0328
40	S	4,0552	0,1081	0,0267
41	S	3,4275	0,1115	0,0325
42	S	4,6791	0,1401	0,0299
43	S	3,8381	0,1053	0,0274
44	S	5,1158	0,1441	0,0282
45	S	3,3504	0,1803	0,0538
46	S	3,9626	0,0986	0,0249
47	S	5,4465	0,1347	0,0247
48	S	6,1375	0,1853	0,0302
MÉDIA	S	4,4728	0,1409	0,0314
DP	S	0,9293	0,0317	0,0021
MÍN	S	3,3504	0,0986	0,0282
MÁX	S	6,1375	0,1853	0,0345
49	GA	3,6309	0,1387	0,0382
50	GA	4,2107	0,1318	0,0313
51	GA	4,0739	0,1877	0,0461
52	GA	4,5616	0,1397	0,0306
53	GA	3,2368	0,0875	0,0270
54	GA	4,4898	0,1726	0,0384
55	GA	5,0117	0,1474	0,0294
56	GA	4,1147	0,1499	0,0364
57	GA	4,1622	0,1475	0,0354
58	GA	3,9302	0,1574	0,0400
59	GA	3,9923	0,0887	0,0222
60	GA	4,2060	0,1689	0,0402
MÉDIA	GA	4,1351	0,1432	0,0343
DP	GA	0,4488	0,0302	0,0043
MÍN	GA	3,2368	0,0875	0,0244
MÁX	GA	5,0117	0,1877	0,0378
61	GAH	4,2883	0,1489	0,0347
62	GAH	4,5718	0,1606	0,0351
63	GAH	4,0168	0,1894	0,0472
64	GAH	3,4219	0,2134	0,0624
65	GAH	3,9656	0,1814	0,0457
66	GAH	4,388	0,1975	0,0450

67	GAH	5,3604	0,1414	0,0264
68	GAH	3,9882	0,2090	0,0524
69	GAH	3,8797	0,1620	0,0418
70	GAH	4,4936	0,1441	0,0321
71	GAH	5,4354	0,1547	0,0285
72	GAH	5,7189	0,1282	0,0224
MÉDIA	GAH	4,4607	0,1692	0,0379
DP	GAH	0,7054	0,0282	0,0016
MÍN	GAH	3,4219	0,1282	0,0363
MÁX	GAH	5,7189	0,2134	0,0414
73	GNO2	3,6032	0,1367	0,0379
74	GNO2	3,3481	0,1476	0,0441
75	GNO2	5,0034	0,1986	0,0397
76	GNO2	5,1195	0,2073	0,0405
77	GNO2	4,8549	0,2287	0,0471
78	GNO2	4,7767	0,2001	0,0419
79	GNO2	4,3435	0,2344	0,0540
80	GNO2	5,4695	0,2491	0,0455
81	GNO2	5,0848	0,2448	0,0481
82	GNO2	5,0649	0,2588	0,0511
83	GNO2	4,0058	0,2510	0,0627
84	GNO2	3,4188	0,2315	0,0677
MÉDIA	GNO2	4,5535	0,2180	0,0478
DP	GNO2	0,7266	0,0389	0,0033
MÍN	GNO2	3,3481	0,1367	0,0408
MÁX	GNO2	5,4695	0,2588	0,0551
85	GNO2C	4,2976	0,1315	0,0306
86	GNO2C	5,1937	0,1678	0,0323
87	GNO2C	4,9123	0,1380	0,0281
88	GNO2C	3,8027	0,1331	0,0350
89	GNO2C	4,3518	0,1591	0,0366
90	GNO2C	5,1601	0,1471	0,0285
91	GNO2C	4,3512	0,1270	0,0292
92	GNO2C	4,1488	0,1325	0,0319
93	GNO2C	5,7936	0,1785	0,0308
94	GNO2C	4,8335	0,1378	0,0285
95	GNO2C	6,0099	0,2126	0,0354
96	GNO2C	5,9375	0,2013	0,0339
MÉDIA	GNO2C	4,8994	0,1555	0,0317
DP	GNO2C	0,7384	0,0289	0,0019
MÍN	GNO2C	3,8027	0,1270	0,0286
MÁX	GNO2C	6,0099	0,2126	0,0354
97	GNO3	5,8275	0,1979	0,0340
98	GNO3	4,9533	0,2012	0,0406
99	GNO3	5,4010	0,2776	0,0514
100	GNO3	4,4068	0,2551	0,0579

