ANTONIO ROBERTO FRANCHI TEIXEIRA

INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO INTESTINAL AO LÍQUIDO AMNIÓTICO SOBRE O CRESCIMENTO INTRA-UTERINO E O CRESCIMENTO INTESTINAL EM UM MODELO DE GASTROSQUISE EXPERIMENTAL

CAMPINAS

2004

ANTONIO ROBERTO FRANCHI TEIXEIRA

INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO INTESTINAL AO LÍQUIDO AMNIÓTICO SOBRE O CRESCIMENTO INTRA-UTERINO E O CRESCIMENTO INTESTINAL EM UM MODELO DE GASTROSQUISE EXPERIMENTAL

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia, área de concentração em Cirurgia.

ORIENTADOR: *PROF. DR. LOURENÇO SBRAGIA NETO*

CAMPINAS

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

T235i

Teixeira, Antonio Roberto Franchi
Influência da exposição ao líquido amniótico e restrição do crescimento intra-uterino em um modelo de gastrosquise experimental / Antonio Roberto Franchi Teixeira. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

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

1. Cirurgia experimental. 2. Cirurgia fetal. I. Lourenço Sbragia Neto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

SLP

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: ANTONIO ROBERTO FRANCHI TEIXEIRA

Orientador: PROF. DR. LOURENÇO SBRAGIA NETO

MEMBROS
1.PROF. DR. LOURENÇO SBRAGIA NETO
2.PROF. DR. RICARDO BARINI
3.PROF. DR. IVAN KOH
4.PROF. DR. LUÍS VIOLIN
5.PROF DR. LUÍS CÉSAR PERES

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DATA: 02/12/2004

DEDICO ESTE TRABALHO...

À minha esposa Ana Cristina pela cumplicidade, dedicação e leveza de ser.

Ao meu avô Antonio Joaquim Teixeira (in memoriam) por ter começado tudo.

Aos meus pais Antonio e Therezinha, pela paciência e compreensão.

Aos meus irmãos Marinice e Herbert, por sua fé em mim.

Ao Biê, Pinho, Mauro, Laura e Tiago, como um estímulo às suas inteligências.

À minha pequena Elisa, por me dar a certeza de que tudo isso vale a pena.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Lourenço Sbragia Neto, cirurgião fetal, brilhante em várias áreas do conhecimento humano. Orientador, colega, amigo e antes de tudo, irmão. Não há palavras de agradecimento suficientes.

À Maria Weber Guimarães Barreto, Anderson Gonçalves, Dr. Daniel Bittencourt e Dr. Willy França, do Laboratório de Medicina Fetal *Michael Harrison* FCM-UNICAMP*,* pela inestimável colaboração em todas as etapas do trabalho.

Ao Professor Doutor José Antonio Gontijo, por seu excelente laboratório.

Ao Professor Doutor Luís Violin, embriologista e professor, por sua ajuda e amizade.

À Dra. Suzana Moraes, por sua colaboração na área de fotografia e documentação.

À Prof. Dra. Mirian Trevisan, por sua dedicada análise histológica.

Aos Professores Doutores Mário José Abdalla Saad, Lício Augusto Velloso e José Barreto Carvalheira, do laboratório de Biologia Molecular, por sua ajuda científica.

Aos Professores Doutores Roberto Anania de Paula e Nelson Lourenço Maia, da Faculdade de Medicina de Jundiaí, pela facilitação deste trabalho.

À Bárbara e Roberta, minhas jovens amigas biólogas do Instituto de Biologia-UNICAMP.

À Sherian Kae Boywer, por sua amizade e proficiência em Inglês.

À Profa. Maria Luíza B. Coelho, pela amizade e dedicação na revisão gramatical do texto.

Aos Doutores Victor Pilla, João de Souza Coelho, Francisco Callejas e José Carlos Pareja, por sua amizade e ajuda.

"A essa família, conheço-os todos, há décadas.
São como os bois de carro, que quanto mais
apanham, mais arrancam para frente..."

Dr. José Pena Fernandes São José do Rio Pardo, 1969.

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO..... *xxix*

ABSTRACT..... *xxiii*

1- INTRODUÇÃO..... 37

1.1- Revisão de fisiologia fetal..... 39

1.1.1- O sistema amniótico..... 39

1.1.2- Regulação do crescimento fetal..... 41

1.2- Gastrosquise..... 47

1.2.1- Histórico..... 47

1.2.2- Embriologia..... 48

1.2.3- Incidência..... 49

1.2.4- Mortalidade, morbidade e custo..... 49

1.2.5- Tratamento..... 51

1.3- Gastrosquise e restrição do crescimento intra-uterino (RCIU)..... 51

1.4- Inflamação intestinal e gastrosquise..... 52

1.5- Modelos experimentais de gastrosquise..... 53

2- OBJETIVO..... 55

3- MATERIAL E MÉTODOS..... 59

3.1- Material..... 61

3.1.1- Avaliação do comitê de ética e experimentação animal..... 61

3.1.2- Animal..... 61

3.2- Método..... 61

3.2.1- Constituição dos grupos..... 61

3.2.2- Desenho do experimento..... 63

3.2.3- Procedimento cirúrgico..... 63

3.2.4- Coleta de dados..... 67

3.2.5- Criação dos parâmetros morfométricos..... 68

3.2.6- Curvas de crescimento fetal normal..... 69

3.3- Análise estatística..... 69

4.RESULTADOS..... 71

4.1- Morfometria..... 73

4.1.1- Peso corporal..... 73

4.1.2- Peso intestinal..... 75

4.1.3- Comprimento intestinal..... 76

4.1.4- Relação Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC)..... 78

4.1.5- Relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/CI)..... 80

4.1.6- Diferença Peso Corporal - Peso Intestinal..... 81

4.1.7- Síntese dos resultados..... 83

4.2- Curvas de crescimento fetal e intestinal normal..... 85

4.2.1- Peso Corporal..... 85

4.2.2- Peso Intestinal..... 86

4.2.3- Comprimento Intestinal..... 86

5- DISCUSSÃO..... 91

5.1- Comparação entre as tríades..... 94

5.2- Comparação com Indivíduos Normais..... 98

5.3- Tratamentos propostos..... 102

6- CONCLUSÃO..... 105

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 109

8- BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES..... 123

9- ANEXOS..... 127

CI	comprimento intestinal
GH	hormônio de crescimento
Grab-1	*growth factor receptor binding protein-1*
hGH-N	GH hipofisário materno
IGF	*insulin-like growth factor*
IGFBP	proteínas ligantes ao hormônio de crescimento
IKK-B	inibidor do sistema *kappa*-B
IR	receptor de insulina
IRS-1	primeiro substrato do receptor de insulina
IRS-2	segundo substrato do receptor de insulina
JAK	Sistema enzimático *Janus*-kinase (tirosina quinase associada a receptores da família gp 130)
JKK	quinase ativadora do complexo C-JUN
LA	líquido amniótico
MAP-K	*mitogen-activated protein kinase*
NFK-B	Fator nuclear *kappa*-B
NPP	nutrição parenteral prolongada
PC	peso corporal
PC-PI	diferença entre peso corporal e peso intestinal
PI	peso intestinal
PI/CI	relação peso intestinal/comprimento intestinal
PI/PC	relação peso intestinal/peso corporal

PI3-K	fosfatidil inositol 3- quinase
RCIU	restrição do crescimento intra-uterino
Shc	*Src homology 2/ α-collagen related*
Src	complexo relacionado ao sarcoma de Roux
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa

Pág.

Tabela 1- Resultados das medidas morfométricas de fetos de ratas submetidos à gastrosquise aos 18,5 e 19,5 dias de gestação..... 84

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Figura 1-	Desenho do experimento.....	63
Figura 2-	Modelo experimental de gastrosquise com a seqüência da posição dos fetos no útero bicorno (A), abertura uterina da cavidade uterina (B) e feto parcialmente fora do útero, com gastrosquise.....	66
Figura 3-	A-coleta fetal, B-pesagem intestinal, C-mensuração do intestino e D- preparo histológico de material.....	68
Figura 4-	Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5 com desvio e erro padrão.....	74
Figura 5-	Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5 com desvio e erro padrão.....	74
Figura 6-	Comparação entre as medidas do peso intestinal dos fetos gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5.....	75
Figura 7-	Comparação entre as medidas do peso intestinal dos fetos gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5.....	76
Figura 8-	Comparação entre as medidas do comprimento intestinal dos fetos gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5.....	77
Figura 9-	Comparação entre as medidas do comprimento intestinal dos fetos gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5.....	78
Figura 10 -	Comparação entre as medidas da relação peso intestinal/peso corporal (PI/PC) dos fetos com gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5.....	79

Figura 11- Comparação entre as medidas da relação peso intestinal/peso corporal (PI/PC) dos fetos com gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5..... 79

Figura 12- Comparação entre as medidas da relação peso intestinal/comprimento intestinal (PI/CI) dos fetos com gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5..... 80

Figura 13- Comparação entre as medidas da relação peso intestinal/comprimento intestinal (PI/CI) dos fetos com gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5..... 81

Figura 14- Comparação entre as medidas da diferença entre o peso corporal e o peso intestinal (PC-PI) dos fetos gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5..... 82

Figura 15- Comparação entre as medidas da diferença entre o peso corporal e o peso intestinal (PC-PI) dos fetos gastrosquise, controle e sham, dias 18,5 e 19,5..... 83

Figura 16- Curva das médias do peso corporal de fetos de ratas "normais" nos dias 18,5; 19,5; 20, 5 e 21,5 de gestação..... 85

Figura 17- Curva das médias do peso intestinal de fetos de ratas "normais" nos dias 18,5; 19,5; 20, 5 e 21,5 de gestação..... 86

Figura 18- Curva das médias do comprimento intestinal de fetos de ratas "normais" nos dias 18,5; 19,5; 20, 5 e 21,5 de gestação..... 87

Figura 19- Curvas das médias do peso corporal de fetos "normais" e de fetos submetidos à gastrosquise..... 88

Figura 20- Curvas das médias do peso intestinal de fetos "normais" e de fetos submetidos à gastrosquise..... 88

Figura 21- Curvas das médias do comprimento intestinal de fetos "normais" e de fetos submetidos à gastrosquise..... 89

RESUMO

Gastrosquise é um defeito do fechamento da parede abdominal na região para-umbilical geralmente à direita, por onde as alças intestinais são exteriorizadas para a cavidade amniótica. O contato do intestino com o líquido amniótico (LA) leva à inflamação e espessamento das alças, imaturidade dos plexos mioentéricos e ao retardo do trânsito intestinal. A maior repercussão neonatal da imaturidade intestinal na gastrosquise é o longo tempo de hospitalização que pode levar a complicações graves como translocação bacteriana e sepse. Além disso, a maior parte desses neonatos apresenta restrição do crescimento intra-uterino (RCIU) cuja causa não está bem esclarecida. O objetivo deste estudo é avaliar a influência do tempo de exposição do intestino ao LA sobre o crescimento intestinal e sua repercussão no peso corporal em um modelo de gastrosquise em ratos. Dois grupos de fetos de rato *Spreague-Dowley* (termo =21,5 dias) foram criados: Grupo I - fetos operados aos 18,5 dias de gestação e Grupo II - fetos operados aos 19,5 dias de gestação, ambos constituídos por 20 tríades de gastrosquise (G), controle (C) e *sham* (S). Os animais foram comparados quanto ao peso corporal (PC), peso intestinal (PI) e comprimento intestinal (CI) e suas relações (PI/PC; PI/CI; PC-PI). Para comparação com fetos de gastrosquise, foram estabelecidas curvas de PC, PI e CI a partir de fetos normais sacrificados em diferentes idades gestacionais (18,5; 19,5; 20,5 e 21,5 dias). Os resultados demonstraram que os fetos com gastrosquise apresentaram PC menor ($p<0,005$), PI maior ($p<0,005$), CI menor ($p<0,005$) e PC-PI menor ($p<0,005$) de que seus controles. Os fetos do Grupo I apresentaram maior encurtamento em relação ao Grupo II (42% x 33%) ($p<0,05$). Conclui-se que a maior exposição das alças ao LA causa um maior encurtamento intestinal, e o RCIU é uma conseqüência direta da gastrosquise. Os resultados deste experimento sugerem que a antecipação do trabalho de parto em fetos portadores de gastrosquise e RCIU pode ser benéfica ao evitar um maior encurtamento intestinal.

ABSTRACT

Gastroschisis is a defect in the abdominal wall closure affecting the paraumbilical region, mainly in the right side, where small bowel protudes towards amniotic cavity. Bowel contact with amniotic fluid (AF) leads to bowel inflammation and swelling. Imaturity of myoenteric plexus and retardation of intestinal transit. Major neonatal gastroschisis repercussion is delayed hospital ingress time which may lead to severe complication as bacterial translocation and sepsis. Nevertheless the majority of these newborns present intrauterine growth restriction (IUGR) of not yet established cause. The aim of this study is to evaluate the influence of time of bowel exposure to AF on intestinal growth and its repercussion in body weight in a model of gastroschisis in the rat. Two groups of Spreague-Dowley rat fetuses (term=21.5 days) were created. Group I- operated at gestational day 18.5 and Group II- operated at gestational day 19.5, both consisting of 20 triads of gastroschisis (G), control (C) and sham (S). Animals were compared concerning body weight (BW), intestinal weight (IW), and intestinal length (IL) and their relations (IW/BW; IW/IL; BW-IW). For comparison with gastroschisis fetuses, curves of BW, IW and IL from normal fetuses killed in distinct gestational ages were obtained (18.5, 19.5, 20.5 and 21.5 days). Results show that gastroschisis fetuses demonstrated smaller BW ($p<0.005$), smaller IL ($p<0.005$) and smaller BW-IW ($p<0.05$) than their controls. We conclude that bowel exposition to AF leads to a more severe intestinal shortening and IUGR is a direct consequence of gastroschisis. These results suggests that delivery anticipation in fetuses with gastroschisis and IUGF may bring benefits as it avoids stronger bowel shortening.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Revisão de fisiologia fetal

1.1.1- O sistema amniótico

O líquido amniótico (LA) encontra-se num espaço envolvido por membrana fetal avascular: internamente o âmnio e externamente o cório liso. Dentro da câmara amniótica encontra-se o feto que, com suas funções vitais, contribui na formação e absorção do LA. O LA protege, aquece e ajuda na nutrição do feto, além de poder contribuir com informações sobre a maturidade e vitalidade fetais, exercendo funções mecânicas e metabólicas (MATHIAS, 2000). No início da gestação, o filme líquido formado pelo LA evita a formação de aderências entre o feto e o âmnio, impedindo malformações. Fornece água e eletrólitos para o feto durante toda a gestação. Possui quantidades variáveis de aminoácidos e hormônios que podem desempenhar função importante no desenvolvimento fetal. Durante a fase final da gestação e no trabalho de parto, o LA é importante na formação da bolsa das águas e no correto mecanismo de dilatação e mecânica do parto (MATHIAS, 2000).

Quanto a sua composição, o LA é isotônico e contém proteínas de peso molecular de até 170.000 KDa (SEEDS, 1980). Com o avançar da gestação, o feto passa a contribuir cada vez mais no conteúdo do LA, através da liberação de seus fluidos orgânicos (urina, principalmente). O feto a termo pode deglutir até 500 ml de LA ao dia. Fetos portadores de atresia de esôfago estão associados ao polidrâmnio, e portadores de agenesia renal bilateral, ao oligoâmnio (MATHIAS, 2000).

As origens do LA são diversas. O cório liso contribui para a formação do LA por permitir passagem de água através de mecanismos de transporte passivo segundo gradiente osmótico ou químico. A pele fetal produz células de descamação, e as junções intersticiais imaturas do epitélio fetal permitem trocas importantes de líquidos entre o feto e o LA. No final do primeiro trimestre, os rins já iniciam mecanismos de filtração glomerular, embora a capacidade total de reabsorção de sódio e água não seja atingida na fase fetal (MATHIAS, 2000).

A osmolaridade do LA vai diminuindo (de 260 mOsm/kg para 80 mOsm/kg) conforme progride a gestação, por causa do aumento de volume de urina hipotônica produzida pelo feto (MATHIAS, 2000).

A reabsorção do LA se dá por vias distintas: a deglutição é uma das mais importantes delas. A deglutição fetal pode ser estudada por meio do rastreamento de moléculas marcadas com isótopos radioativos injetadas no LA. O feto a termo deglute uma média de 450 ml de LA/dia. Essa deglutição parece ser um importante mecanismo de equilíbrio do volume do sistema amniótico no terceiro trimestre da gestação. A deglutição do LA está relacionada à maturação e ao desenvolvimento do trato gastrointestinal, notadamente do intestino delgado (SEEDS, 1980). O LA também é fonte de energia e proteína para o feto (ABRAMOVICH *et al.,* 1979), estimulando a maturação da capacidade absortiva do enterócito.

A composição química do LA é de 98-99% de água e de 1-2% de solutos, que podem ser orgânicos e inorgânicos. Essa composição é dinâmica, e quaisquer doenças maternas, fetais ou placentárias podem modificar essa composição. A contribuição materna na composição do LA é maior no início da gestação, e a do feto vai aumentando progressivamente. As concentrações amnióticas de sódio, cloro e potássio também variam durante a gestação (MATHIAS, 2000).

Na gastrosquise, o LA em contato com as alças expostas leva a um espessamento e encurtamento dos intestinos (ALBERT *et al.,* 1992). Modelos experimentais de gastrosquise em coelhos demonstraram que, quando o intestino é exposto ao LA, ocorre grande encurtamento da víscera (ALBERT *et al.,* 1992).

O LA, ao entrar em contato com o intestino, além de causar alterações macroscópicas como espessamento, edema e encurtamento da víscera, também altera as funções intestinais no período pós-natal (MORRISON *et al.,* 1998). Dosagens de interleucinas, fator de necrose tumoral, integrinas e antígenos mielóides analisados no LA de mães portadoras de fetos com gastrosquise, quando comparados com grupos-controle, revelaram uma diferença significativa no conteúdo dos pró-inflamatórios CD 15 e IL-8. Essa inflamação crônica e prolongada do intestino na vida intra-uterina está possivelmente

relacionada à disfunção intestinal após o nascimento. Essa disfunção facilita a translocação bacteriana e acaba por interferir na morbidade do paciente durante o período hospitalar (MORRISON *et al.,* 1998).