101	GNO3	4,7808	0,1960	0,0410
102	GNO3	4,2732	0,1447	0,0339
103	GNO3	3,7024	0,1927	0,0520
104	GNO3	4,4947	0,1339	0,0298
105	GNO3	3,6032	0,1367	0,0379
106	GNO3	3,3481	0,1476	0,0441
107	GNO3	4,8976	0,1546	0,0316
108	GNO3	4,7120	0,1350	0,0287
MÉDIA	GNO3	4,5334	0,1811	0,0395
DP	GNO3	0,7308	0,0480	0,0046
MÍN	GNO3	3,3481	0,1334	0,0335
MÁX	GNO3	5,8275	0,2776	0,0476
109	GNO3C	5,8462	0,1852	0,0317
110	GNO3C	6,1279	0,2312	0,0377
111	GNO3C	6,1049	0,1936	0,0317
112	GNO3C	5,9133	0,1925	0,0326
113	GNO3C	4,8130	0,1408	0,0293
114	GNO3C	4,9018	0,1583	0,0323
115	GNO3C	4,7124	0,1217	0,0258
116	GNO3C	4,5831	0,2259	0,0493
117	GNO3C	4,9622	0,1460	0,0294
118	GNO3C	4,8640	0,1282	0,0264
119	GNO3C	5,9683	0,1666	0,0279
120	GNO3C	5,4650	0,1746	0,0319
MÉDIA	GNO3C	5,3552	0,1721	0,0319
DP	GNO3C	0,6033	0,0354	0,0034
MÍN	GNO3C	4,5831	0,1217	0,0266
MÁX	GNO3C	6,1279	0,2312	0,0377
121	GNO4	4,5864	0,2035	0,0444
122	GNO4	4,9127	0,2493	0,0507
123	GNO4	3,4824	0,1238	0,0356
124	GNO4	3,2609	0,0942	0,0289
125	GNO4	3,0528	0,1227	0,0402
126	GNO4	4,3841	0,2606	0,0594
127	GNO4	5,1095	0,2123	0,0416
128	GNO4	3,9248	0,1609	0,0410
129	GNO4	3,6279	0,1464	0,0404
130	GNO4	4,1814	0,1296	0,0310
131	GNO4	4,2900	0,1638	0,0382
132	GNO4	4,2223	0,1410	0,0334
MÉDIA	GNO4	4,0863	0,1673	0,0401
DP	GNO4	0,6387	0,5227	0,0067
MÍN	GNO4	3,0528	0,0942	0,0309
MÁX	GNO4	5,1095	0,2606	0,0510
133	GNO4C	3,2590	0,0940	0,0288
134	GNO4C	4,3544	0,1560	0,0358

135	GNO4C	4,1818	0,1494	0,0357
136	GNO4C	5,5206	0,1997	0,0362
137	GNO4C	4,1133	0,1698	0,0413
138	GNO4C	4,0126	0,1351	0,0337
139	GNO4C	4,4603	0,1656	0,0371
140	GNO4C	4,1667	0,1328	0,0319
141	GNO4C	3,8418	0,1202	0,0313
142	GNO4C	6,0791	0,1606	0,0264
143	GNO4C	5,1526	0,1442	0,0280
144	GNO4C	5,3130	0,1766	0,0332
MÉDIA	GNO4C	4,5379	0,1503	0,0331
DP	GNO4C	0,8091	0,0279	0,0021
MÍN	GNO4C	3,2590	0,0940	0,0288
MÁX	GNO4C	6,0791	0,1997	0,0360
145	GAHNO4	3,6032	0,1367	0,0379
146	GAHNO4	3,3481	0,1476	0,0441
147	GAHNO4	4,7490	0,1762	0,0371
148	GAHNO4	3,6787	0,1077	0,0293
149	GAHNO4	3,6894	0,1107	0,0300
150	GAHNO4	3,0551	0,0993	0,0325
151	GAHNO4	3,6543	0,1543	0,0422
152	GAHNO4	3,8014	0,1600	0,0421
153	GAHNO4	3,7898	0,1274	0,0336
154	GAHNO4	3,6533	0,1665	0,0456
155	GAHNO4	3,9876	0,1587	0,0398
156	GAHNO4	3,5641	0,1320	0,0370
MÉDIA	GAHNO4	3,7145	0,1398	0,0374
DP	GAHNO4	0,4013	0,0249	0,0041
MÍN	GAHNO4	3,0551	0,0993	0,0311
MÁX	GAHNO4	4,7490	0,1762	0,0421
157	GAHNO4C	4,2976	0,1454	0,0338
158	GAHNO4C	4,1937	0,1178	0,0281
159	GAHNO4C	4,9123	0,1380	0,0281
160	GAHNO4C	3,8027	0,1331	0,0350
161	GAHNO4C	3,2212	0,1453	0,0451
162	GAHNO4C	4,3518	0,1291	0,0297
163	GAHNO4C	3,1601	0,1071	0,0339
164	GAHNO4C	4,3512	0,1270	0,0292
165	GAHNO4C	4,1488	0,1325	0,0319
166	GAHNO4C	4,8653	0,1386	0,0285
167	GAHNO4C	3,8086	0,1299	0,0341
168	GAHNO4C	3,3227	0,1393	0,0419
MÉDIA	GAHNO4C	4,0363	0,1319	0,0330
DP	GAHNO4C	0,5883	0,0111	0,0025
MÍN	GAHNO4C	3,1601	0,1071	0,0296
MÁX	GAHNO4C	4,9123	0,1454	0,0382

Tabela 8 - Resultado das aferições do Diâmetro externo I (μm), Diâmetro interno I (μm), Diâmetro externo II (μm), Diâmetro interno II (μm) para os dez grupos estudados.

Cortes	Grupo	DE-I	DE-II	DI-I	DI-II
1	CE	643,02	597,22	555,22	529,07
2	CE	750,14	622,47	669,53	532,54
3	CE	738,50	627,42	644,21	533,15
4	CE	630,32	603,27	538,31	534,58
5	CE	643,23	612,59	546,44	535,34
6	CE	640,01	599,47	537,15	536,68
7	CE	929,40	844,67	827,25	542,59
8	CE	940,28	857,20	831,41	545,90
9	CE	963,94	777,40	833,42	552,56
10	CE	756,60	613,11	668,63	556,03
11	CE	747,94	613,54	675,23	563,23
12	CE	644,95	604,20	527,70	579,09
13	CE	734,50	638,86	651,30	635,79
14	CE	736,43	614,96	635,76	746,88
15	CE	740,85	633,11	652,71	576,39
MÉDIA	CE	749,34	657,30	652,95	576,39
DP	CE	111,85	89,79	106,68	69,80
MÍN	CE	630,32	597,22	527,70	529,07
MÁX	CE	963,94	857,20	833,42	746,88
16	G	1219,13	1257,75	1068,63	865,99
17	G	1315,35	1133,96	1124,46	905,52
18	G	1309,51	1236,28	1062,19	911,33
19	G	1303,53	1242,11	1063,34	914,85
20	G	1318,36	1184,38	1110,62	977,18
21	G	1280,43	1176,81	1079,47	1012,16
22	G	1276,28	1204,22	1007,01	1042,76
23	G	1289,98	1206,54	1048,64	1051,63
24	G	1310,38	1220,90	1046,42	1054,55
25	G	1432,82	1214,30	1226,31	1058,10
26	G	1417,18	1227,56	1237,83	1060,91
27	G	1414,21	1238,59	1243,75	1072,37
28	G	1391,94	1287,17	1247,77	1072,57
29	G	1220,14	1126,46	1055,40	1112,40
30	G	1210,82	1138,68	1019,77	1013,62
MÉDIA	G	1314,00	1206,38	1109,44	1013,62
DP	G	72,03	46,81	86,02	78,39
MÍN	G	1012,82	1126,46	1007,01	865,99
MÁX	G	1432,82	1287,17	1247,77	1112,40

31	CI	902,37	803,34	805,50	615,50
32	CI	917,04	799,01	813,03	621,06
33	CI	915,21	764,89	806,32	624,01
34	CI	835,00	769,26	719,35	624,08
35	CI	819,62	728,59	727,53	635,84
36	CI	731,79	742,68	606,97	650,60
37	CI	901,56	802,35	746,56	678,28
38	CI	718,54	800,01	805,43	680,91
39	CI	865,56	720,87	601,13	681,91
40	CI	810,67	730,71	611,90	702,09
41	CI	759,55	781,64	600,93	702,26
42	CI	703,97	769,07	603,54	716,51
43	CI	731,99	699,08	722,91	724,40
44	CI	704,76	710,89	701,54	786,46
45	CI	865,87	765,54	802,54	682,00
MÉDIA	CI	812,23	759,20	711,68	682,00
DP	CI	80,94	35,13	86,16	55,75
MÍN	CI	903,97	699,08	600,93	615,50
MÁX	CI	917,04	903,34	813,03	786,46
46	S	1025,71	857,77	887,60	543,35
47	S	818,50	778,73	717,33	554,82
48	S	955,68	764,62	854,77	573,48
49	S	1012,07	868,93	892,90	586,44
50	S	830,57	753,97	711,77	640,68
51	S	1022,02	871,26	882,45	664,14
52	S	745,39	683,81	593,61	665,75
53	S	708,36	705,02	598,39	681,03
54	S	691,96	681,62	576,78	762,84
55	S	990,06	862,63	867,06	777,80
56	S	1000,97	863,88	842,17	778,71
57	S	975,20	883,94	846,26	778,83
58	S	989,86	854,80	859,07	779,59
59	S	932,69	770,00	817,12	797,73
60	S	761,68	686,95	631,97	691,58
MÉDIA	S	897,38	792,53	771,95	691,58
DP	S	123,59	77,65	120,24	94,84
MÍN	S	691,96	681,62	576,78	543,35
MÁX	S	1025,71	883,94	892,90	797,73
61	GA	1155,69	990,75	950,79	829,00
62	GA	1348,54	991,81	1099,79	837,08
63	GA	1310,21	996,65	1107,07	904,63
64	GA	1297,13	1164,73	1088,13	965,96
65	GA	1415,54	1175,62	1034,53	976,98
66	GA	1437,74	1176,58	1039,02	988,01