1.1.2- Regulação do crescimento fetal

O crescimento fetal adequado depende de vários fatores: maternos, placentários e fetais. O mais importante fator que influencia o crescimento fetal é seu genoma. A mãe também produz alguma restrição ao crescimento fetal descoordenado, por fatores mecânicos e fisiológicos de restrição ainda não muito bem compreendidos (GLUCKMAN & LIGGINS, 1984). Por outro lado, o crescimento fetal é grandemente estimulado por substâncias energéticas e somatotróficas (hormônios e fatores de crescimento). O crescimento fetal depende, então, do balanço entre esses dois fatores (intrínseco e extrínseco). Na primeira metade da gestação, o fator genético prepondera sobre os outros. Na segunda metade, os fatores maternos e placentários passam a ser mais importantes.

Fatores maternos

O genótipo materno influencia o crescimento fetal sobremaneira. O útero materno pode exercer alguma restrição ao crescimento, como nos casos de gêmeos e trigêmeos, que geralmente nascem menores que seus irmãos não-gemelares. Os mecanismos de restrição materna ao crescimento fetal não atuam de maneira óbvia, mas certamente protegem a mãe no sentido de um trabalho de parto mais tranqüilo (GLUCKMAN & LIGGINS, 1984).

A nutrição materna é um fator muito bem relacionado ao RCIU. No entanto trabalhos epidemiológicos demonstram que há um grande número de crianças que nascem relativamente bem desenvolvidas mesmo em precárias condições nutricionais maternas. Mas é possível que essas crianças desenvolvam algumas deficiências cognitivas e neurológicas na infância (GLUCKMAN & LIGGINS, 1984).

Fatores como tabagismo, alcoolismo e outras influências ambientais (altitude, temperatura e estado sócio-econômico) sobre a mãe podem ser determinantes de RCIU. Doenças maternas com hipertensão arterial, anemias, infecções, drogadição e anormalidades uterinas podem ser responsáveis por alguns casos de RCIU (GLUCKMAN & LIGGINS, 1984).

Fatores placentários

A velocidade do crescimento da placenta não acompanha o ritmo de crescimento fetal. No início, a placenta cresce mais rapidamente que o feto, atingindo seu tamanho máximo ao redor das 33 semanas. A massa placentária total, no final da gestação, está relacionada com o peso fetal ao nascer. Estudos experimentais com ovelhas, das quais são retiradas partes da placenta em diversas idades gestacionais, levam a crer que o RCIU nesses fetos está relacionado com uma menor oferta fetal de oxigênio e carboidratos (ROBINSON, 1979).

Anormalidades da anatomia placentária (lobo acessório, placenta reniforme) parecem não ter efeito no crescimento fetal. No entanto anomalias na inserção do cordão umbilical, corioangiomas placentários, artéria umbilical única e placenta circunvalada podem levar à RCIU (KING & LOVRIEN, 1978; SHANKLIN, 1978).

Fatores fetais

Hormônios

Os hormônios peptídeos, incluindo insulina e somatomedina, não conseguem ultrapassar a barreira placentária. Esse mecanismo é importante por permitir um desenvolvimento endocrinológico autônomo do feto. No entanto alguns distúrbios endócrinos maternos graves podem influenciar o feto, como por exemplo, a tireotoxicose. Nesses casos, existe a passagem de imunoglobulinas estimulantes pela barreira placentária, e não propriamente do hormônio tiroidiano. O desenvolvimento fetal tem peculiaridades,

uma vez que os principais hormônios que regulam o crescimento na primeira infância (hormônio do crescimento e tiroxina) têm pouca influência direta no crescimento fetal (GLUCKMAN & LIGGINS, 1984).

Hormônio de crescimento (GH)

Ainda que esse hormônio seja um dos principais reguladores de crescimento na vida pós-natal, não há evidências de que ele atue de forma decisiva na atividade de crescimento fetal, funcionando mais como regulador metabólico na divisão de energia entre mãe, placenta e feto. As concentrações plasmáticas de GH na vida fetal são elevadas no início da gestação e tendem a cair no final (NOGUEIRA *et al.,* 2004). A observação clínica dos raros casos de deficiências congênitas de GH, seja por causa genética ou por agenesia da hipófise, geralmente não se associam à RCIU. Isso pode estar relacionado a uma imaturidade dos receptores de GH durante a vida fetal. A síntese de GH é regulada pelos *Insulin- like growth factors* (IGF's). Durante a gestação, existe produção de GH hipofisário materno (hGH-N), que obedece a um ritmo circadiano, pulsátil e controlado pelo fator liberador de GH hipotalâmico (GHRH) (NOGUEIRA *et al.,*2004). Existe também produção de GH pelo sinciciotrofoblasto da placenta, que não sofre controle do GHRH materno (CAUFRIEZ *et al.,*1994).

Por volta de quinta semana de gestação, o feto inicia a produção de GH hipofisário. O GH fetal pode induzir à resistência insulínica, que protege o feto contra a hipoglicemia em estados de carência energética (OGILVY-STUART *et al.,* 1998).

Hormônios tiroidianos

Os hormônios tiroidianos possuem distinta capacidade de atravessar a barreira placentária nas diversas espécies de mamíferos (GLUCKMAN & LIGGINS, 1984). Nos humanos, os hormônios tiroidianos têm pequena influência no crescimento somático e

visceral, mas possuem papel fundamental no crescimento e desenvolvimento do encéfalo (GLUCKMAN & LIGGINS, 1984).

IGF´s *(Insulin-like growth factors)*

Antigamente chamado de somatomedinas, os IGF´s são uma família de peptídeos (7500 daltons) que medeiam a ação do hormônio de crescimento no período pré e pós-natal. *Insulin-like growth factor I* (IGF-I) e *insuline-like growth factor II* (IGF-II) são os membros mais importantes da família. Eles possuem receptores próprios que, por sua vez, apresentam grande analogia molecular com o receptor de insulina (IR). Os IGF´s ligam-se a uma superfamília de proteínas séricas chamadas de *IGF- binding proteins* **(IGFBP´s)**. Existem seis IGFBP´s de alta afinidade e pelo menos quatro de baixa afinidade nessa superfamília de proteínas séricas (OGILVY-STUART *et al.,* 1998). As IGFBP´s funcionam como reservatório estratégico dos IGF´s e modulam sua atividade (NOGUEIRA *et al.,* 2004).

O IGF-II é um fator muito importante no primeiro trimestre da gestação, que é o período da organogênese. O IGF-I é mais importante no segundo e terceiro trimestres, na fase de crescimento somático e visceral. O IGF-I é o mais importante agente estimulador de crescimento ósseo conhecido (SPAGNOLI *et al.,* 1996).

Os IGF´s de origem materna não cruzam a barreira placentária e são produzidos principalmente no fígado. O IGF-I materno exerce função trófica sobre o feto porque regula a transferência placentária de nutrientes, e esses nutrientes aumentam a produção e biodisponibilidade do IGF-I fetal (NOGUEIRA *et al.,* 2004).

Insulina

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas e é essencial na regulação da glicemia, do crescimento e da diferenciação celular. A homeostase energética é regulada através da ação da insulina sobre vias

metabólicas importantes, como a glicogenólise, a gliconeogênese, a lipólise e a proteólise (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

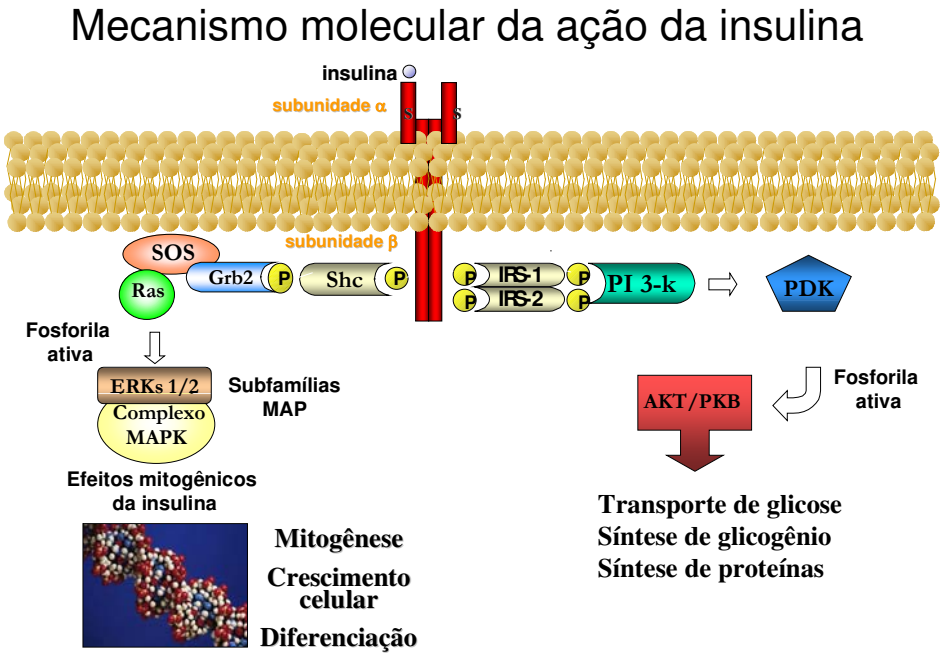
A insulina é o principal hormônio regulador de crescimento fetal. Ela não cruza a barreira placentária e já está presente na circulação fetal na décima semana de desenvolvimento. Casos de hipoinsulinemia fetal estão relacionados à agenesia pancreática e, invariavelmente, resultam em importante redução de peso e estatura ao nascer (LEMONS *et al.*, 1979). Leprechaunismo é uma síndrome relacionada à RCIU, caracterizada por deficiência no crescimento pós-parto e fácies típica que lembra a figura lendária do duende *Leprechaun.* Essas crianças são resistentes à insulina exógena pela existência de defeitos nas vias de sinalização do substrato do receptor de insulina (IRS) (GLUCKMAN & LIGGINS, 1984).

Muitas crianças filhas de mães diabéticas são grandes para a idade gestacional (GIG) devido à hiperinsulinemia fetal secundária a hiperglicemia materna (PEDERSON, 1954). Existe uma interação entre receptores de insulina e IGF´s na vida fetal que, provavelmente, é perdida após o nascimento. A ação promotora de crescimento da insulina na vida fetal é mediada pelo receptor de IGF´s (NOGUEIRA *et al.,* 2004). A insulina também se liga a receptores hepáticos do feto, promovendo intensa atividade metabólico-energética.

Receptor de insulina

A figura a seguir demonstra um esquema simplificado do mecanismo de ação da insulina sobre seu receptor. O receptor de insulina (em inglês, *Insulin Receptor-IR),* após sua ligação com a insulina, sofre uma mudança conformacional que promove sua autofosforilação, com conseqüente aumento da atividade tirosina-quinase. Atualmente, já foram descritos dez substratos do IR. Alguns pertencem à família dos substratos do receptor de insulina (IRS), e outros são proteínas homólogas do sistema Shc, Grab-1 e sistema Janus-quinase (JAK2) (SAAD *et al.,* 1992, VELLOSO *et al.,* 1998).

O esquema a seguir ilustra a ativação do IR pela insulina e os mecanismos intracelulares envolvidos:



Mecanismo molecular de ação da insulina (esquema original cedido por VELLOSO, L.A.; UNICAMP, 2004)

A fosforilação em tirosina das proteínas da família IRS leva a uma modificação dessas moléculas, gerando sítios para reconhecimento das moléculas que contenham domínios análogos ao sistema Src2, como a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3- Kinase). A PI3K é uma molécula essencial na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose pela membrana citoplasmática (SAAD *et al.*, 1992; SHEPHERD *et al.,* 1996).

O IR fetal é diferente do IR da vida adulta. A falta do exon 11 determina que o IR fetal tenha uma afinidade molecular muito maior em relação ao IGF–II que ao IGF-I. Esta afinidade parece estar ligada à presença do domínio C do IR fetal

(DENLEY *et al.,* 2004). Essas pequenas diferenças nas isoformas do IR podem determinar diferenças na função metabólica da insulina na vida intra-uterina.

O receptor de insulina (IR) também pode, em ocasiões especiais, fosforilar-se em serina. Isso atenua a transmissão do sinal, causa *feedback* negativo e pode resultar numa resistência insulínica (CARVALHEIRA *et al.,* 2002; GAO *et al.,* 2002; WERNER *et al.,* 2004). Isto pode acontecer em estados inflamatórios agudos e crônicos, em que ocorre uma liberação importante de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), e o interferon-gama (IFN- γ) (BARREIRO *et al.,* 2004; MA *et al.,* 2004). Essa fosforilação em serina determina uma menor eficácia nas vias finais metabólicas e alterações nos mecanismos de crescimento, replicação e desenvolvimento de organelas celulares. Conseqüentemente, os sistemas de *timming* do crescimento celular fetal se alteram, e o resultado final é a RCIU.

1.2- Gastrosquise

1.2.1- Histórico

O mais antigo relato de defeitos da parede abdominal anterior em fetos humanos é creditado ao cirurgião francês Ambroise Paré (1510-1590) (PUTNAN & EMMENS, 1990). Lycosthenes, em 1557, descreveu possivelmente um caso de gastrosquise. No entanto a descrição de Calder, de 1733, não deixa dúvidas, pois esse autor relata a ocorrência de herniação do intestino delgado em feto natimorto com anatomia umbilical normal (GRAY & SKANDALAKIS, 1972). O termo gastrosquise foi designado, em 1953, como sendo o defeito de fechamento da espessura total da parede abdominal (MOORE & STROKES, 1953). Durante muitos anos, os pacientes portadores dessa afecção apresentaram baixas taxas de sobrevivência, devido à inexistência de recursos de terapia intensiva neonatal e à precariedade das técnicas cirúrgicas empregadas no fechamento do defeito. Em 1967, SCHUSTER descreveu uma técnica de fechamento escalonado da parede abdominal que resultou numa elevação das taxas de sobrevivência dos pacientes com diagnóstico de onfalocele e gastrosquise.

1.2.2- Embriologia

Durante a terceira semana do desenvolvimento embrionário, o disco germinal possui três camadas: o ectoderma dorsal, o mesoderma e o endoderma ventral. A parede anterior do embrião, nos primórdios do desenvolvimento, é representada pelo somatopleura. O fechamento das cavidades corporais do embrião ocorre através do crescimento dos folhetos laterais, cranial e caudal, quando ele possui aproximadamente dois milímetros de comprimento. Os ápices desses folhetos encontram-se no meio da parede abdominal anterior e se fundem, formando o umbigo (GRAY & SKANDALAKIS, 1972).

A somatopleura compreende duas camadas: uma ectodérmica e outra mesodérmica. Durante a sexta semana de desenvolvimento, a somatopleura é invadida por miótomos provenientes das regiões paravertebrais, cranial e caudal do embrião. Os folhetos se dividem em dois planos que originam os músculos da parede abdominal no adulto (mm. oblíquo externo, oblíquo interno, transverso abdominal e serrato) (GRAY & SKANDALAKIS, 1972). DUHAMEL, em 1963, descreveu eventos críticos no fechamento da parede abdominal do embrião. O defeito relacionado ao fechamento do folheto cranial causa as agenesias e deformidades da parede torácica e do esterno. Se o defeito acomete a região caudal, o feto poderá apresentar extrofias de bexiga e cloaca. Se o defeito acomete as regiões laterais, o feto poderá apresentar hérnia umbilical, onfalocele ou gastrosquise (GRAY & SKANDALAKIS, 1972).

A hérnia umbilical ocorre quando o fechamento das fáscias é incompleto, mas a cobertura de pele é normal. Onfalocele se dá quando o defeito é da fáscia e também cutâneo, resultando na herniação do conteúdo abdominal para dentro do saco umbilical (geléia de Warton) (MOORE & STROKES, 1953).

A etiologia da gastrosquise já foi correlacionada à ruptura intra-uterina de uma onfalocele (GLICK *et al.,* 1985).

Gastrosquise, nome originário do grego, que significa *abdome fendido*, é definida como a herniação das alças intestinais na região lateral direita do umbigo

(deVRIES, 1980; PUTNAN & EMMENS, 1990). Em conseqüência dessa falha, as alças intestinais entram em contato com o líquido amniótico durante a vida intra-uterina, e o neonato nasce com as vísceras abdominais expostas ao meio externo (SRINATHAN *et al.,* 1995). Muito raramente a gastrosquise pode ter origem no lado esquerdo da parede abdominal (TOTH & KIMURA, 1993). Mais recentemente, um nova hipótese foi sugerida para explicar a gênese do defeito da parede abdominal presente na gastrosquise. Analisando-se a angiogênese fetal, verificou-se que as artérias ônfalo-mesentéricas originam-se de plexos oriundos da aorta dorsal (HOYME *et al.,* 1981). A artéria ônfalo-mesentérica esquerda desaparece mais precocemente, porém o ramo direito persiste no embrião. A porção proximal desse vaso dá origem à artéria mesentérica superior. A porção distal da artéria ônfalo-mesentérica direita hernia fisiologicamente acompanhando o intestino através do umbigo na oitava semana. A ruptura do vaso nessa migração pode estar associada à gênese da gastrosquise (HOYME *et al.*, 1981).

1.2.3- Incidência

A incidência da gastrosquise é de aproximadamente um neonato acometido para cada 5.000 a 10.000 nascidos vivos (MORRISON *et al.,*1998). Não há evidências de que exista herança mendeliana em sua transmissão (STEIN *et al.,* 2004) Nos últimos dez anos, apareceram evidências de que, devido ao uso cada vez maior de tabaco (HAUSTEIN, 1999) e drogas ilícitas (HUME *et al*., 1997), a incidência de gastrosquise parece estar aumentando em alguns países (SUITA *et al.,* 2000). Estudos experimentais relacionam o aumento da incidência de gastrosquise com exposição a altos níveis de monóxido de carbono durante a gestação (SINGH, 2003).

1.2.4- Mortalidade, morbidade e custo

Recém-nascidos portadores de gastrosquise geralmente possuem baixo peso ao nascer (média de 2700 g) e são prematuros (média de 37 semanas) (BLAKELOCK(b) *et al.,*1997; CURRY *et al.,* 2000).

A mortalidade dos neonatos portadores de gastrosquise é relativamente baixa, por volta de 10% (GARCIA *et al,* 2002) e está associada à atresia intestinal, ao volvo e à enterocolite necrosante (RINEHART *et al.,*1999; SNYDER, 1999).