67	GA	1154,88	1190,87	1087,35	993,27
68	GA	1354,98	1205,45	1003,91	999,79
69	GA	1310,77	1227,68	1187,34	1022,10
70	GA	1450,79	1228,81	987,46	1023,43
71	GA	1100,76	1264,42	1045,35	1034,53
72	GA	104,87	1286,34	1043,91	1079,12
73	GA	1269,65	1309,10	1087,32	1083,67
74	GA	1280,54	1347,83	1076,03	1163,03
75	GA	1309,76	1391,87	1023,23	999,95
MÉDIA	GA	1220,12	1196,57	1057,41	995,95
DP	GA	324,73	123,80	57,14	92,02
MÍN	GA	1155,69	990,75	950,79	829,00
MÁX	GA	1450,79	1391,87	1187,34	1163,03
76	GAH	984,30	677,65	781,40	576,71
77	GAH	704,33	683,69	627,00	584,03
78	GAH	732,48	721,54	644,85	598,97
79	GAH	804,92	728,79	706,19	605,89
80	GAH	839,88	730,49	750,96	610,32
81	GAH	692,93	735,99	613,65	632,08
82	GAH	709,65	751,21	768,41	643,03
83	GAH	770,55	756,89	635,10	651,54
84	GAH	854,00	764,73	821,23	656,05
85	GAH	805,99	768,99	654,40	657,85
86	GAH	904,32	802,13	602,79	703,38
87	GAH	965,85	809,87	723,46	706,72
88	GAH	728,95	824,56	790,34	732,45
89	GAH	867,99	867,09	698,44	789,80
90	GAH	896,51	911,81	720,32	661,15
MÉDIA	GAH	817,51	769,03	702,57	661,15
DP	GAH	94,68	64,60	70,32	65,95
MÍN	GAH	965,85	677,65	602,79	576,71
MÁX	GAH	692,93	911,81	821,23	789,80
91	GNO2	1176,93	959,20	1008,01	814,35
92	GNO2	1538,30	986,00	1331,27	831,87
93	GNO2	1556,37	995,80	1383,51	847,81
94	GNO2	1151,38	1011,30	1022,25	874,88
95	GNO2	1163,52	1028,69	974,67	877,36
96	GNO2	1562,30	1040,38	1384,49	908,18
97	GNO2	1138,80	1040,40	993,28	911,85
98	GNO2	1151,18	1046,59	1012,58	916,90
99	GNO2	1135,46	1061,06	997,46	926,31
100	GNO2	1138,91	1062,07	1026,80	926,58
101	GNO2	1032,50	1065,29	911,11	953,39
102	GNO2	1403,83	1074,46	1337,44	960,42

103	GNO2	1220,08	1270,50	1054,69	1132,73
104	GNO2	1392,43	1274,57	1250,88	1254,48
105	GNO2	1371,57	1393,77	1181,96	957,28
MÉDIA	GNO2	1275,57	1087,34	1124,69	597,28
DP	GNO2	177,64	123,88	167,83	135,90
MÍN	GNO2	1032,50	959,20	911,11	814,35
MÁX	GNO2	1562,30	1393,77	1384,49	1254,48
106	GNO3	821,41	959,20	667,70	532,94
107	GNO3	843,82	986,00	680,44	545,61
108	GNO3	832,46	995,80	670,23	551,36
109	GNO3	1216,64	1011,30	920,25	555,46
110	GNO3	1181,70	1028,69	777,78	629,01
111	GNO3	1247,43	1040,38	800,17	661,39
112	GNO3	1309,64	1040,40	1230,32	689,40
113	GNO3	1200,52	1046,59	1038,30	692,87
114	GNO3	1276,57	1061,06	1145,70	714,94
115	GNO3	851,28	1062,07	670,69	730,58
116	GNO3	1280,95	1065,29	1028,51	745,83
117	GNO3	1183,78	1074,46	926,25	842,98
118	GNO3	983,59	1270,50	830,09	849,54
119	GNO3	993,78	1274,57	836,73	1023,24
120	GNO3	1299,32	1393,77	1162,12	711,57
MÉDIA	GNO3	1101,52	1087,34	892,35	711,57
DP	GNO3	190,53	123,88	191,87	144,76
MÍN	GNO3	821,41	694,32	667,70	532,94
MÁX	GNO3	1309,64	1202,33	1230,32	1023,24
121	GNO4	788,73	583,85	658,77	492,30
122	GNO4	754,83	615,32	640,65	507,87
123	GNO4	706,85	622,16	593,61	527,96
124	GNO4	772,59	631,30	670,20	541,01
125	GNO4	741,98	633,25	639,46	545,41
126	GNO4	748,24	641,77	640,02	545,76
127	GNO4	795,51	656,42	714,25	552,97
128	GNO4	870,87	679,45	817,17	555,76
129	GNO4	935,22	681,94	805,55	564,03
130	GNO4	1078,71	684,35	790,23	569,56
131	GNO4	748,58	720,13	657,83	574,57
132	GNO4	718,51	740,08	601,49	653,78
133	GNO4	861,85	804,17	726,79	684,42
134	GNO4	839,13	814,71	597,51	878,40
135	GNO4	881,42	855,26	707,15	593,15
MÉDIA	GNO4	816,20	690,94	684,05	593,15
DP	GNO4	98,55	80,66	74,09	99,73