Apesar da relativa baixa mortalidade, os portadores de gastrosquise possuem alta morbidade (aproximadamente 45%) relacionada principalmente à diminuição da motilidade intestinal (BLAKELOCK(a) *et al.,*1997), que predispõe ao aparecimento de translocação bacteriana e sepse. A necessidade de repetidas cirurgias e o tempo prolongado de internação hospitalar agravam o quadro, colaborando para um aumento das taxas globais de morbidade. Alguns estudos populacionais relacionam a raça negra como um fator isolado de piora do prognóstico para indivíduos que nascem com gastrosquise (SALIHU (b) *et al.,* 2004).

Mais recentemente, a chance de sobrevivência dos neonatos portadores de gastrosquise vem aumentando devido a três fatores: a) criação de unidades de terapia intensiva neonatal; b) desenvolvimento de avanços em nutrição parenteral e c) utilização de novas drogas anestésicas que possibilitam uma melhor estabilidade hemodinâmica e respiratória durante a cirurgia para a correção do defeito (DRIVER *et al.,*2000).

O custo de um doente com gastrosquise depende do tempo de permanência hospitalar. Em recente trabalho publicado nos Estados Unidos, para um tempo médio de 47 dias de hospitalização, o custo da internação foi de aproximadamente US$ 123.000,00 (SYDORAK *et al.,* 2002). No Brasil, ainda não há estudos semelhantes de análises de custos.

Vários são os fatores pré-natais que poderiam influenciar na evolução clínica dos neonatos com gastrosquise. Entre eles, destacam-se: idade materna (MOORE *et al.,* 1999), via de parto (MORETTI *et al.,*1990; DUNN *et al.,* 1999), idade gestacional do aparecimento do defeito no feto (SIMMONS & GEORGESON, 1996), presença de estresse fetal (CRAWFORD *et al.,* 1992) e o tipo de correção cirúrgica pós-natal (STRINGER *et al,* 1991).

Na avaliação ultra-sonográfica pré-natal em fetos portadores de gastrosquise, o aumento da espessura das alças intestinais (ADRA *et al.,* 1996; DEANS *et al.,* 1999), a diminuição do fluxo sangüíneo intestinal das alças expostas (detectadas pelo ultra-som dopler) e a presença de atresias associadas são achados relacionados a uma pior evolução neonatal (ABUHAMAD *et al.,* 1997; FLEET & DE LA HUNT, 2000). Há indícios de que o intestino herniado na gastrosquise apresenta atraso na maturação do plexo mioentérico, que resulta em disfunção funcional neonatal (VANNUCCHI *et al.,* 2003).

1.2.5- Tratamento

O tratamento preconizado para os neonatos com gastrosquise é o fechamento primário do defeito abdominal (CANTY & COLLINS, 1983). No entanto, em alguns pacientes, existe uma desproporção muito acentuada entre o volume das alças intestinais e a cavidade abdominal. Nessa condição, o fechamento primário pode acarretar grandes transtornos respiratórios e hemodinâmicos. Muitas vezes, o fechamento realizado em dois tempos ou a colocação de prótese para a correção do defeito passa a ser o tratamento de escolha: cirurgia do *silo* (SAUTER *et al.,* 1991).

1.3- Gastrosquise e restrição do crescimento intra-uterino (RCIU)

O LA é importante para o desenvolvimento intestinal e somático fetal (MULVIHILL *et al.*, 1985). O crescimento somático fetal está também relacionado ao comprimento e integridade adequados do intestino (FITZSIMMONS *et al.,* 1988; LOPEZ de TORRE *et al.,* 1992). Fetos com anomalias do trato digestivo como as atresias e a gastrosquise, que apresentam diminuição do comprimento do intestino, cursam com restrição de crescimento intra-útero (RCIU) (SHANKLIN & COOKE, 1993; BLAKELOCK(b) *et al.,* 1997). Há estudos de série de pacientes na literatura que indicam que fetos portadores de gastrosquise geralmente são pequenos para a idade gestacional (BLAKELOCK (b) *et al.,* 1997), e isto é um fator de risco independente para a má evolução no período pós-natal (VILELA *et al.,*2001)

RCIU é uma manifestação freqüente dos fetos portadores de gastrosquise (FRIES *et al.*, 1993), cujo mecanismo não está completamente esclarecido. Ainda não está definido se a RCIU nesses indivíduos é resultante primariamente da gastrosquise *per se* ou então se estaria ligada a fatores outros que não o próprio defeito, ainda não identificados na fisiologia fetal (BLAKELOCK (b) *et al.,* 1997). Há dados na literatura em que se compara a resposta inflamatória pós-operatória de neonatos portadores de gastrosquise com outras cirurgias abdominais de grande porte. Os portadores de gastrosquise apresentam um padrão distinto de resposta ao trauma endócrino-metabólico, por apresentarem alta incidência de colonização bacteriana intestinal (BÖLKE *et al.,* 2002).

1.4- Inflamação intestinal e gastrosquise

Na gastrosquise, as porções de intestino exposto ao LA apresentam algum grau de inflamação intra-útero (OLDHAM *et al.,* 1988; LANGER *et al.,* 1989; LANGER *et al.,* 1990; DILSIZ *et al.,* 1999). A inflamação das alças parece estar relacionada a muitos fatores locais, entre eles a presença de mecônio no LA (API *et al.,* 2001). Macroscopicamente, o intestino exposto apresenta-se espessado, encurtado e recoberto por camada de fibrina. As alças apresentam alterações funcionais, como a perda da contratilidade, diminuição da atividade enzimática das vilosidades e alterações da síntese de colágeno na região submucosa (SRINATHAN *et al.,* 1995).

Os achados histológicos do intestino exposto na gastrosquise sugerem que este se encontra apenas contraído, e não, verdadeiramente atrofiado, o que possibilitaria o retorno ao seu comprimento normal após determinado tempo (AOKI *et al.,* 1980).

Por conta dessas alterações teciduais locais, o intestino é mais susceptível à ocorrência de fenômenos de translocação bacteriana, íleo paralítico e desenvolvimento de enterocolite necrosante (MORRISON *et al.,* 1998; GOMEZ *et al.,* 1998).

1.5- Modelos experimentais de gastrosquise

Os modelos experimentais mais utilizados para se estudar gastrosquise foram descritos em fetos de galinhas (AKTUG *et al.,*1998), de ovelhas (LANGER *et al.,*1990), de coelhas (PHILLIPS *et al.,*1991; SHAW *et al.,* 1994; LANGER & BRAMLETT, 1997) e, mais recentemente, de ratas (CORREIA PINTO *et al.,* 2001). No entanto nem sempre é possível correlacionar ao ser humano dados experimentais obtidos em fetos de aves, devido à grande diferença na embriogênese das espécies. Um modelo em fetos de mamíferos é mais adequado ao estudo comparativo da embriologia da gastrosquise (CORREIA PINTO *et al.,* 2001).

O modelo de gastrosquise em ratas é o modelo animal mais vantajoso, pois o custo é baixo, o tempo de gestação é curto (por volta de 21,5 dias), há maior disponibilidade de fetos por gravidez (8 a 12 fetos), o índice de abortamento e de trabalho de parto prematuro é baixo, e os anticorpos disponíveis para estudos de biologia molecular são abundantes no mercado (CORREIA-PINTO *et al.,* 2001).

2- OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tempo de exposição ao líquido amniótico sobre o crescimento intestinal e somático, através da análise de dados morfométricos fetais, em um modelo de gastrosquise experimental em fetos de ratas *Spreague-Dowley*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

3.1.1- Avaliação do comitê de ética e experimentação animal

O presente experimento foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-UNICAMP) e foi aprovado como projeto de pesquisa número 281-1.

3.1.2- Animal

Fêmeas de ratos Spreague-Dowley com peso ao redor de 250g foram submetidas ao acasalamento. O casal foi mantido em conjunto durante uma noite. No dia seguinte ao encontro, a região genital da fêmea foi examinada para verificação de mancha vaginal de esperma (*vaginal smear*). A presença da mancha vaginal configura o acasalamento e se considera o dia zero de gravidez (tempo de gestação normal de ratas até o termo é de aproximadamente 21,5 dias).

3.2- Método

3.2.1- Constituição dos grupos

Dois grupos de fetos foram criados.

- ✓ Grupo I, fetos submetidos à cirurgia com 18,5 dias de idade gestacional e
- ✓ Grupo II, fetos submetidos à cirurgia com 19,5 dias de idade gestacional.

Cada grupo foi subdividido em três subgrupos, da seguinte maneira:

- ✓ Grupo I: cirurgia com 18,5 dias de gestação

Subgrupos:

- GI: fetos submetidos à gastrosquise

- CI: fetos normais (controle)
- SI: fetos manipulados fora do útero, mas não submetidos à gastrosquise *(sham)*

✓ Grupo II: cirurgia com 19,5 dias de gestação

Subgrupos:

- GII: fetos submetidos à gastrosquise
- CII: fetos normais (controle)
- SII: fetos manipulados fora do útero, mas não submetidos à gastrosquise *(sham)*

As mães foram submetidas à operação cesariana no dia 21,5 de idade gestacional, e seus fetos foram sacrificados. As medidas morfométricas dos fetos e de seus intestinos foram coletadas imediatamente. O intestino foi fixado imediatamente em solução adequada para posterior análise histológica.

3.2.2- Desenho do experimento

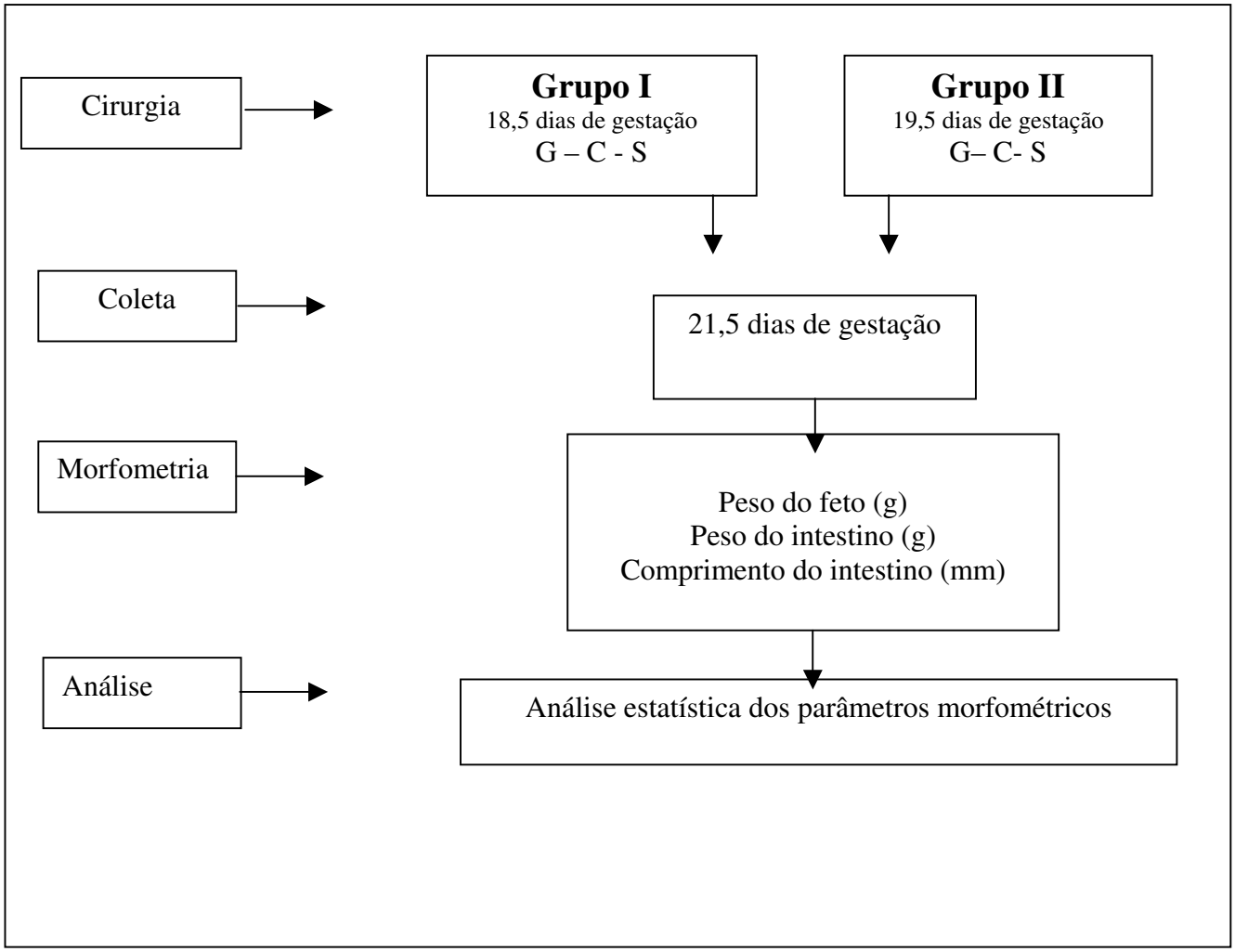


Figura 1- Desenho do experimento

3.2.3- Procedimento cirúrgico

Os animais foram alojados em gaiolas apropriadas com oferecimento de ração específica e água *ad libitum.* Os procedimentos cirúrgicos ocorreram na terça feira e quarta-feira pela manhã, respectivamente para o Grupo I (18,5 dias) e Grupo II (19,5). Em ambos os grupos, a coleta de dados ocorreu com 21,5 dias da gestação, realizada sempre na sexta-feira pela manhã.

Após aclimatação no laboratório, as ratas *Spreague-Dowley* grávidas foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina base- 50mg/ml (Ketamina® - Pfizer do Brasil) associada com xilazina 10mg/ml (Roipum®- Bayer do Brasil Ltda) na dose de 0,6 ml por animal via intramuscular aplicada na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha de calibre 20G. Esta composição anestésica (180mg/kg de ketamina/ 1,25 mg/kg de xilazina) mantém o animal sob anestesia profunda durante um período de três horas, e o pós-operatório transcorreu de maneira indolor durante o período compreendido entre 6 e 12 horas. O abdome foi submetido à raspagem dos pêlos com tosquiadeira elétrica *Sunbeam* ®com cuidado para não ferir os mamilos. Os animais foram colocados sobre bancada aquecida por resistência elétrica marca *Harvard Apparatus*® e previamente regulada na temperatura de 37 graus Celsius. 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). O útero bicorno foi delicadamente exposto e protegido com compressas de gaze estéril embebidas em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) aquecida a 38 graus Celsius.

Os fetos foram contados da região proximal para distal em relação ao colo uterino e divididos em lado direito e esquerdo. O primeiro e o último feto de cada corno não foram utilizados no experimento pelo risco de abortamento relacionado à manipulação desses animais. O segundo feto, contado a partir do istmo uterino, foi considerado o primeiro feto da numeração. A seqüência da numeração foi realizada de maneira crescente, do corno direito para o corno esquerdo. A numeração e a escolha dos procedimentos seguiram seqüência pré- estabelecida: feto 1- gastrosquise, feto 2- controle, feto 3-*sham* e assim sucessivamente até a obtenção de 20 fetos com gastrosquise e seus respectivos controles e *shams*. Esta seqüência de manipulações fetais: ***gastrosquise, controle e sham*** foi obedecida rigorosamente em todo o experimento com o objetivo de padronizar estatisticamente os grupos.

Sob microscopia óptica estereoscópica (microscópio JF- Vasconcellos® - 4,5 X), uma sutura em bolsa tipo *purse string* 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. Foi realizada a retirada parcial do membro inferior direito e do membro inferior esquerdo, para facilitar a exposição da região abdominal a ser incisada. Essa manobra técnica diminui o risco de lesão da vasculatura umbilical durante o procedimento da gastrosquise, e é original. Para a realização da gastrosquise, uma pequena incisão de laparotomia para-umbilical direita abriu a cavidade abdominal fetal, mantendo-se o cuidado de não lesar os vasos umbilicais e o fígado (Figura 1). As alças intestinais foram expostas pela compressão delicada do abdome fetal com hastes de algodão esterilizadas (cotonetes® *Johnson & Johnson* do Brasil). Após a realização da gastrosquise, o feto foi gentilmente recolocado na cavidade uterina, e o útero foi fechado pela sutura em bolsa previamente realizada. Antes do fechamento da bolsa, 0,5 ml de solução fisiológica aquecida foi reposta no interior da cavidade uterina. Durante o procedimento, a porção exposta do feto foi mantida aquecida com solução salina (NaCl 0,9%) a 38 graus Celsius, gotejada com seringa de 5 ml. O feto seguinte, denominado feto-controle, não foi submetido à cirurgia nem tampouco retirado do útero. O feto subseqüente, denominado *sham*, foi exposto fora da cavidade uterina até a altura da inserção do cordão umbilical, foi submetido a uma gentil compressão do flanco direito com hastes flexíveis de algodão, mas não foi submetido a nenhum procedimento cirúrgico, e, em seguida, foi recolocado na cavidade uterina.

A seguir, a parede abdominal da rata-mãe foi fechada em dois planos, com utilização de fio mononylon 2-0, sutura contínua. As ratas foram recuperadas com oxigênio inalado em máscara adaptada para tal, até que estivessem completamente acordadas e se movimentado sem problemas. O período pós-operatório se deu nas gaiolas metabólicas, em baias individuais, com água e ração oferecidas *ad libitum*.

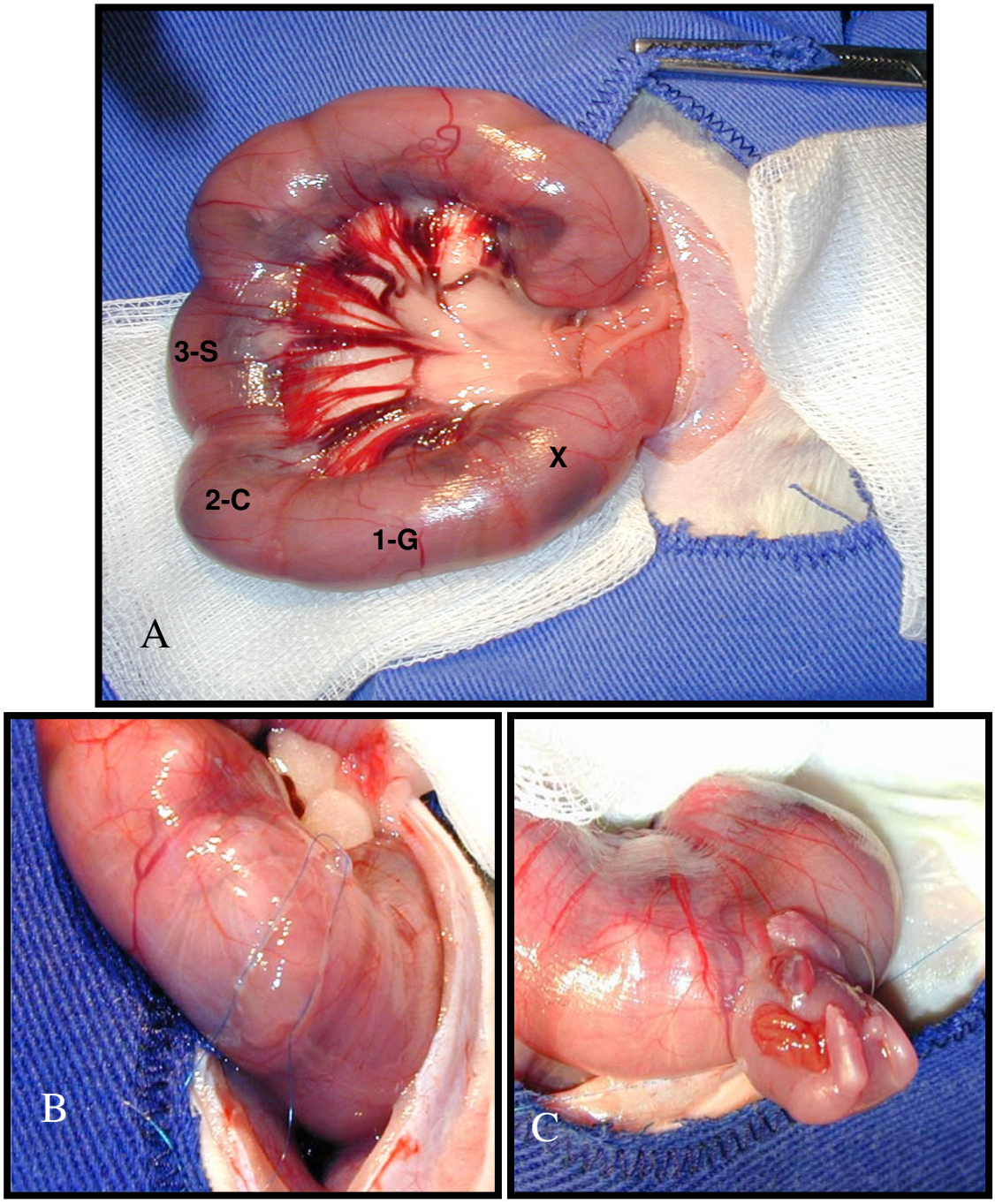


Figura 2- Modelo experimental de gastrosquise com a seqüência da posição dos fetos no útero bicorno (A), abertura uterina da cavidade uterina (B) e feto parcialmente fora do útero, com gastrosquise (C). X= feto excluído, 1G= gastrosquise, 2C= feto controle, 3S= feto *sham*

3.2.4- 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, seguida de punção occipital, e pesados em balança de precisão. O abdome fetal foi aberto por incisão mediana e dissecado sob foco de luz e com auxílio de microscopia óptica, expondo-se as alças. As alças intestinais foram removidas desde o piloro até a região do reto superior, na reflexão peritoneal. O intestino foi pesado (peso em gramas), o mesentério, dissecado com pinças oftalmológicas, e as alças, retificadas em prancha de cortiça para obtenção da medida do seu comprimento (em milímetros) com a utilização de régua e paquímetro de precisão (Figura 3).

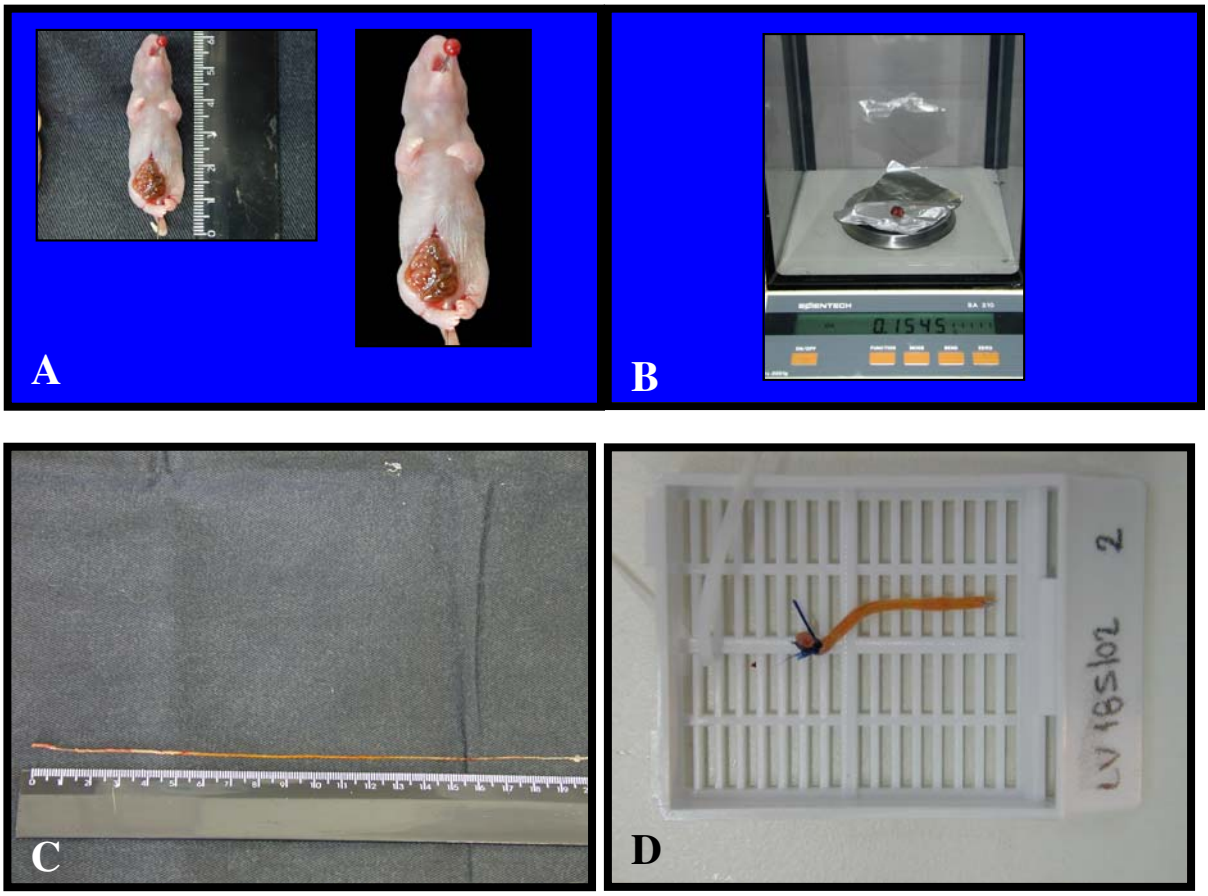


Figura 3- A-coleta fetal, B-pesagem intestinal, C-mensuração do intestino e D- coleta do intestino para posterior análise histológica.

3.2.5- Criação dos parâmetros morfométricos

A obtenção do peso corporal, peso intestinal e comprimento intestinal permitiram o estudo estatístico dessas grandezas nos diversos subgrupos. No entanto observou-se a necessidade de criar relações entre esses parâmetros, que melhor demonstrassem as diferenças entre os subgrupos. Foi criada a razão matemática Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC), com o objetivo de se estudar a influência do peso intestinal na aferição do peso corporal total dos animais. A razão matemática Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/CI) foi criada com objetivo de se estudar a relação

entre peso e comprimento do intestino dos fetos, para que se pudesse melhor quantificar a relação entre encurtamento e aumento do peso da víscera.

A diferença Peso Corporal - Peso Intestinal (PC-PI) foi criada com o objetivo de se estudar o grau de influência do peso intestinal no peso corporal total.

3.2.6- Curvas de crescimento fetal normal

Como o estudo visa a avaliar as alterações somáticas e intestinais nos fetos portadores de gastrosquise em duas diferentes idades gestacionais, uma curva de crescimento normal em fetos de ratas *Spreague-Dowley* foi criada a fim de comparar com o crescimento dos fetos submetidos ao procedimento cirúrgico. Ratas grávidas (n=5) com idade gestacional identificada pelo mesmo método (dia zero = vaginal *smear*) tiveram 40 fetos removidos em dias seqüenciais da gestação: 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5 dias. O peso corporal, o peso intestinal e o comprimento intestinal foram determinados. A média dos parâmetros foi calculada, e gráficos foram construídos para comparação com os grupos submetidos à gastrosquise.

3.3- Análise estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo, foram feitas tabelas de freqüência das variáveis categóricas e estatísticas descritivas (com medidas de posição e dispersão) das variáveis contínuas.

Para comparar as variáveis entre os grupos e entre as idades gestacionais foi utilizada a Análise de Variância **(ANOVA)** para medidas repetidas (CONOVER, 1971; MILLKEN & JOHNSON, 1984; MONTGOMERY-DOUGLAS, 1991).

Essa análise faz duas comparações ao mesmo tempo: a primeira compara os grupos de diferentes idades gestacionais, Grupo I *versus* Grupo II (18,5 *versus* 19,5 dias) em cada subgrupo (G, C e S), através do **teste de comparação múltipla de Duncan,** e a

segunda compara as tríades (G *versus* C *versus* S) entre si dentro de cada grupo de mesma idade gestacional, através do **teste de contrastes de perfil.** O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, $p<0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Morfometria

4.1.1- Peso corporal

As médias dos pesos corporais para os fetos do Grupo I (18,5dias) foram: **GI= 5,32g** (± 0,75), variando de 3,85 a 6,29 g; **CI=5,68g** (± 0,62), variando de 4,35 a 6,42g; **SI=5,86g** (±0,53), variando de 4,69 a 6,75g ($p<0,005$ ANOVA entre GIxCI e GIxSI). Para os fetos do Grupo II (19,5 dias), os resultados de peso corporal foram: **GII=5,32g** (±0,68), variando de 4,19 a 6,60g; **CII=5,80g** (±0,57), variando de 4,67 a 6,89g; **SII=5,66g** (±0,70), variando de 4,37 a 7,24g ($p<0,005$ ANOVA entre GxC e GxS). Com referência ao peso corporal médio na comparação entre os Grupos I e II não houve diferença estatística ($p>0,05$) (Figuras 4 e 5).

A análise desse dado morfométrico não demonstrou uma variação significativa entre os animas das duas diferentes idades gestacionais, quando comparados em grupos equivalentes (GxG, CxC, SxS). No entanto, quando se compararam os diferentes subgrupos dentro de uma mesma idade gestacional (GxCxS; GxCxS) as diferenças passaram a ser significativas. Os animais do GI (18,5 dias) eram significativamente mais leves que CI e SI. O mesmo ocorreu com os animais do GII quando comparados com os grupos CII e SII. Quando comparados os animais GI e GII, não se obteve diferença estatística.

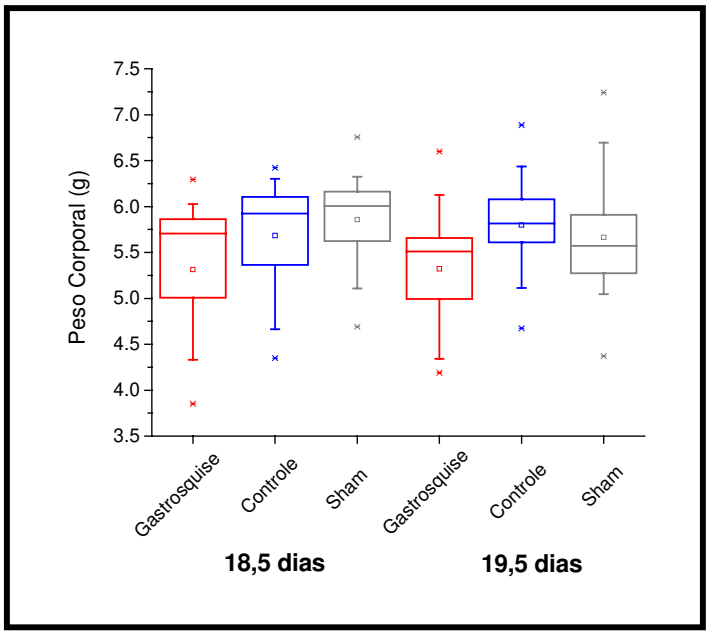


Figura 4- Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos gastrosquise, controle e *sham,* dias 18,5 e 19,5.

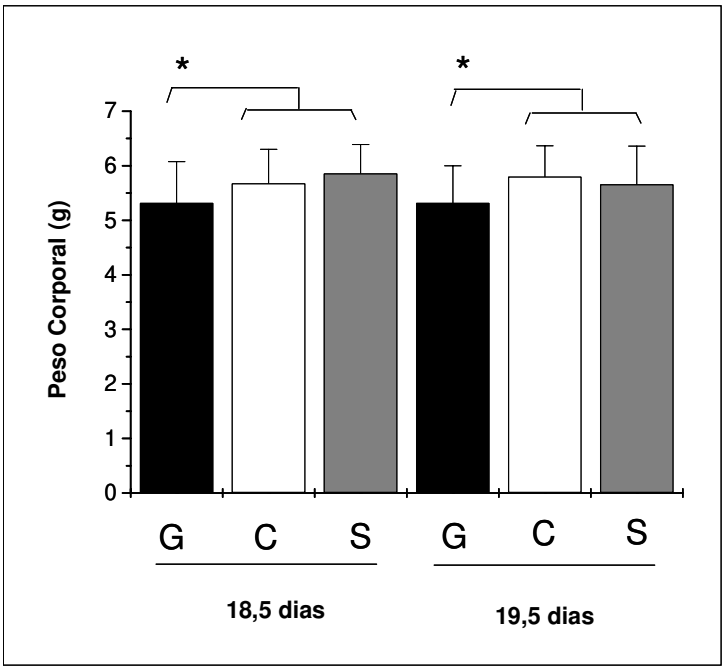


Figura 5- Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos gastrosquise, controle e *sham,* dias 18,5 e 19,5.

4.1.2- Peso intestinal

As médias dos pesos intestinais para os fetos do Grupo I foram: **GI=0,283g** (±0,051), variando de 0,19 a 0,38g; **CI=0,238g** (±0,045), variando de 0,184 a 0,354g; **SI=0,231g** (±0,034), variando de 0,186 a 0,334g (p<0,005 ANOVA entre GxC e GxS). As médias dos pesos intestinais para os fetos do Grupo II foram: **GII=0,272g** (±0,081), variando de 0,081 a 0,429g; **CII= 0,231g** (± 0,027), variando de 0,167 a 0,279g; **SII=0,233g** (±0,03), variando de 0,156 a 0,283g (p<0,005 ANOVA entre GxC e GxS). Com referência ao peso intestinal na comparação entre os Grupos I e II, não houve diferença estatística (p>0,05) (Figuras 6 e 7).

A comparação entre os grupos GI, CI e SI demonstrou que o intestino dos fetos submetidos à gastrosquise é consideravelmente mais pesado que controle e *sham* na mesma idade gestacional. O mesmo ocorreu quando se comparam os grupos GII, CII e SII. Comparados os grupos-controle e *sham* em relação a esse parâmetro, não se obteve qualquer diferença significativa, seja na idade de 18,5 dias ou 19,5 dias de gestação. Quando se comparou o GI com GII também não se obteve diferença estatisticamente significativa.

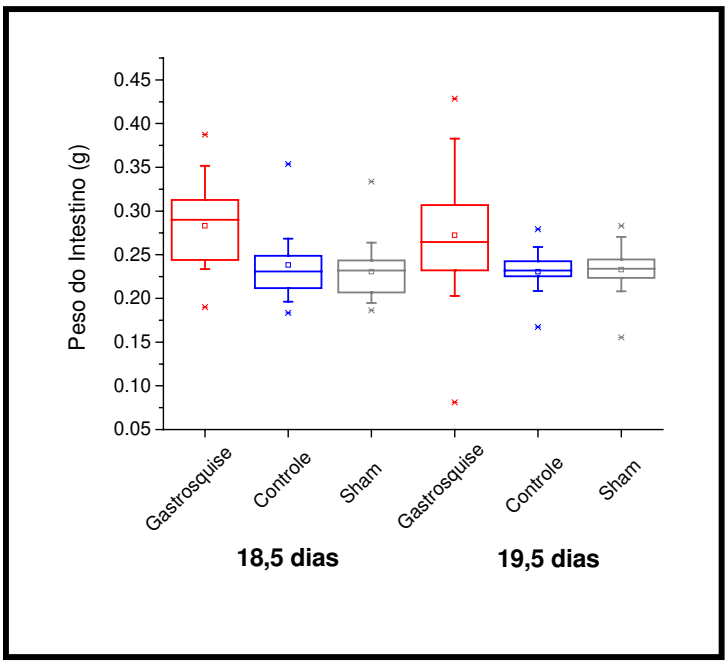


Figura 6- Comparação entre as medidas do peso intestinal dos fetos gastrosquise, controle e *sham*, dias 18,5 e 19,5.

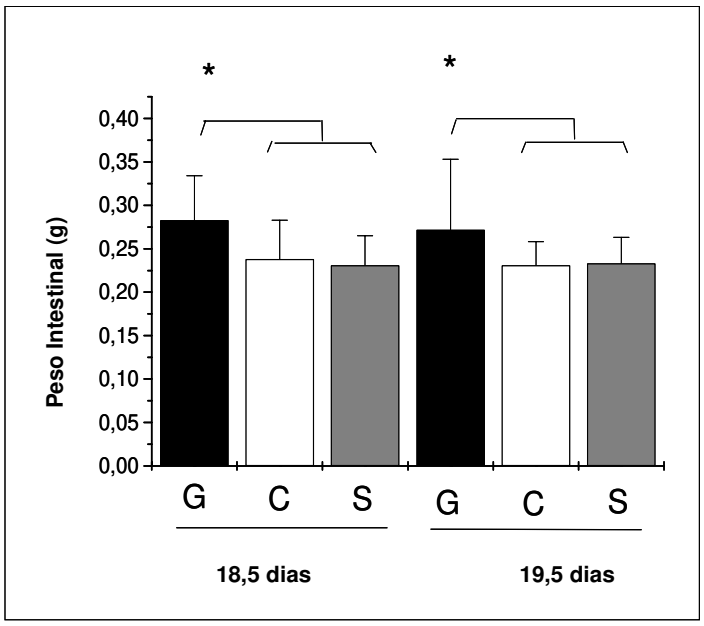


Figura 7- Comparação entre as medidas do peso intestinal dos fetos gastrosquise, controle e *sham*, dias 18,5 e 19,5.