MÍN	GNO4	706,85	583,85	593,61	492,30
MÁX	GNO4	1078,71	855,26	817,17	878,40
136	GAHNO4	669,61	485,72	615,40	424,22
137	GAHNO4	833,81	507,82	755,94	434,57
138	GAHNO4	667,09	526,13	583,94	442,62
139	GAHNO4	657,45	529,83	586,96	480,55
140	GAHNO4	837,36	531,76	746,78	481,93
141	GAHNO4	836,45	581,58	759,69	497,21
142	GAHNO4	1042,61	588,24	919,16	532,85
143	GAHNO4	955,71	665,82	843,26	544,83
144	GAHNO4	925,02	679,84	726,41	589,39
145	GAHNO4	794,10	687,28	616,65	597,81
146	GAHNO4	632,38	707,92	661,34	613,33
147	GAHNO4	868,65	740,14	783,10	624,22
148	GAHNO4	960,67	814,69	841,63	637,25
149	GAHNO4	844,34	826,17	789,52	654,30
150	GAHNO4	706,02	890,10	630,19	546,80
MÉDIA	GAHNO4	815,42	650,87	724,00	546,80
DP	GAHNO4	126,34	127,97	103,92	82,09
MÍN	GAHNO4	632,38	485,72	583,94	424,22
MÁX	GAHNO4	1042,61	890,10	919,16	654,30

Tabela 9 - Resultado das aferições das camadas serosa, muscular longitudinal, muscular circular, submucosa e mucosa e parede total intestinal, em μm , para os dez grupos estudados.

Cortes	Grupo	Serosa	Muscular Longitudinal	Muscular Circular	Submucosa e Mucosa	Parede
1	CE	1,16	4,35	8,50	18,40	39,22
2	CE	2,36	4,72	8,61	21,23	41,06
3	CE	2,36	4,81	8,61	22,65	42,05
4	CE	2,36	5,21	8,70	24,89	43,18
5	CE	2,36	5,27	8,77	26,57	43,46
6	CE	2,54	5,83	8,95	27,56	46,30
7	CE	2,83	5,91	9,91	27,93	46,56
8	CE	2,87	5,91	9,95	29,90	49,12
9	CE	2,98	6,15	10,09	30,61	50,53
10	CE	2,98	6,15	10,64	30,89	50,64
11	CE	3,30	6,35	11,01	31,02	50,81
12	CE	3,34	6,60	11,36	31,13	52,19
13	CE	3,34	6,75	11,40	31,32	53,04

14	CE	3,43	6,87	11,65	31,77	54,07
15	CE	3,77	7,01	11,83	32,12	57,20
16	CE	3,77	7,14	12,70	33,52	57,88
17	CE	3,80	7,32	13,16	39,26	61,08
18	CE	3,80	8,02	13,24	40,70	63,50
19	CE	4,06	8,35	18,06	40,89	72,39
20	CE	4,06	10,35	19,75	55,23	73,54
MÉDIA	CE	3,07	6,45	11,34	31,38	52,39
DP	CE	0,74	1,40	3,02	8,13	9,64
MÍN	CE	1,16	4,35	8,50	18,40	39,22
MÁX	CE	4,06	10,35	19,75	55,23	73,54
21	G	3,34	10,03	20,60	23,70	88,57
22	G	3,40	12,98	22,17	35,29	99,59
23	G	3,68	14,00	23,87	37,05	100,93
24	G	4,06	14,26	28,91	43,29	101,48
25	G	4,06	14,77	31,36	45,29	104,79
26	G	4,22	14,80	32,31	46,57	109,61
27	G	4,35	14,92	35,83	46,62	111,64
28	G	4,45	15,10	35,88	47,10	113,49
29	G	4,47	15,68	38,69	48,28	114,35
30	G	4,47	15,71	39,04	57,47	117,41
31	G	4,72	16,29	40,43	58,10	120,10
32	G	4,72	16,50	40,74	58,80	124,06
33	G	5,08	16,62	41,35	64,15	130,94
34	G	5,21	16,86	42,28	66,03	133,24
35	G	5,66	17,01	42,91	69,20	141,35
36	G	5,68	17,10	44,91	71,85	143,77
37	G	5,97	20,72	49,46	76,37	145,53
38	G	6,13	21,02	49,50	84,55	151,02
39	G	7,01	23,42	51,38	87,39	152,97
40	G	8,86	24,25	51,64	99,40	154,16
MÉDIA	G	4,98	16,60	38,16	58,33	122,95
DP	G	1,32	3,43	9,36	19,22	20,04
MÍN	G	3,34	10,03	20,60	23,70	88,57
MÁX	G	8,86	24,25	51,64	99,40	154,16
41	CI	1,80	4,03	8,14	14,53	35,90
42	CI	1,85	4,22	8,37	30,85	41,41
43	CI	1,94	4,27	8,49	30,88	49,38
44	CI	1,98	4,29	10,60	32,85	51,77
45	CI	2,11	4,92	10,99	32,88	52,77
46	CI	2,23	4,98	11,37	35,73	52,88
47	CI	2,34	5,23	11,38	36,40	55,37
48	CI	2,34	5,44	11,46	36,47	55,75
49	CI	2,35	5,67	11,84	36,64	58,10
50	CI	2,35	5,68	11,87	36,68	58,38
51	CI	2,36	5,75	11,87	36,88	58,47