4.1.3- Comprimento intestinal

As médias dos comprimentos intestinais para os fetos do Grupo I foram: **GI=125mm** (±27,1), variando de 80 a 168mm; **CI=216mm** (±15,2), variando de 194 a 245mm; **SI = 209mm** (±17,2), variando de 156 a 232mm ($p<0,005$ ANOVA entre GIxCI e GIxSI). As médias dos comprimentos intestinais para os fetos do Grupo II foram: **GII=148mm** (±32,4), variando de 80 a 193mm; **CII=226mm** (±23,8), variando de 167 a 267mm; **SII=226mm** (±24,9), variando de 160 a 268 mm ($p<0,005$ ANOVA entre GxC e GxS). Na comparação dos comprimentos intestinais entre os Grupos I e II houve diferença estatística ($p<0,05$), tendo sido observada uma redução de 42% no Grupo I e de 33% no Grupo II (Figuras 8 e 9).

Esse parâmetro apresentou grandes diferenças na análise comparativa entre os subgrupos de animais. Os fetos GI apresentaram comprimento intestinal consideravelmente mais curto que os CI e SI. O mesmo aconteceu com o grupo II. Porém, quando se compararam os animais-controle e *sham* entre si, quer pertencessem aos grupos I ou II, não

se verificou qualquer diferença significativa. Quando se compararam as médias do comprimento intestinal dos animais GI e GII, notou-se que os animais submetidos à cirurgia mais precoce apresentam intestino bastante mais curto (p<0,005).

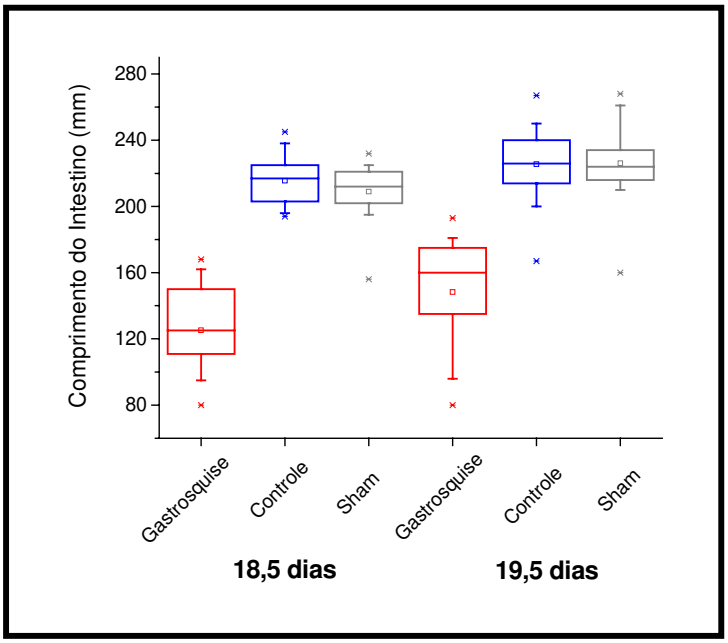


Figura 8- Comparação entre as medidas do comprimento intestinal dos fetos gastrosquise, controle e *sham*, dias 18,5 e 19,5.

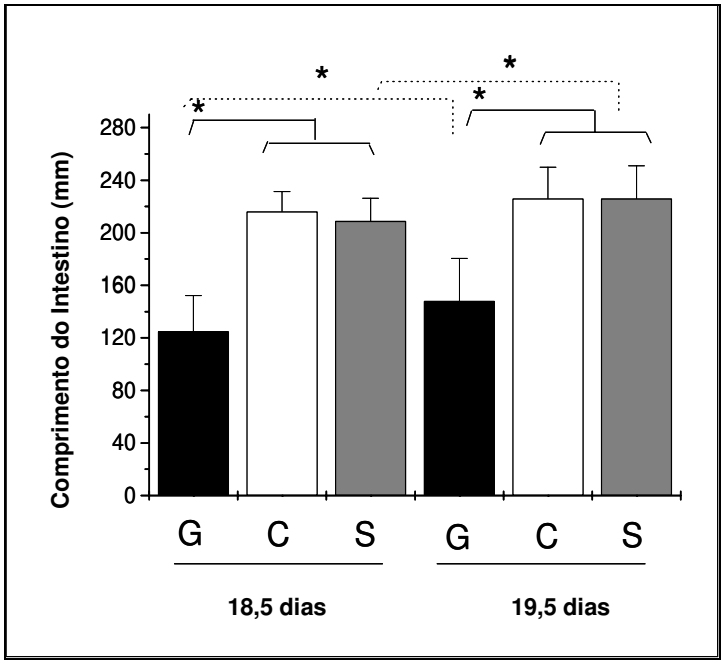


Figura 9- Comparação entre as medidas do comprimento intestinal dos fetos gastrosquise, controle e *sham*, dias 18,5 e 19,5.

4.1.4- Relação Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC):

A média das relações peso intestinal/ peso corporal (PI/PC) para os fetos do Grupo I foram: **GI=0,054** (±0,009), variando de 0,039 a 0,071; **CI=0,042** (±0,006), variando de 0,036 a 0,059; **SI=0,039** (±0,0050), variando de 0,030 a 0,052 ($p<0,005$ ANOVA entre GxC e GxS). A média das relações PI/PC para os fetos do Grupo II foram: **GII=0,051** (±0,014), variando de 0,017 a 0,080; **CII=0,040** (±0,003), variando de 0,034 a 0,048; **SII=0,041** (±0,003), variando de 0,036 a 0,045 ($p<0,005$ ANOVA entre GxC e GxS) (Figuras 10 e 11). Não se observaram diferenças em relação a esse parâmetro quando se compararam animais de diferentes idades gestacionais (GI x GII, CI x CII e SI x SII). Porém, nas comparações entre animais de mesma idade gestacional, notou-se que existe diferença significativa entre os animais submetidos à gastrosquise e seus pares.

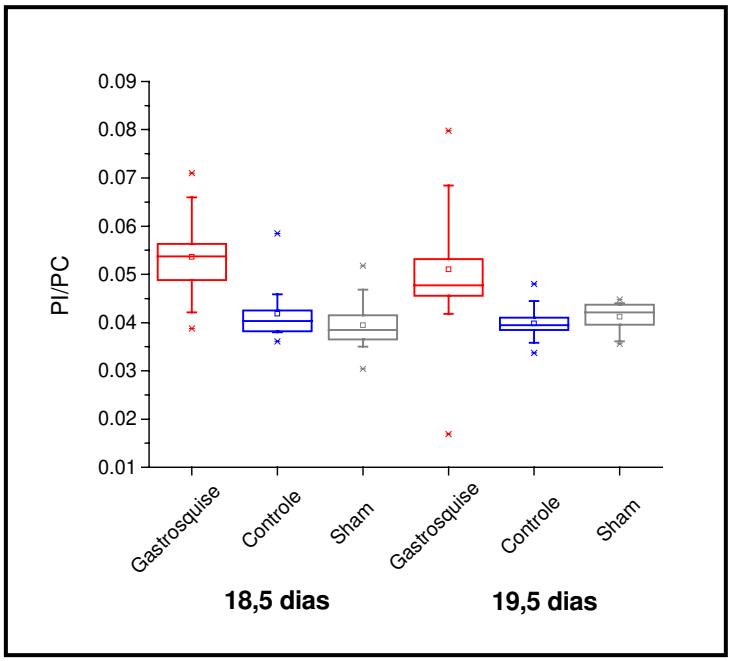


Figura 10- Comparação entre as medidas da relação peso intestinal/peso corporal (PI/PC) dos fetos com gastrosquise, controle e *sham*, dias 18,5 e 19,5.

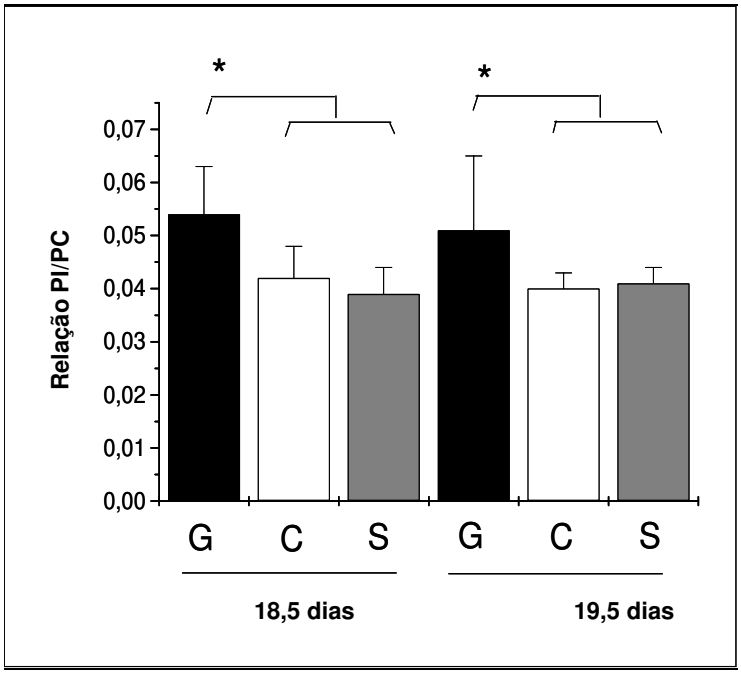


Figura 11- Comparação entre as medidas da relação peso intestinal/peso corporal (PI/PC) dos fetos com gastrosquise, controle e *sham*, dias 18,5 e 19,5.

4.1.5- Relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/CI)

A média das relações peso do intestino/ comprimento do intestino (PI/CI)(mg/mm) para os fetos do Grupo I foram: **GI=2,35 mg/mm** (±0,55), variando de 1,23 a 3,04 mg/mm; **CI=1,11 mg/mm** (±0,217), variando de 0,83 a 1,68 mg/mm; **SI=1,11 mg/mm** (±0,160), variando de 0,828 a 1,48 mg/mm ($p<0,005$ ANOVA entre GxC e GxS). A média das relações PI/CI para os fetos do Grupo II foram: **GII=1,94 mg/mm** (±0,921), variando de 1,02 a 4,46 mg/mm; **CII=1,02 mg/mm** (±0,102), variando de 0,86 a 1,37 mg/mm; **SII=1,04 mg/mm** (±0,188), variando de 0,8 a 1,75 mg/mm ($p<0,005$ ANOVA entre GxC e GxS) (Figuras 12e 13).

Essa relação é significativamente maior nos animais submetidos à gastrosquise, seja na idade gestacional de 18,5 dias ou na de 19,5 dias. Essa diferença é estatisticamente significativa nas comparações tanto dentro dos grupos de mesma idade gestacional quanto nos grupos de diferentes idades gestacionais.

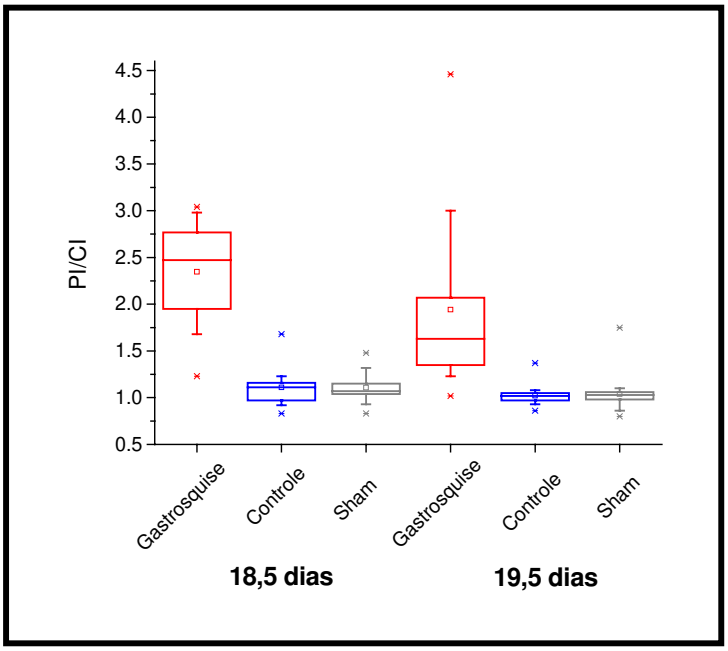


Figura 12- Comparação entre as medidas da relação peso intestinal/comprimento intestinal (PI/CI) dos fetos com gastrosquise, controle e *sham*, dias 18,5 e 19,5.

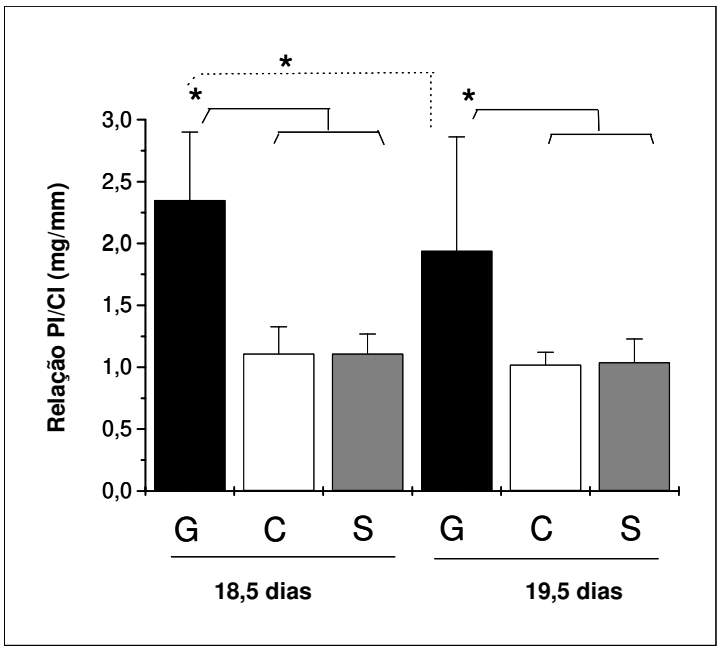


Figura 13- Comparação entre as medidas da relação peso intestinal/comprimento intestinal (PI/CI) dos fetos com gastrosquise, controle e *sham*, dias 18,5 e 19,5.

4.1.6- Diferença Peso Corporal - Peso Intestinal

As média da diferença entre peso corporal e peso intestinal para os fetos do Grupo I (18,5dias) foram: **GI=5,03g** (± 072), variando de 3,59g a 5.98g; **CI=5,45g** (± 0,59), variando de 4,17 a 6,16g; **SI=5,63g** (±0,51), variando de 4,50g a 6,42g ($p<0,005$ ANOVA entre GxC e GxS). Para os fetos do Grupo II (19,5 dias) os resultados foram: **GII=5,05g** (±0,64), variando de 4,01g a 6,29g; **CII=5,57g** (±0,54), variando de 4,51g a 6,62g; **SII=5,43g** (±0,67), variando de 4,22g a 6,96g ($p<0,005$ ANOVA entre GxC e GxS). Com referência ao parâmetro PC-PI, na comparação entre os Grupos I e II não houve diferença estatística ($p>0,05$) (Figuras 14 e 15).

Quando se excluiu o componente do peso intestinal no peso corporal total, esse viés foi anulado, proporcionando uma idéia mais fidedigna do quanto os fetos submetidos à gastrosquise são realmente mais leves que seus irmãos-controle. Os valores de PC-PI nos grupos de GI e GII continuaram significativamente menores de que seus irmãos de mesma

idade gestacional. No entanto, quando comparados entre si nas duas diferentes idades gestacionais (GI x GII) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto a esse parâmetro.

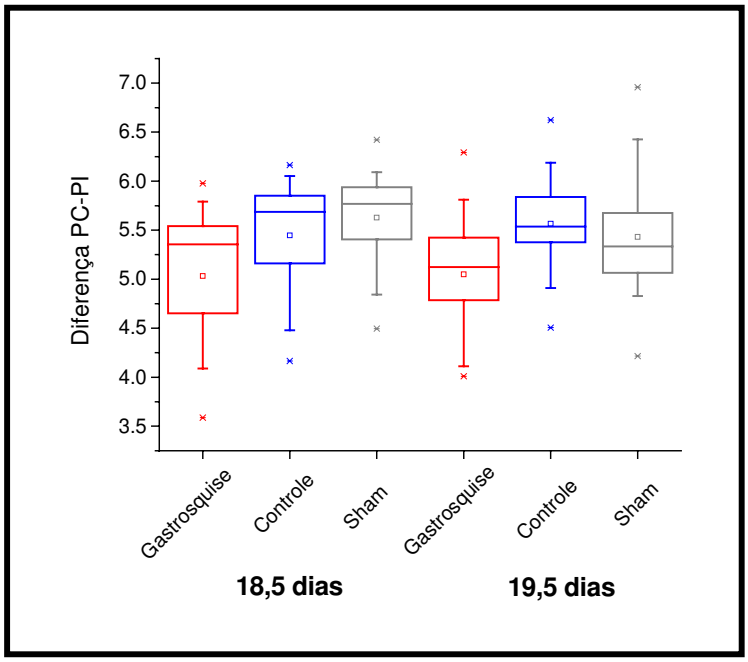


Figura 14- Comparação entre as medidas da diferença entre o peso corporal e o peso intestinal (PC-PI) dos fetos gastrosquise, controle e *sham,* dias 18,5 e 19,5.

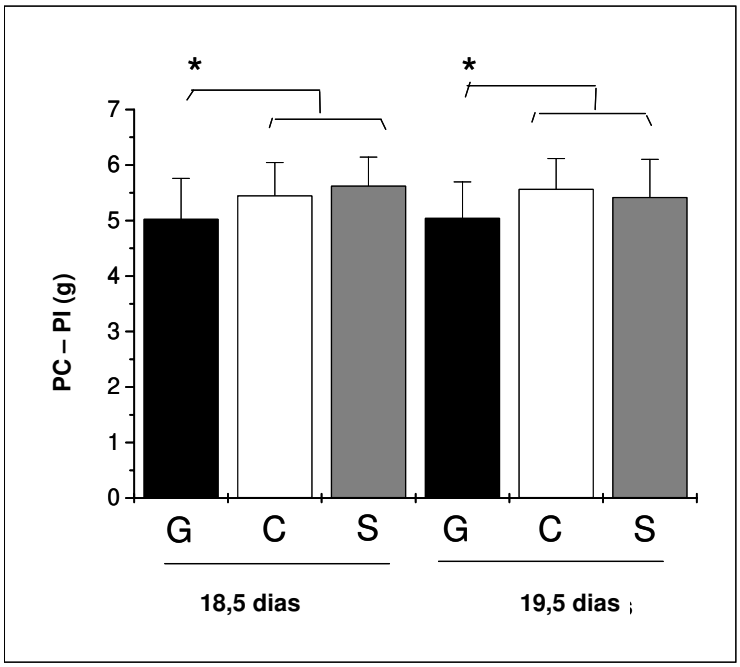


Figura 15- Comparação entre as medidas da diferença entre o peso corporal e o peso intestinal (PC-PI) dos fetos gastrosquise, controle e *sham,* dias 18,5 e 19,5.

4.1.7- Síntese dos resultados

A tabela 1 apresenta as medidas morfométricas dos fetos submetidos à gastrosquise experimental nas duas diferentes idades gestacionais e de seus controles. Os parâmetros morfométricos foram comparados entre animais da mesma idade gestacional (gastrosquise x controle x *sham*) e entre animais de diferentes idades gestacionais (18,5 dias x 19,5 dias). O método utilizado foi ANOVA, e o nível de significância estatística foi estabelecido em 0,05.

4.2- Curvas de crescimento fetal e intestinal normal

4.2.1- Peso Corporal

A média do peso corporal dos fetos no dia 18,5 foi de **2,52g** (±0,22), variando de 2,10 a 2,95g. No dia 19,5, foi de **2,98g** (±0,43), variando de 2,86 a 4,92g. No dia 20,5, foi de **5,73g** (±0,34), variando de 5,0 a 6,42g e no dia 21,5 foi de **6,28g** (±0,30), variando de 5,81 a 6,88g. Os resultados individuais da curva de crescimento para os fetos com 18,5, 19, 5 , 20,5 e 21,5 dias encontram-se nos Apêndices 3 a 6.

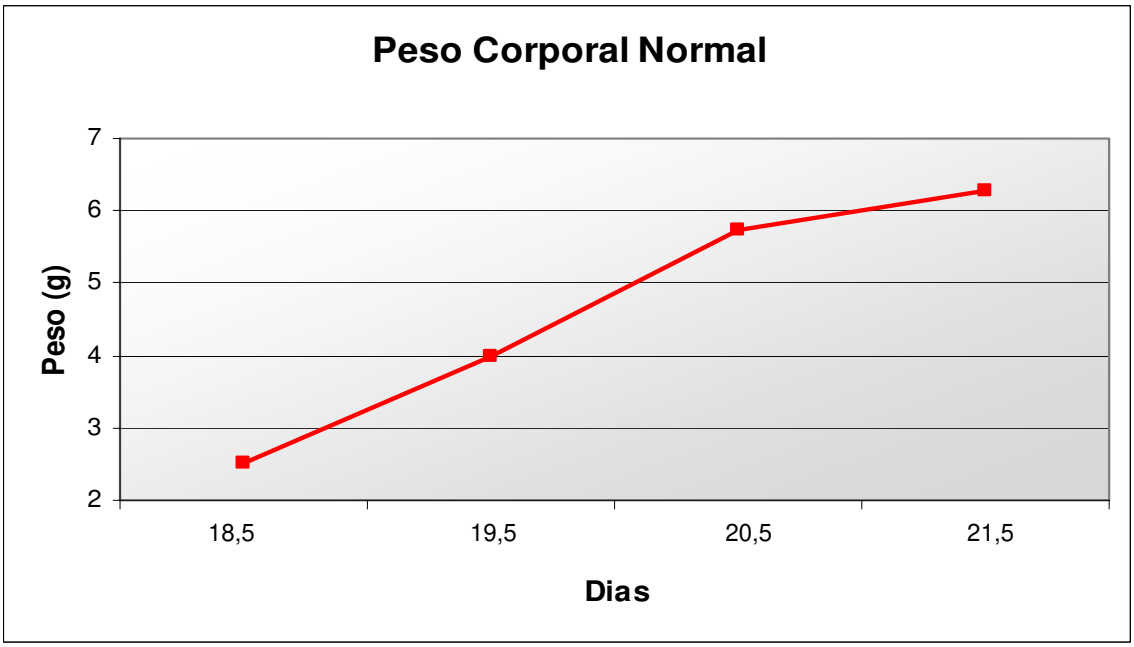


Figura 16- Curva das médias do peso corporal de fetos de ratas "normais" nos dias 18,5; 19,5; 20, 5 e 21,5 de gestação.

4.2.2. Peso Intestinal

A média do peso intestinal dos fetos no dia 18,5 foi de **0,058g** (±0,008), variando de 0,0439 a 0,0736g. No dia 19,5, foi de **0,105g** (±0,021), variando de 0,0593 a 0,1542g. No dia 20,5, foi de **0,184g** (±0,019), variando de 0,1484 a 0,2175g e no dia 21,5 foi de **0,2554g** (±0,028), variando de 0,2118 a 0,3537g. Os resultados individuais da curva de crescimento para os fetos com 18,5, 19, 5 , 20,5 e 21,5 dias encontram-se nos Apêndices 3 a 6.

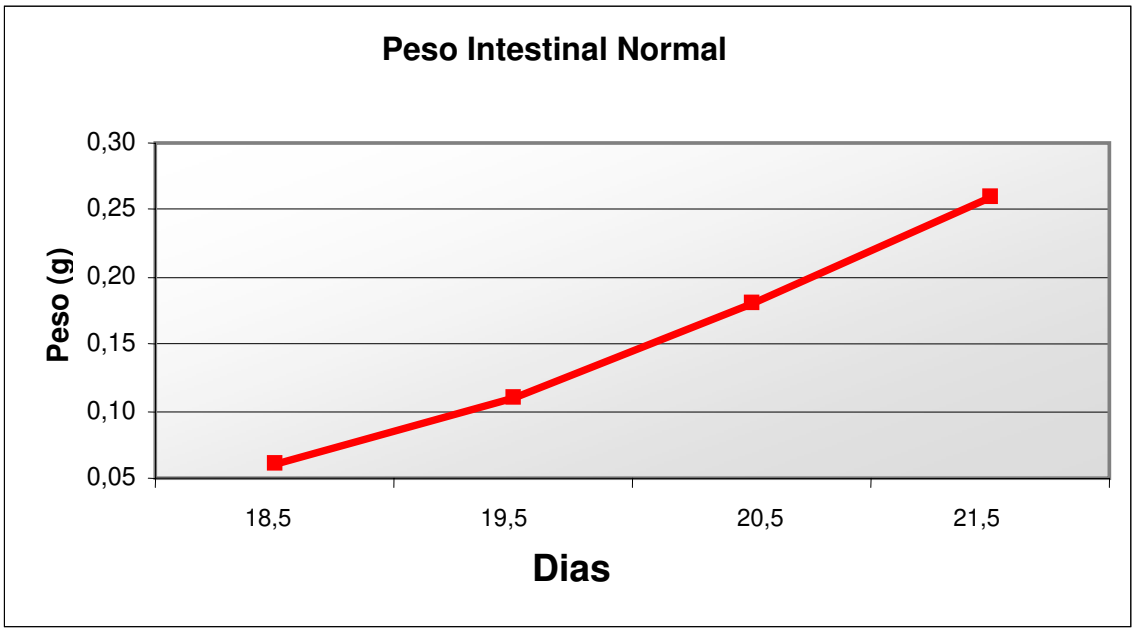


Figura 17- Curva das médias do peso intestinal de fetos de ratas "normais" nos dias 18,5; 19,5; 20, 5 e 21,5 de gestação.

4.2.3. Comprimento Intestinal

A média do comprimento intestinal dos fetos no dia 18,5 foi de **103 mm** (±12), variando de 88 a 145 mm. No dia 19,5, foi de **161 mm** (±15), variando de 130 a 194 mm. No dia 20,5, foi de **213 mm** (±16), variando de 187 a 250 mm e no dia 21,5 foi de **239 mm** (±24), variando de 194 a 280 mm.

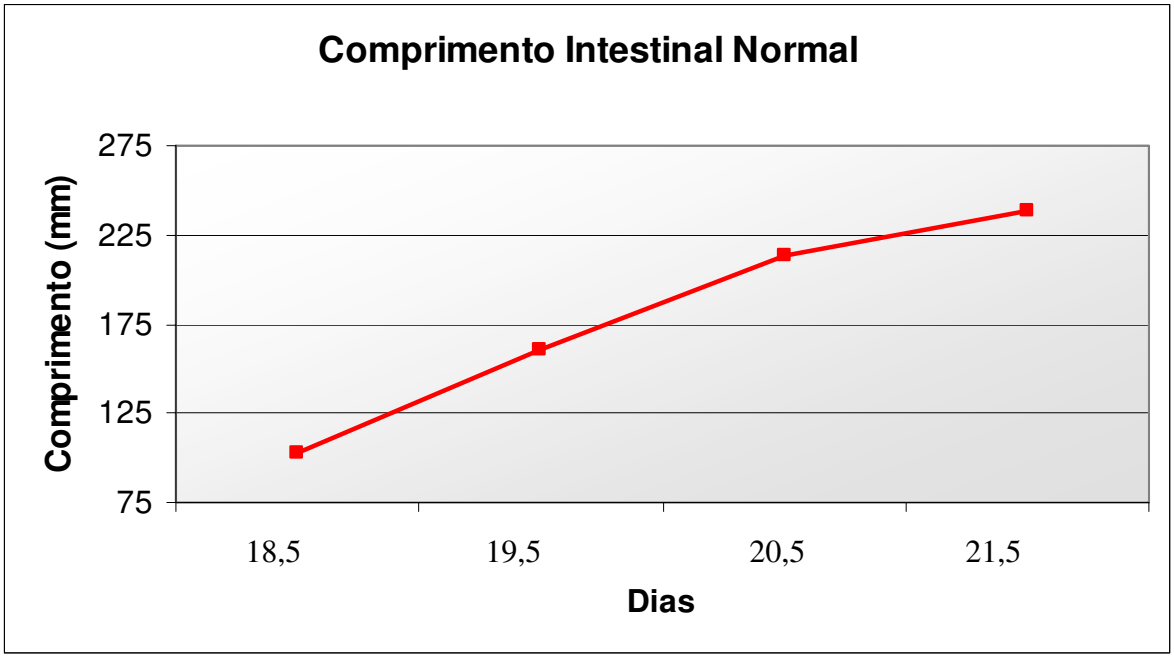
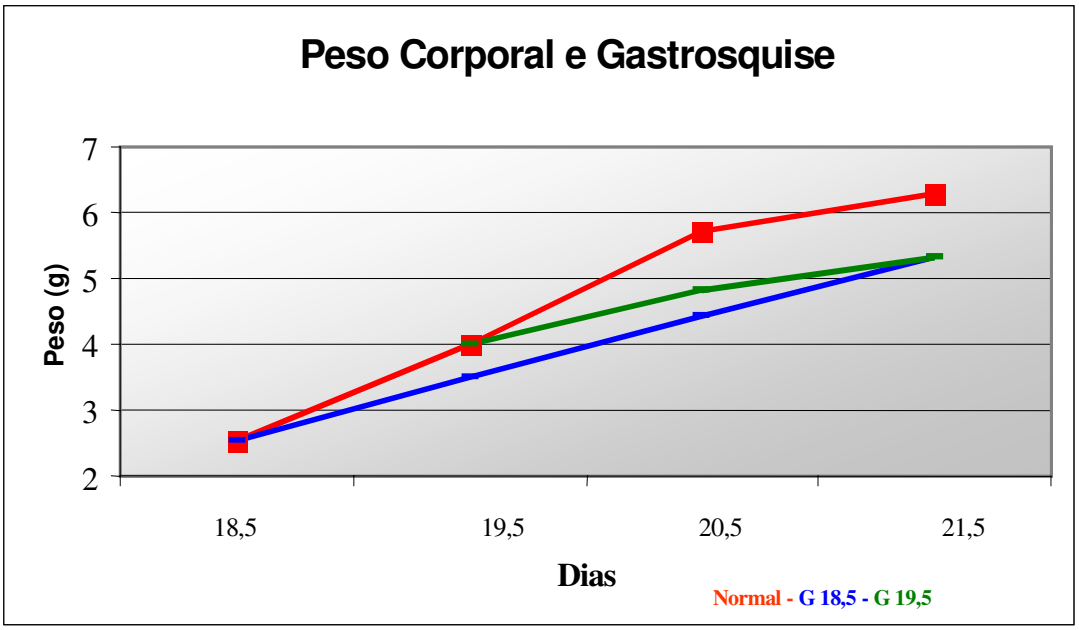


Figura 18- Curva das médias do comprimento intestinal de fetos de ratas "normais" nos dias 18,5; 19,5; 20, 5 e 21,5 de gestação.

A obtenção dessas curvas, a partir de fetos filhos de mães não operadas, proporcionou comparar os fetos de crescimento normal com fetos submetidos à gastrosquise (GI e GII). Nas figuras abaixo, tem-se a visualização das diferenças entre esses grupos e o aspecto evolutivo dessas diferenças ao longo da gestação.

Fig



r

vas das médias do peso corporal de fetos "normais" e de fetos submetidos à gastrosquise.

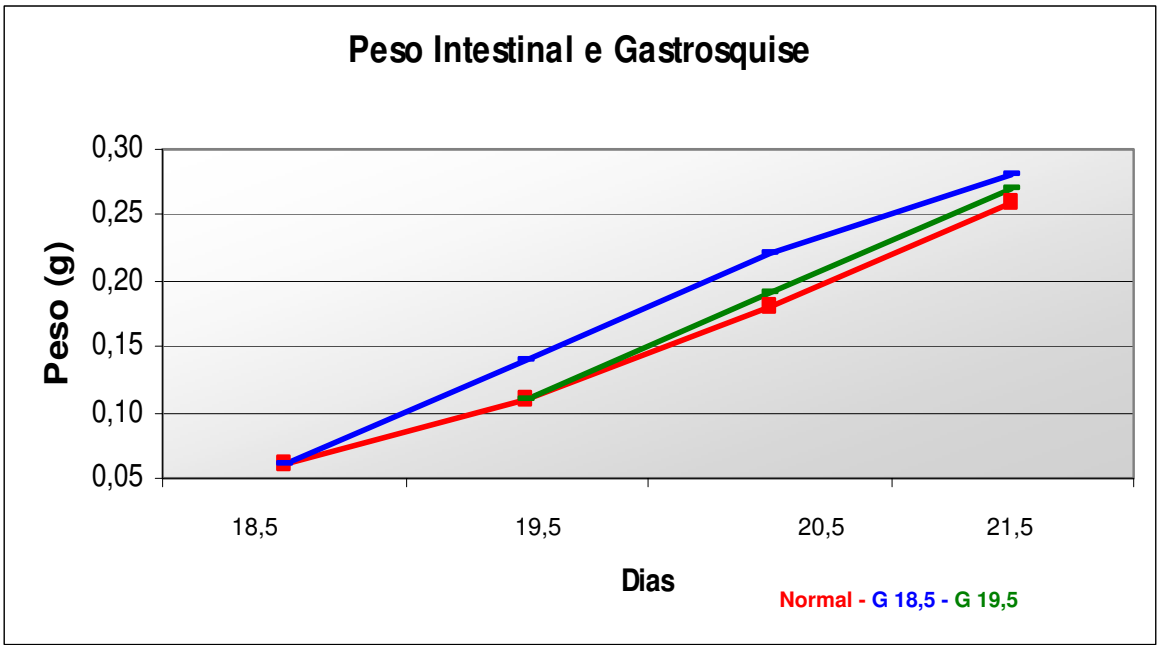


Figura 20- Curvas das médias do peso intestinal de fetos "normais" e de fetos submetidos à gastrosquise.

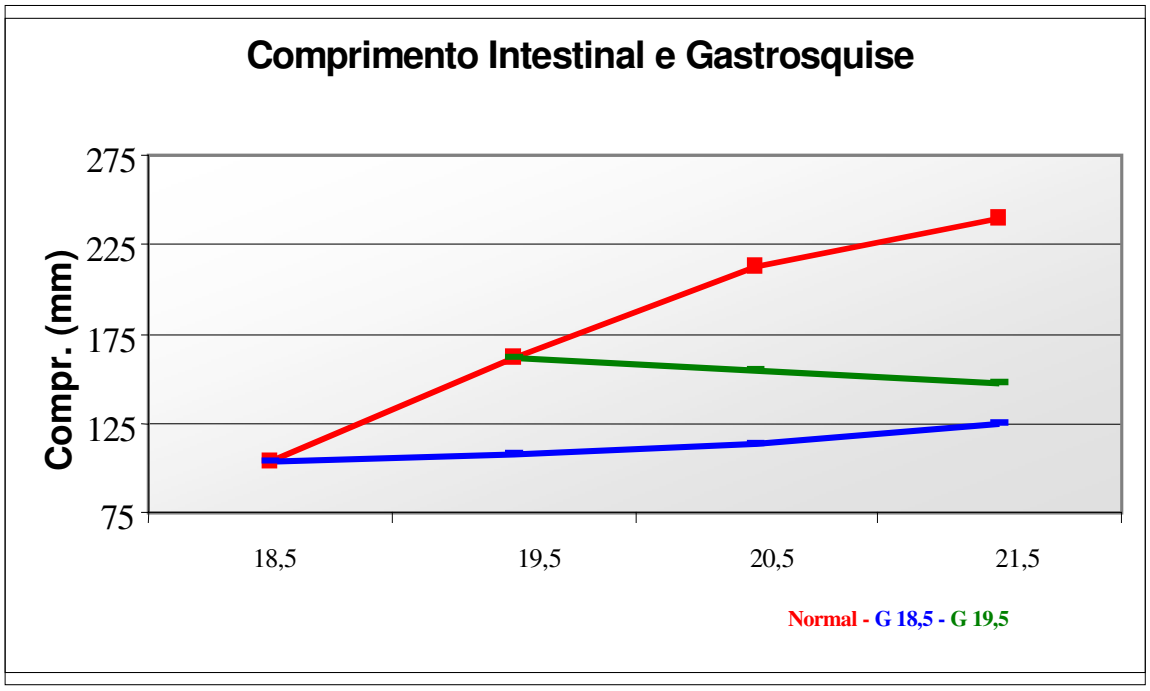


Figura 21 Curvas das médias do comprimento intestinal de fetos "normais" e de fetos submetidos à gastrosquise

5- DISCUSSÃO

O nascimento de indivíduos portadores de gastrosquise é sempre um evento que gera ansiedade para a família e para a equipe médica. Os recém- nascidos portadores desse defeito possuem prognóstico variável. Apesar da mortalidade não ser elevada, a taxa de morbidade associada é muito alta (KING & ASKIN, 2003). Não obstante essas complicações neonatais não apresentam relação com achados ultra-sonográficos pré-natais (JAPARAJ *et al.*, 2003). Muitos indivíduos necessitam de longo tempo de permanência hospitalar com tratamento intensivo, nutrição parenteral e cirurgias. Dessa associação resultam altos custos econômicos. Aproximadamente metade dos fetos portadores de gastrosquise apresentam RCIU, e um quarto destes também se desenvolvem num ambiente de oligoâmnio. No momento do parto (seja por via vaginal ou cesariana), a taxa de complicações nesses indivíduos é maior que na população em geral (ANTEBY *et al.,* 1999).