52	CI	2,41	5,76	11,88	36,98	59,76
53	CI	2,44	6,02	12,37	37,51	59,89
54	CI	2,46	6,04	12,48	37,68	60,74
55	CI	2,75	6,10	12,88	37,76	61,77
56	CI	2,77	6,20	13,32	38,51	63,88
57	CI	3,03	6,24	13,71	38,78	67,28
58	CI	3,09	6,83	13,74	41,77	70,39
59	CI	3,34	7,11	13,75	42,88	78,19
60	CI	3,40	7,61	16,35	63,50	80,76
MÉDIA	CI	2,47	5,62	11,84	36,81	58,64
DP	CI	0,46	0,98	1,98	8,53	10,67
MÍN	CI	1,80	4,03	8,14	14,53	35,90
MÁX	CI	3,40	7,61	16,35	63,50	80,76
61	S	1,33	4,86	8,06	18,20	36,80
62	S	1,94	4,86	8,66	22,50	43,70
63	S	2,00	5,01	10,16	24,83	47,10
64	S	2,54	5,38	11,01	26,59	50,29
65	S	2,54	5,66	11,36	26,68	52,42
66	S	2,67	6,60	11,91	28,62	52,50
67	S	2,83	6,67	11,94	28,96	52,95
68	S	3,30	6,75	12,35	29,70	55,32
69	S	3,30	7,08	12,77	30,66	57,92
70	S	3,34	7,62	12,95	33,33	58,05
71	S	3,43	7,68	13,05	35,76	63,92
72	S	3,68	7,68	13,49	39,14	64,11
73	S	3,80	7,91	14,19	39,90	64,13
74	S	3,89	8,07	14,19	40,70	64,37
75	S	4,03	8,07	14,69	42,11	65,82
76	S	4,03	8,49	14,81	44,90	67,98
77	S	4,74	8,66	15,28	46,24	69,81
78	S	4,81	9,43	16,51	48,86	75,59
79	S	4,92	12,87	23,58	52,31	78,32
80	S	5,21	13,58	31,28	53,63	90,32
MÉDIA	S	3,42	7,65	14,11	35,68	60,57
DP	S	1,06	2,32	5,18	10,23	12,59
MÍN	S	1,33	4,86	8,06	18,20	36,80
MÁX	S	5,21	13,58	31,28	53,63	90,32
81	GA	3,40	8,12	19,35	34,92	80,38
82	GA	3,49	10,35	22,25	44,05	83,76
83	GA	3,59	10,38	23,09	47,99	87,35
84	GA	3,68	10,97	23,57	49,48	88,79
85	GA	3,79	11,10	23,88	50,23	90,11
86	GA	3,99	11,82	24,48	50,28	91,53
87	GA	4,24	11,84	24,48	50,88	94,34
88	GA	4,27	11,88	25,24	52,68	94,53
89	GA	4,49	12,56	25,39	52,83	95,47

90	GA	4,58	12,67	25,44	53,09	95,48
91	GA	4,63	12,78	26,33	53,71	97,78
92	GA	4,68	12,79	26,34	53,88	99,90
93	GA	4,74	12,81	26,77	56,11	100,95
94	GA	4,75	12,89	27,37	56,90	103,48
95	GA	4,80	12,90	27,57	56,99	105,68
96	GA	5,02	13,90	28,38	57,75	109,72
97	GA	5,10	15,21	30,22	59,48	110,75
98	GA	5,84	15,57	30,98	60,54	116,48
99	GA	6,00	15,68	32,70	66,46	120,49
100	GA	6,55	17,17	37,76	68,68	126,48
MÉDIA	GA	4,58	12,67	26,58	53,85	99,67
DP	GA	0,85	2,11	4,06	7,40	12,26
MÍN	GA	3,40	8,12	19,35	34,92	80,38
MÁX	GA	6,55	17,17	37,76	68,68	126,48
101	GAH	2,53	4,86	6,55	23,88	32,71
102	GAH	2,54	6,46	9,43	25,99	42,10
103	GAH	2,54	6,88	9,71	26,36	44,48
104	GAH	2,94	6,96	12,32	27,93	49,86
105	GAH	3,01	6,98	12,32	28,38	52,39
106	GAH	3,11	7,01	12,47	28,66	55,61
107	GAH	3,21	7,09	13,10	30,99	56,48
108	GAH	3,23	7,54	13,41	31,80	59,34
109	GAH	3,30	7,91	13,88	31,99	59,47
110	GAH	3,34	7,98	13,88	32,45	62,47
111	GAH	3,50	8,06	13,99	32,57	63,25
112	GAH	3,52	8,28	14,79	32,78	67,36
113	GAH	3,52	8,47	15,38	33,64	68,37
114	GAH	3,80	8,48	15,45	33,99	68,47
115	GAH	3,84	8,67	15,77	35,87	68,48
116	GAH	4,00	9,06	15,87	35,99	68,87
117	GAH	4,03	9,68	16,99	36,17	69,46
118	GAH	4,03	9,84	17,01	39,37	70,49
119	GAH	4,72	10,34	18,37	39,54	71,32
120	GAH	4,95	11,05	18,78	40,59	59,49
MÉDIA	GAH	3,48	8,08	13,97	32,45	59,52
DP	GAH	0,66	1,46	3,04	4,66	11,02
MÍN	GAH	2,53	4,86	6,55	23,88	32,71
MÁX	GAH	4,95	11,05	18,78	40,59	59,49
121	GNO2	2,54	6,60	9,68	20,88	57,17
122	GNO2	3,02	9,72	12,74	27,50	65,96
123	GNO2	3,30	9,91	13,28	28,87	67,11
124	GNO2	3,40	9,95	16,04	34,55	69,83
125	GNO2	3,40	9,95	16,27	34,87	76,00
126	GNO2	4,22	10,00	17,98	38,28	78,37
127	GNO2	4,25	11,79	19,08	42,62	79,34