Ainda não se conhecem fatores preditivos de evolução no tratamento de indivíduos portadores de gastrosquise. Discute-se se a maturidade fetal e via de parto poderiam influir no prognóstico neonatal desses indivíduos. A escolha do momento e da forma mais adequados para o parto ainda é assunto controverso na literatura (HAUSLER *et al.,* 1997). Há trabalhos que relacionam melhor prognóstico com parto normal do feto a termo (HAUSLER *et al.,* 1997). Publicações mais recentes não conseguiram relacionar a via de parto com a taxa de sobrevivência neonatal em indivíduos portadores de gastrosquise (SALIHU (a) *et al.,* 2004).

O parto a termo possui a vantagem de trazer ao mundo um indivíduo teoricamente mais maduro e bem constituído, em condições de resistir a uma internação prolongada e a terapias invasivas (NPP e cirurgias, por exemplo). Há serviços que preconizam o parto cesariano em feto a termo como rotina em indivíduos portadores de gastrosquise (DUNN *et al.,* 1999)

No entanto, sabe-se que a exposição prolongada do intestino do feto ao líquido amniótico é deletéria para a víscera e para o indivíduo como um todo. Há associação clara entre gastrosquise e RCIU, e há indícios de que a morbidade pós-natal desses indivíduos esteja associada à severidade da RCIU (VILELA *et al.,* 2001). A hipótese de que o maior tempo de exposição ao LA nesses indivíduos (gastrosquise de aparecimento em idade gestacional mais precoce) levaria a uma piora da RCIU ainda não tem resposta.

Por outro lado, a interrupção da gravidez através de parto cesariano leva à cessação da ação deletéria do LA sobre o intestino. Isso representa uma interrupção nos processos de inflamação intestinal e de RCIU que os fetos de gastrosquise sofrem ao longo da gestação. Como a neonatologia atual é perfeitamente capaz de lidar com indivíduos prematuros e portadores de RCIU, questiona-se sobre a existência de benefícios reais do parto a termo nesses indivíduos.

Nos fetos portadores de gastrosquise e RCIU, questiona-se se a permanência no útero além de um tempo determinado deixaria de trazer benefícios (na melhora das condições de maturidade e vitalidade), e passaria a induzir piora da RCIU (por prolongar o tempo de exposição ao LA). Como a decisão de antecipação do parto nesses indivíduos ainda é controversa, há necessidade de maior embasamento experimental no assunto.

Nesse contexto, insere-se este trabalho, desenvolvido em um modelo experimental de gastrosquise em fetos de ratas *Spreague-Dowley*, que é de baixo custo e de curto tempo gestacional.

5.1- Comparação entre as tríades

Peso Corporal

A análise dos resultados demonstra que a presença de gastrosquise resultou em fetos com menor peso corporal, independentemente do tempo de exposição das alças ao LA. A realização da gastrosquise no 19,5 dia de gestação não resultou em uma diferença de peso corporal em relação aos fetos cuja gastrosquise foi criada no dia anterior.

Esse fato vem ao encontro da observação clínica de séries na literatura, pois fetos humanos portadores de gastrosquise apresentam altas taxas de RCIU e, em sua maioria nascem pequenos para a idade gestacional (PIG) (BLAKELOCK (b) *et al.,*1997). Em nossos animais, a severidade da RCIU apresentada não se correlacionou com a precocidade do aparecimento da gastrosquise.

Peso Intestinal

Em relação ao Peso Intestinal, este foi maior nos dois grupos de animais submetidos à gastrosquise, independentemente da idade gestacional. O maior peso intestinal está fortemente associado à presença de edema no intestino herniado. Esse dado foi confirmado pela análise histológica e pelo estudo da relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/CI), que pode ser observado nas figuras 12 e 13. Nota-se, na análise desse parâmetro, que os dois grupos submetidos à gastrosquise apresentam nítido aumento da relação PI/CI em relação a seus controles. Isso ocorre porque o peso do intestino nos portadores de gastrosquise é maior que nos controles, e seu comprimento, menor. Portanto aumenta-se o numerador e diminui-se o denominador da fração PI/CI nos portadores de gastrosquise.

Na análise da figura 7, nota-se que não há diferenças nos Pesos Intestinais entre controle e *sham,* tanto no grupo 18,5 dias como no grupo 19,5 dias. Isso demonstra que o maior peso encontrado nos grupos operados não se deve à manipulação abdominal.

PI/PC

A relação Peso Intestinal/ Peso Corporal (PI/PC) foi criada para que se obtivesse a informação de quão importante seria o peso intestinal na constituição do peso corporal. Esse parâmetro também não apresentou diferença significativa entre os fetos com gastrosquise realizada nos dias 18,5 e 19,5 (0,054 x 0,051). A diferença foi observada entre os fetos com gastrosquise e os fetos-controle dentro de cada grupo. Nota-se que nos fetos portadores de gastrosquise, o peso intestinal representa uma parcela maior na constituição do peso corporal. Isso se deve a dois fatores distintos: Primeiro porque os fetos portadores de gastrosquise são mais leves e, segundo, porque seus intestinos são mais pesados. Outro dado importante é o de que a diferença entre as médias dos grupos- controle nas duas diferentes idades gestacionais é muito pequena (0,054 e 0,051).

PC-PI

A criação do parâmetro Peso Corporal – Peso Intestinal (PC-PI) se justifica quando se leva em conta a possibilidade de um viés estatístico na interpretação do peso corporal dos fetos. Como o intestino dos indivíduos com gastrosquise é mais pesado que de seus controles (pelo edema), quando se pesa o feto, o peso corporal recebe um acréscimo resultante do aumento do peso intestinal. No entanto, ao subtrair-se o peso intestinal do peso corporal, pode-se avaliar o verdadeiro peso somático, que é reflexo do desenvolvimento intra-uterino.

Na avaliação da influência da gastrosquise sobre o crescimento somático (PC-PI), verificou-se que tanto os fetos com gastrosquise aos 18,5 dias quanto os de 19,5 dias obtiveram um valor menor em relação aos fetos-controle e *sham*. Esses dados justificam a hipótese de que RCIU é um evento primariamente resultante da gastrosquise. Fica claro, através da análise dos resultados, que fetos portadores de gastrosquise são mais leves que seus controles, independentemente da idade gestacional do aparecimento do defeito. Esse fato encontra correlação com dados obtidos em seres humanos.

Na literatura, fetos humanos portadores de gastrosquise foram estudados e classificados no período pré-natal por ultra-sonografia, sendo que RCIU esteve presente em 43 % dos casos (RAYNOR & RICHARDS, 1997). Uma razoável porcentagem desses indivíduos nasce pequena para a idade gestacional (PIG). A RCIU está diretamente ligada à presença de gastrosquise nesses indivíduos, mas ainda não se conhece a fisiopatologia dessa relação. Levando-se em conta que inflamação observada na alça intestinal exposta é intensa e não restrita ao local, o feto acaba sendo submetido à uma reação inflamatória sistêmica. A presença de agentes pró-inflamatórios circulantes em nível acima do normal na circulação fetal pode trazer conseqüências ao crescimento fetal. Atualmente, sabe-se que o feto que sofre de RCIU está vivendo em um estado pró-inflamatório crônico. Essa situação foi definida como "Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica Fetal" e já está bem caracterizada (GOMEZ *et al.*, 1998; ERDEI *et al.,* 2003). A importância dos mediadores inflamatórios da família NF kappa-beta já está definida na literatura (BAUERLE *et al.,* 1996; BALDWIN *et al.,* 1996; BARNES *et al.,*1997). O aumento das substâncias pró-inflamatórias (interleucinas, TNF-α, NF-$\kappa\beta$) pode causar alteração das vias efetoras da insulina (GAO *et al.,* 2002).

Como se sabe, a insulina é um dos principais efetores do crescimento fetal. Seu mecanismo de ação tem sido amplamente estudado do ponto de vista molecular. O receptor de insulina (IR) ativa várias famílias de proteínas citoplasmáticas que transmitem o sinal até as vias efetoras finais. A fosforilação de resíduos de tirosina do receptor de insulina e seus substratos é um passo fundamental na transmissão do sinal insulínico intracelular. No entanto, na presença de mediadores inflamatórios, vias de sinalização que culminam com a ativação de proteínas serina quinase como a JNK e a IKK-β são capazes de atenuar as vias iniciais de sinalização insulínica após a fosforilação em serina do IR e IRSs. Estudos experimentais demonstram que a fosforilação em serina diminui em até 30 % a potência de transmissão do sinal insulínico ao longo das vias efetoras. Isso pode levar a um quadro de resistência insulínica, explicando a relação entre RCIU e estados inflamatórios crônicos (WERNER *et al.,*2004).

Comprimento Intestinal

A análise desse parâmetro demonstra que os fetos com gastrosquise realizada aos 18,5 dias de gestação apresentaram encurtamento intestinal significativo em relação aos fetos operados aos 19,5 dias (125mm x 148 mm). Em relação a seus controles, os fetos do grupo de gastrosquise mais precoce (18,5 dias) também apresentaram maior encurtamento intestinal (42% x 33% de encurtamento em relação aos controles). O encurtamento mais intenso das alças, observado no grupo precoce, não pode ser atribuído a maior edema intestinal, visto que não houve diferença significativa entre o peso do intestino dos fetos nos dois grupos com gastrosquise (18,5 e 19,5 dias). Portanto o intestino dos fetos que foram submetidos à criação de gastrosquise aos 18,5 dias de gestação é bastante mais curto de que o dos fetos de 19,5 dias, mas não mais pesado. Isso significa que a víscera deixou de crescer no momento do aparecimento do defeito abdominal.

Já está estabelecido que o crescimento intestinal não possui relação linear com o crescimento corporal fetal. Ocorre uma maior velocidade de crescimento do intestino no final da gestação, ocorrendo intensa síntese protéica para o alongamento das alças (TOULOUKIAN & SMITH, 1983). Interferências nesse período do final da gestação

acarretam encurtamento intestinal. Dessa maneira, o menor encurtamento observado para os fetos com gastrosquise aos 19,5 dias é então explicado pelo menor tempo de exposição das alças ao LA, produzindo menor inflamação e, conseqüentemente, menor espoliação protéica das alças expostas (CARROL *et al.,* 2001).

5.2- Comparação com Indivíduos Normais

Os modelos de gastrosquise experimental em ratos estão sendo estudados com mais interesse nos dias atuais, porque representam uma alternativa econômica e eficiente para o estudo da RCIU de causa fetal. A criação de curvas "normais" de peso corporal, peso intestinal e comprimento intestinal em fetos de rato *Spreague-Dowley* é fato inédito na literatura (figuras 16, 17 e 18). Esses dados, seguramente, serão muito úteis em estudos subseqüentes relacionados ao tema, pois servem de parâmetro de normalidade desse específico modelo experimental. Neste estudo, a utilização dessas curvas obtidas a partir de fetos filhos de mães não-operadas foi importante para que não se incorresse em viés estatístico. Os fetos denominados "controle" (das tríades G, C e S) não foram submetidos à gastrosquise nem tampouco tiveram seus abdomes manipulados. No entanto pode-se questionar se eles realmente seriam "normais", tendo em vista que suas mães foram submetidas a uma operação sob anestesia geral para a realização das gastrosquise em seus irmãos de ninhada. É provável que alterações hemodinâmicas da rata-mãe no decorrer da cirurgia tenham ocorrido, e isso poderia levar à alteração do fluxo sangüíneo placentário. Portanto esses indivíduos não seriam totalmente "normais". Poder-se-ia argumentar que, qualquer que fosse essa influência placentária, ela estaria atuando nos três indivíduos (G, C e S) ao mesmo tempo. Esse fato acabaria por diluir a importância desse fator teórico. No entanto, em prol de uma melhor acurácia de análise, optou-se pela criação de um novo grupo de animais filhos de mães não submetidas a quaisquer procedimentos anestésico-cirúrgicos ao longo da gestação.

Quando se compara o comportamento das curvas de Peso Corporal, Peso Intestinal e Comprimento Intestinal dos grupos de gastrosquise ao dos fetos "normais" (filhos de mães não operadas), alguns fatos chamam a atenção.

Peso Corporal

As curvas dos fetos de 18,5 dias e 19, 5 dias (figura 19) demonstram uma nítida diferença no peso em relação à curva normal, em toda a evolução gestacional. Isso confirma a hipótese de que gastrosquise induz ao RCIU. No entanto nota-se que os fetos de 18,5 dias são mais leves que os de 19,5 dias durante a maior parte da gestação, mas, no final, eles tendem a se igualar. Essa tendência ocorre não por recuperação da curva de 18,5dias, mas sim por uma redução da velocidade de ganho de peso dos animais da curva 19,5 dias no final da gestação. Isso sugere que esses animais (19,5 dias) vêm agravando o RCIU ao longo da etapa final da gestação.

Peso Intestinal

As curvas de peso intestinal de fetos com gastrosquise comparados com fetos normais (figura 20) permitem também uma interessante análise.

Todos os animais portadores de gastrosquise apresentam intestino mais pesado ao longo de toda a gestação. Os fetos submetidos à gastrosquise mais precoce (18,5 dias) apresentam intestino mais pesado ainda, apesar de essa diferença configurar apenas uma tendência estatística. Como o aumento de peso é decorrência do edema da alça, conclui-se que o edema inicia-se imediatamente após a exposição das alças ao LA e não mais se reverte ao longo da gestação.

Comprimento Intestinal

Na figura 21, referente às curvas de comprimento intestinal, nota-se que os animais submetidos à gastrosquise apresentam o intestino bastante encurtado em relação aos indivíduos normais. Os animais submetidos mais precocemente ao procedimento (18,5 dias) apresentam um encurtamento mais pronunciado durante toda a gestação. Embora o comprimento intestinal do grupo gastrosquise aos 18,5 dias aumente levemente no final da gestação, ele ainda se mantém menor que no grupo aos 19,5 dias. Os fetos do

grupo gastrosquise aos 19,5 dias apresentam uma diminuição constante do comprimento intestinal ao longo da gestação, que se denota na tendência de queda da curva. Essa queda da curva ao longo da gestação acaba por diminuir as diferenças de comprimento intestinal entre os subgrupos próximos ao termo. Esse fato sugere que a gastrosquise, seja de aparecimento mais precoce ou mais tardio, é nociva e impede o crescimento intestinal adequado. No grupo mais precoce esse efeito de encurtamento é mais acentuado, porém, no grupo mais tardio, ele tende a se agravar mais conforme evolui a idade gestacional.

Sabe-se que a velocidade de crescimento intestinal durante a gestação não é constante (TOULOUKIAN & SMITH, 1983). A curva "normal" demonstra que, no período mais inicial da gestação, a velocidade de crescimento do intestino é maior. Aparentemente, o momento de aparecimento da gastrosquise determina um maior ou menor encurtamento intestinal por interferir em pontos diferentes da curva de crescimento da víscera. A gastrosquise age, então, alterando definitivamente a programação previamente determinada do comprimento intestinal final.

A utilização de modelos experimentais identificou a importância do LA no processo inflamatório apresentado pelas alças intestinais. LANGER *et al.* (1997) discutiram sobre a possibilidade de um processo isquêmico nas alças expostas devido à compressão do intestino herniado na região do óstio da gastrosquise. No entanto, em estudos subseqüentes verificou-se que o comprometimento inflamatório intestinal não era um resultado direto da isquemia das alças, mas sim da ação de diferentes substâncias presentes no LA (ALBERT *et al.,* 2001; HAKGUDER *et al.,* 2002). Essas alterações histológicas inflamatórias observadas nos intestinos herniados são conseqüência direta da ação do LA sobre a superfície externa das alças.

Há indícios de que alterações inflamatórias ocorridas no enterócito podem interferir no controle molecular do crescimento fetal. O crescimento fetal possui mecanismos de controle e de disparo. Por exemplo, os glicocorticóides realizam uma ação inibitória sobre o crescimento somático na vida intra-uterina (FOWDEN & FORHEAD, 2004). Esses hormônios podem atuar de diversas maneiras: em nível celular, molecular e genético, e também alterando padrões de amadurecimento de eixo importantes como o hipotálamo-hipófise-adrenal. Isso pode acarretar distúrbios endocrinológicos sérios já na primeira infância (FOWDEN & FORHEAD, 2004).

Por outro lado, sabe-se que a ação do LA, quando deglutido (em contato com as vilosidades da luz), além de não ser deletéria, é benéfica para o desenvolvimento da víscera.

BLAKELOCK (a) *et al.* (1997) sugeriram que substâncias presentes no LA, tais como fatores de crescimento e hormônios, teriam relevância para o crescimento fetal, uma vez que os fetos com obstrução à passagem de conteúdos intestinais apresentavam uma maior incidência de RCIU. Os autores verificaram que os neonatos pré-termo com obstrução intestinal apresentavam menor RCIU que os neonatos a termo com o mesmo defeito. Desse modo, a deglutição do LA e sua passagem pelo intestino seriam pré-requisito para a normalidade da curva de crescimento fetal.

A repercussão do LA no desenvolvimento intestinal e no crescimento fetal foi discutida por BLOOMFIELD (a,b) *et al.* em 2002, tendo sido utilizado um modelo experimental em ovelhas. Esses autores observaram, numa fase mais tardia da gestação, a presença de diversos aminoácidos no LA, tais como glicina, serina, alanina, lisina, valina, treonina, taurina e glutamina. Além disso, também foi verificada uma captura seletiva da glutamina pelo intestino, e um aumento da mesma quando se administrava, no LA, IGF-I (*insuline-like growth factor-I*). O efeito trófico desse fator de crescimento no intestino fetal levou a uma maior captura de nutrientes luminais devido a um aumento na superfície do intestino, com um conseqüente incremento na área absortiva.