128	GNO2	4,72	11,91	19,83	47,87	79,58
129	GNO2	4,74	12,03	19,88	49,62	80,50
130	GNO2	4,86	12,56	19,91	50,94	83,08
131	GNO2	5,01	13,24	20,37	51,52	89,95
132	GNO2	5,08	13,75	20,48	53,40	90,63
133	GNO2	5,10	14,89	21,12	55,88	91,11
134	GNO2	5,10	15,59	21,55	57,75	103,09
135	GNO2	5,19	17,09	21,95	59,46	103,37
136	GNO2	5,21	17,48	23,23	61,51	106,80
137	GNO2	5,70	18,58	25,11	68,35	116,06
138	GNO2	6,13	18,61	27,25	76,28	118,77
139	GNO2	7,01	19,84	35,32	77,91	124,34
140	GNO2	7,61	21,53	37,08	81,46	143,91
MÉDIA	GNO2	4,78	13,75	20,91	50,98	91,25
DP	GNO2	1,28	4,05	6,67	17,13	22,33
MÍN	GNO2	2,54	6,60	9,68	20,88	57,17
MÁX	GNO2	7,61	21,53	37,08	81,46	143,91
141	GNO3	2,83	5,19	10,38	31,26	53,79
142	GNO3	2,83	6,60	13,05	33,05	58,61
143	GNO3	3,02	7,08	14,15	34,18	68,15
144	GNO3	3,16	9,71	17,14	36,74	77,72
145	GNO3	3,30	10,08	17,93	38,95	82,07
146	GNO3	3,34	10,16	20,01	39,52	82,52
147	GNO3	3,59	11,52	21,55	43,58	83,54
148	GNO3	3,80	11,83	21,97	44,35	84,26
149	GNO3	4,25	11,83	22,02	45,24	87,41
150	GNO3	4,25	13,34	22,17	45,83	88,40
151	GNO3	4,72	13,87	23,64	46,28	90,11
152	GNO3	4,81	14,15	24,15	47,83	92,46
153	GNO3	5,10	14,47	25,11	51,42	96,24
154	GNO3	5,19	14,92	25,20	52,43	104,88
155	GNO3	5,52	15,59	26,59	56,61	108,12
156	GNO3	6,13	15,62	29,07	58,02	110,57
157	GNO3	6,42	16,54	34,92	61,85	119,82
158	GNO3	6,42	16,88	38,18	66,18	123,50
159	GNO3	6,55	17,96	42,28	85,23	125,20
160	GNO3	6,75	18,89	47,93	86,82	136,72
MÉDIA	GNO3	4,60	12,81	24,87	50,27	93,70
DP	GNO3	1,36	3,82	9,64	15,46	22,13
MÍN	GNO3	2,83	5,19	10,38	31,26	53,79
MÁX	GNO3	6,75	18,89	47,93	86,82	136,72
161	GNO4	2,11	5,97	9,92	22,84	56,13
162	GNO4	2,83	6,15	14,80	31,12	57,55
163	GNO4	2,98	6,80	16,48	33,01	65,77
164	GNO4	3,02	9,40	17,93	33,73	69,37
165	GNO4	3,02	10,01	18,22	34,92	71,79

166	GNO4	3,34	10,08	19,84	38,81	74,34
167	GNO4	3,59	10,20	20,48	40,79	78,05
168	GNO4	3,59	10,44	20,78	42,01	79,36
169	GNO4	3,59	10,64	21,74	45,95	82,49
170	GNO4	3,60	10,67	21,79	47,25	86,97
171	GNO4	3,75	12,03	22,65	54,25	88,82
172	GNO4	4,22	12,66	22,95	56,89	96,91
173	GNO4	4,22	12,87	23,23	58,05	99,48
174	GNO4	4,25	13,24	23,72	58,62	99,77
175	GNO4	4,35	13,34	23,77	61,73	102,16
176	GNO4	4,72	13,80	25,79	65,70	109,37
177	GNO4	5,01	14,47	36,55	67,94	112,25
178	GNO4	5,27	14,77	37,77	68,79	133,48
179	GNO4	5,97	15,86	39,36	71,08	146,97
180	GNO4	6,70	17,90	40,38	90,98	193,56
MÉDIA	GNO4	4,01	11,56	23,91	51,22	95,23
DP	GNO4	1,12	3,15	8,33	17,06	32,99
MÍN	GNO4	2,11	5,97	9,92	22,84	56,13
MÁX	GNO4	6,70	17,90	40,38	90,98	193,56
181	GAHNO4	1,89	3,40	8,00	21,74	43,03
182	GAHNO4	1,89	3,80	8,24	22,69	44,99
183	GAHNO4	1,94	4,74	8,54	22,95	48,54
184	GAHNO4	2,00	4,86	9,71	29,33	49,07
185	GAHNO4	2,36	5,27	9,85	33,26	50,58
186	GAHNO4	2,41	5,70	9,95	34,05	54,46
187	GAHNO4	2,41	5,83	11,01	35,86	55,01
188	GAHNO4	2,54	6,20	12,74	37,20	57,74
189	GAHNO4	2,75	6,60	13,32	38,81	60,88
190	GAHNO4	2,98	6,60	13,49	40,27	63,67
191	GAHNO4	2,98	7,32	14,77	40,61	63,92
192	GAHNO4	3,02	8,06	14,77	42,03	64,16
193	GAHNO4	3,34	9,16	15,12	43,21	67,39
194	GAHNO4	3,77	10,39	15,85	43,77	69,73
195	GAHNO4	3,80	10,55	16,04	44,38	75,11
196	GAHNO4	3,80	10,76	16,35	46,74	76,50
197	GAHNO4	4,22	11,79	16,75	47,21	76,99
198	GAHNO4	4,27	12,87	17,01	48,72	84,73
199	GAHNO4	5,10	13,52	17,53	53,00	84,76
200	GAHNO4	5,68	14,65	29,34	61,11	90,92
MÉDIA	GAHNO4	3,16	8,10	13,92	39,35	64,11
DP	GAHNO4	1,08	3,39	4,82	10,19	14,03
MÍN	GAHNO4	1,89	3,40	8,00	21,74	43,03
MÁX	GAHNO4	5,68	14,65	29,34	61,11	90,92

Tabela 10 – Resultado da análise semiquantitativa da imunomarcacão para nNOS dos dez grupos estudados. 0 = negativo; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte.

CE	G	CI	S	GA	GAH	GNO2	GNO3	GNO4	GAHNO4
1	4	2	1	4	2	4	3	2	1
1	3	1	1	2	3	4	3	1	1
1	4	2	1	3	1	4	3	2	2
1	3	2	2	3	2	4	3	2	1
2	4	2	2	4	4	2	4	2	1
2	4	1	1	3	1	4	3	1	2
1	4	2	1	2	3	3	2	1	2
1	3	1	2	4	1	3	4	3	1
2	4	2	1	3	1	4	3	2	1
2	3	2	1	3	1	3	3	3	1
1	3	2	2	3	2	3	4	2	1
1	4	2	1	2	4	3	3	1	1
2	2	1	1	4	1	3	2	2	1
1	4	2	1	3	1	4	3	1	2
1	3	3	1	3	2	3	4	3	1
1	3	2	2	4	2	2	4	1	0
1	3	3	2	3	1	3	2	1	1
2	4	3	1	3	1	4	3	2	2

Tabela 11 – Resultado da análise semiquantitativa da imunomarcção para iNOS dos dez grupos estudados. 0 = negativo; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte.

CE	G	CI	S	GA	GAH	GNO2	GNO3	GNO4	GAHNO4
1	4	1	1	3	2	1	3	0	0
1	4	0	2	4	3	1	2	1	2
1	3	1	1	2	1	1	3	2	1
1	4	0	0	3	3	1	2	1	0
0	3	1	2	3	2	3	1	2	1
1	4	0	1	3	2	2	3	1	1
0	4	0	1	2	2	3	2	2	2
1	3	1	2	3	3	1	3	2	1
1	4	0	1	3	2	1	1	1	1
0	3	1	1	3	2	1	3	1	1
0	4	0	2	3	3	2	1	1	1
1	3	1	1	2	1	1	3	2	1
0	4	1	1	3	3	2	1	1	1
0	3	0	2	4	1	3	1	2	1
1	4	1	2	3	3	2	3	1	0
0	4	0	1	2	2	3	2	1	2
1	3	1	2	3	1	1	2	2	1
1	4	0	1	3	1	1	1	1	1

Tabela 12 – Resultado da análise semiquantitativa da imunomarcacão para eNOS dos dez grupos estudados. 0 = negativo; 1 = fraco; 2 = moderado; 3 = forte; 4 = muito forte.

CE	G	CI	S	GA	GAH	GNO2	GNO3	GNO4	GAHNO4
1	4	2	2	3	1	3	3	1	1
1	4	1	3	4	3	2	3	2	1
1	4	2	1	2	2	3	3	1	1
2	4	1	2	3	1	4	4	2	1
1	3	1	1	2	2	3	2	1	1
2	4	1	2	3	1	2	4	2	1
1	4	2	1	3	2	3	3	1	2
1	4	2	2	3	2	3	4	2	1
1	4	2	1	3	1	3	2	1	2
2	4	2	1	3	2	3	3	1	1
1	3	1	3	4	3	2	4	2	1
1	4	2	1	3	2	3	3	1	1
1	4	2	2	3	1	4	4	2	1
1	3	1	1	2	2	3	2	1	1
2	3	1	3	4	3	2	4	2	1
1	4	2	2	3	2	3	3	1	2
1	4	2	1	2	1	3	3	2	2
2	4	1	1	2	2	3	3	2	2