No caso dos fetos portadores de gastrosquise, é sabido que muitas das complicações pós-natais que levam a um aumento da morbidade hospitalar podem estar relacionadas ao RCIU e não à gastrosquise *per se.* Os fetos portadores desse defeito, geralmente, são submetidos ao estresse de uma ou mais cirurgias para correção do defeito. É provável que fetos mais bem desenvolvidos e com sistemas imunológico e metabólico mais maduros possam resistir melhor ao trauma endócrino-metabólico induzido pela cirurgia.

Está demonstrado nos modelos experimentais que gastrosquise leva à RCIU, e RCIU pode levar a complicações sérias no período perinatal e na infância. No entanto ainda não se dispõe de tratamento efetivo para fetos portadores de RCIU diagnosticada pela ultra-

sonografia pré-natal. Algumas propostas de tratamento estão surgindo, baseadas em observações experimentais e em avanços tecnológicos da medicina fetal.

5.3- Tratamentos propostos

Muitos fetos portadores de gastrosquise estão se desenvolvendo num ambiente de oligoâmnio. A presença do oligoâmnio está relacionada com aumento da morbidade e mortalidade perinatal (SAPIN *et al.,* 2000). Com o intuito de restaurar o volume de LA, a infusão de solução salina fisiológica na cavidade amniótica tem sido realizada em alguns serviços especializados. Nesses casos isolados, o intestino herniado demonstrou uma coloração normal e menos edema e espessamento no momento do parto, e os recém–nascidos puderam ser submetidos à cirurgia de fechamento do defeito em um único tempo cirúrgico (SAPIN *et al.,* 2000). Esses indivíduos também apresentaram uma melhor recuperação pós-anestésica, e a dieta pôde ser reintroduzida mais precocemente (LUTON *et al.,* 1999; LUTON *et al.,* 2000).

No entanto estudos experimentais em fetos de coelhos portadores de gastrosquise não demonstraram melhora na sobrevida global dos fetos submetidos à amnioinfusão, quando comparados a seus irmãos-controle (MUÑOZ *et al.,* 2002).

Mais recentemente, propostas de complementação nutricional ao feto portador de gastrosquise e RCIU têm sido advogadas, seja através da via materna, amniótica ou fetal (HARDING & CHARLTON, 1991).

Uma outra opção de tratamento para os fetos portadores de gastrosquise é a troca programada e repetida do LA no terceiro trimestre (LUTON *et al.,* 2003) Alguns grupos europeus, principalmente na França, têm oferecido esse tratamento rotineiramente. A análise do LA retirado tem servido de base para estudos dos componentes inflamatórios, enzimas digestivas e potenciais marcadores de sobrevida (ferritina, p.ex.) (BURC *et al.,* 2004). Não obstante, é preciso levar em conta os potenciais riscos do procedimento para mãe e feto e compará-los aos potenciais benefícios após o nascimento.

Em tese, uma outra tentativa de minimizar a lesão inflamatória induzida pelo LA no intestino exposto seria a administração de agentes antiinflamatórios no período gestacional. Teoricamente, os inibidores seletivos da ciclooxigenase e os glicocorticóides poderiam ter efeito benéfico na diminuição da atividade inflamatória no enterócito. No entanto o uso dessas drogas com intuito de inibir o trabalho de parto prematuro tem demonstrado que podem acontecer alterações sérias de diminuição do fluxo renal e fechamento do ducto arterioso. Altas doses de glicocorticóides no terceiro trimestre também estão associadas a RCIU (OSTENSEN & SKOMSVOLL, 2004). Portanto há que se avaliar os riscos dessas terapias em relação às possíveis vantagens e potenciais riscos para mãe e feto.

Neste estudo, a presença de gastrosquise *per se* resultou em fetos com menor peso corporal, independentemente do tempo de exposição das alças ao LA. A realização da gastrosquise aos 19,5 dias de gestação não resultou numa diferença de peso corporal em relação aos fetos cuja gastrosquise foi criada no dia anterior e que tiveram, portanto, um maior tempo de exposição ao LA.

Atualmente, não há consenso sobre a necessidade de antecipação do parto na gastrosquise com o intuito de diminuir o processo inflamatório das alças decorrente da exposição ao LA (DUNN *et al.,* 1999; HUANG *et al.,* 2002). Embora existam autores que, baseados em séries da literatura, advogam a não-indução do parto, mesmo na presença de RCIU (PULIGANDLA *et al.,* 2004), os nossos resultados experimentais são informações que reforçam a idéia de que a antecipação do parto permite um menor encurtamento intestinal para os fetos portadores de gastrosquise, o que pode influir positivamente na taxa de complicações neonatais, com conseqüente diminuição dos custos do tratamento.

6- CONCLUSÃO

Utilizando um modelo experimental de gastrosquise em ratos *Spreague-Dowley* em duas diferentes idades gestacionais, concluiu-se que:

- os fetos portadores desse defeito apresentaram peso corporal menor, peso intestinal maior e comprimento intestinal menor quando comparados com fetos controle e *sham*, independentemente da idade gestacional do aparecimento da gastrosquise;

- o maior tempo de exposição ao LA causou maior encurtamento intestinal (42% aos 18,5 dias x 33% aos 19,5 dias);

- a presença de gastrosquise levou primariamente ao aparecimento de RCIU que, por sua vez, não apresentou relação com o tempo de exposição das alças ao LA.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVICH, D.R.; GARDEN, A.; JANDIAL, L; PAGE, K.R. Fetal swallowing and voiding in relation to hydramnios. **Obstet Gynecol,** 54(1):15-20, 1979.

ABUHAMAD, A.Z.; MARI, G.; CORTINA, R.M.; CROITORU, D.P.; EVANS, A.T. Superior mesenteric artery Doppler velocimetry and ultrasonographic assessment of fetal bowel in gastroschisis: a prospective longitudinal study. **Am J Obstet Gynecol,** 176:985-90, 1997.

ADRA, A.M.; LANDY, H.J.; HAHMIAS, J.; GOMEZ-MARIN, O. The fetus with gastroschisis: impact of route of delivery and prenatal ultrasonography. **Am J Obstet Gynecol,** 174:540-6, 1996.

AKTUG, T.; UCAN, B.; OLGUNER, M.; AKGUR, F.M.; OZER, E.; CALISKAN, S.; ONVURAL, B. Amnio-allantoic fluid exchange for the prevention of intestinal damage in gastroschisis. III: Determination of the waste products removed by exchange. **Eur J Pediatr Surg,** 8:326-8, 1998.

ALBERT, A.; JULIA, V.; MORALES, L.; ROVIRA, J.; SANCHO, A.; BOMBI, J.A. Role of amniotic fluid in gastroschisis: an experimental study. **Cir Pediatr**, Jan, 5(1):12-6, 1992.

ALBERT, A.; SANCHO, M.A.; JULIA, V.; DIAZ, F.; BOMBI, J.A.; MORALES, L. Intestinal damage in gastroschisis in independent of the size of the abdominal defect. **Pediatr Surg Int,** 17(2-3):116-19, 2001.

AMOURY, R.A.; BEATTY, E.C.; WOOD, W.G.; HOLDER, T.M.; ASHCRAFT, K.W.; SHARP, R.J.; MURPHY, J.P. Histology of the intestine in human gastroschisis-relationship to intestinal malfunction: dissolution of the "peel" and its ultrastructural characteristics. **J Pediatr Surg,** 23:950-6, 1988.

ANTEBY, E.Y.; STERNHELL, K.; DICKE, J.M. The fetus with gastroschisis managed by a trial of labor: antepartum and intrapartum complications. **J Perinatol,** Oct-Nov, 19(7):521-4, 1999.

AOKI, Y.; OHSHIO, T.; KOMI, N. An experimental study on gastroschisis using fetal surgery. **J Pediatr Surg,** 15:252-6, 1980.

API, A.; OLGUNER, M.; HAKGUDER, G.; ATES; OZER, E.; AKGUR, F.M. Intestinal damage in gastroschisis correlates with the concentration of intraamniotic meconium. **J Pediatr Surg,** 36:181, 2001.

BAEUERLE, P.A.; BALTIMORE, D. NF-KB: ten years after. **Cell,** 87:12-20, 1996.

BALDWIN, A.S. The NF-Kappa -B and I Kappa -B proteins: new discoveries and insight. **Annu Rev Immunol,** 14:649-683, 1996.

BARNES, P.J. & KARIN, M. Nuclear factor K-B -A pivotal role in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med,** 336:1066-1071, 1997.

BARREIRO,G.C.; PRATTALI, R.R.; CALISEO, C.T.; FUGIWARA, F.Y.; UENO, M.; PRADA, P.O.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.S.; CARVALHEIRA, J.B.C. Aspirin inhibits serine phosphorylation of IRS-1 in muscle and adipose tissue of septic rats. **BBRC** [In press] received 28 May 2004.

BLAKELOCK, R.T.; HARDING, J.E.; KOLBE, A.; PEASE, P.W. Gastroschisis: can the morbidity be avoided? **Pediatr Surg Int,** 12:276-82, 1997 (a).

BLAKELOCK, R.T.; UPHADHYAY, V.; PEASE, P.W.B.; HARDING, J.E. Are babies with gastroschisis small for gestational age? **Pediatr Surg Int,** 12: 580-82, 1997 (b).

BLOOMFIELD, F.H.; BREIER, B.H.; HARDING, J.E. Fate of (125)I-IGF-I administered into the amniotic fluid of late gestation fetal sheep. **Pedriatr Res,** 51(3):361-369, 2002 (a).

BLOOMFIELD, F.H.; ZIJL, P.L.; BAUER, M.K.; HARDING, J.E. A chronic low dose infusion of insulin-like growth factor I alters placental function but does not affect fetal growth. **Reprod Fertil Dev,** 26,14(7-8):3393-400,2002 (b).

BÖLKE, E.; JEHELE, P.M.; TRAUTMANN, M.; GÖTZ, I.; KREBS, B.; STEINBACH, G.; ORTH, K. Different acute-phase response in newborns and infants undergoing surgery. **Ped Research,** 51(3):333-38, 2002.

BRIZOT, M.L.; PEDREIRA, D.A.L.; ZUGAIB, M. Malformações da parede abdominal. In: ZUGAIB, M. **Medicina Fetal.** 2. ed. São Paulo, SP. Ed. Atheneu, 1999,p.245-58.

BURC, L.; VOLUMENIE, J.L.; deLAGAUSIE, P.; GUIBOURDENCHE, J.; OURY, J.F.; VUILLARD, E.; SIBONY, O.; BLOT, P.; SAIZOU, C.; LUTON, D. Amniotic fluid inflammatory proteins and digestive compounds profile in fetuses with gastroschisis undergoing amnioexchange. **BJOG**, 111(4):292-7, 2004.

CANTY, T.G. & COLLINS, D.L. Primary fascial closure in infants with gastroschisis and omphalocele: a superior approach. **J Pediatr Surg,** 18: 707-12, 1983.

CARROLL, S.G.; KUO, P.Y.; KYLE, P.M.; SOOTHILL, P.W. Fetal protein loss in gastroschisis as an explanation of associated morbidity. **Am J Obstet Gynecol,** May, 186(6):1297-301, 2001.

CARVALHEIRA, J.B.; RIBEIRO, E.B.; TELLES, M.M.; VELLOSO, L.A.; GONTIJO, J.A.; SAAD, M.J. Characterization of seletive insulin resistance to insulin signaling in the hypotalamus of obese Zucker rats'. **Diabetes,** (51), A41, 2002.

CAUFRIEZ, A.; FRANKENNE, F.; HENNEN, G.; COPINSCHI, G. Regulation of maternal insulin-like growth factor I by placental growth hormone in pregnancy. Possible action of maternal IGF-I on fetal growth. **Horm Res,** 42 (1-2):62-5, 1994.

CONOVER, W. J. **Practical Nonparametric Statistics**. New York: Ed. John Wiley & Sons, 1971.

CORREIA-PINTO, J.; TAVARES, M.L.; BAPTISTA, M.J.; ESTEVÃO-COSTA, J.; FLAKE, A.W.; LEITE-MOREIRA, A.F. A new fetal rat model of gatroschisis: development and early characterization. **J Pediatr Surg,** 36:213-6, 2001.

CRAWFORD, R.A.; RYAN, G; WRIGUT, V.M.; RODECK, C.H. The importance of serial biophysical assessment of fetal wellbeing in gastroschisis. **Br J Obstet Gynaecol,** (99):899-902, 1992.

CURRY, J.I.; McKINNEY, P.; THORNTON, J.G.; STRINGER, M.D. The aetiology of gastroschisis. **Br J Obstet Gynaecol,** 107(11):1339-46, 2000.

de VRIES, P.A. The pathogenesis of gastroschisis and omphalocele. **J Pediatr Surg,** 15:245-51, 1980.

DEANS, K.J.; MOONEY, D.P.; MEYER, M.M.; SHORTER, N.A. Prolonged intestinal exposure to amniotic fluid does not result in peel formation in gastroschisis. **J Pediatr Surg,** (34):975-76, 1999.

DENLEY, A.; BONYTHON, E.R.; BOOKER, G.W.; COSGROVE, L.J.; FORBES, B.E.; WARD, C.W.; WALLACE, J.C. Structural determinants for high affinity binding of IGF-II to IR-A, the exon 11 -minus isoform of the insulin receptor. **Mol Endocrinol,** Jun 17 [In press], 2004.

DILSIZ, A.; GUNDOGAN, A.H.; AKTAN, M.; DUMAN, S.; AKTUG, T. Nitric oxide synthase inhibition prevents intestinal damage in gastroschisis: a morphological evaluation in chick embryos. **J Pediatr Surg,** 34:1248-52, 1999.

DRIVER, C.P.; BRUCE, J.; BIANCHI, A.; DOIG, C.M.; DICKSON, A.P.; BOWEN, J. The contemporary outcome of gastroschisis. **J Pediatr Surg,** 35:1719-23, 2000.

DUHAMEL, B. Embryology of the exomphalos and allied malformations. **Arch Dis Child,** (38):142-47, 1963.

DUNN, J.C.; FONKALSRUD, E.W.; ATKINSON, J.B. The influence of gestational age and mode of delivery on infants with gastroschisis. **J Pediatr Surg,** (34):1393-95, 1999.

ERDEI, G.; TOTH, P.; VASARHELYI, B. New clinical entity in perinatology: fetal inflammatory response syndrome. **Orv. Hetil**, August 3;144(31):1515-9, 2003.

FITZSIMMONS, J; CHINN, A.; SHEPARD, T.H. Normal length of the human fetal gastrointestinal tract. **Pediatr Pathol,** 8(6):633-41,1988.

FLEET, M.S. & DE LA HUNT, M.N. Intestinal atresia with gastroschisis: a selective approach to management. **J Pediatr Surg,** 35:1323-5, 2000.

FOWDEN, A.L. & FOREHEAD, A.J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. **Reproduction,** 127(5): 516-26,2004.

FRIES, M.H.; FILLY, R.A.; CALLEN, P.W.; GOLDSTEIN, R.B.; GOLDBERG, J.D.; GOLBUS, M.S. Growth retardation in prenatally diagnosed cases of gastroschisis. **J Ultrasound Med,** 12(10):583-88,1993.

GAO, Z.; HWANG, D.; BATAILLE, F.; LEVEFRE, M.; YORK, D.; QUON, M.J.; YE, J. Serine phosphorilation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa β kinase complex. **Biol Chem,** Dec 13, 277(50):48115-21, Epub 2002, Sep 25.

GARCIA, H.; FRANCO-GUTIERREZ, M.; CHAVEZ-AGUILLAR, R.; VILLEGAS-SILVA, R.; XEQUE-ALAMILLA, J. Morbidity and mortality in newborns with omphalocele and gastroschisis – anterior abdominal wall defects. **Gac Med Mex,** 138(6):519-26, 2002.

GLICK, P.L.; HARRISON, M.R.; ADZICK, N.S.; FILLY, R.A.; DELORIMIER, A.A.; CALLEN, P.W. The missing link in the pathogenesis of gastroschisis. **J Pediatr Surg,** 20:406-09, 1985.

GLUCKMAN, P.D.; LIGGINS, G.C. Regulation of fetal growth. In: BEARD, R.C. & NATHANIELSZ, P.W. **Fetal Physiology and Medicine.** New York: Ed. Marcel Dekker Inc- Butterworths, 1984, pp 511-57.

GOMEZ, R.; ROMERO, R.; GHEZZI, F.; YOON, B.H.; MAZOR, M.L.; BERRY, S.M. The fetal inflammatory response syndrome. **Am J Obstet Gynecol,** 179:194-02, 1998.

GRAY, S.W. & SKANDALAKIS, J.E. **Embriology for Surgeons**. Philadelphia: Ed. W.B. Saunders Co. , 1972, p.387-41.

HAKGUDER, G.; ATES, O.; OLGUNER, M.; RIZA-SISMAN, A.; AKGUR, F.M. Is induction of fetal diuresis with intraamniotic furosemide effective for the removal of intestinal waste products from amniotic fluid? **Eur J Pediatr Surg,** 12(5):293-98, 2002.

HARDING, J.E. & CHARLTON, V. Experimental nutritional supplementation for intrauterine growth retardation. In: HARRISON, M.R.; GOLBUS, M.S.; FILLY, R.A. **The unborn patient.** Philadelphia: Ed. WB Saunders Co., 1991, p. 598-613.

HAUSLER, M.C.; FASCHING, G.; ZOTTER, H.; FECHTER, M.; MAYR, J.; BERGHOLD, A. Effect of the mode of delivery on the newborn infant with gastroschisis. With data from the Styrian Malformation Register. **Gynakol Geburtshilfliche Rundsch,** 37(1):25-9, 1997.

HAUSTEIN, K.O. Cigarette smoking, nicotine and pregnancy. **Int J Clin Pharmacol Ther,** 37:417-27, 1999.

HOYME, H.E.; HIGGINBOTON, M.C.; JONES, K.L. The vascular pathogenesis of gastroschisis: intrauterine interruption of omphalomesenteric artery. **J Pediatr,** 98:228-31, 1981.

HUANG, J.; KURKCHUBASCHE, A.G.; CARR, S.R.; WESSELHOEFT, C.W.J.; TRACY, T.F.J.; LUKS, F.L. Benefits of term delivery in infants with antenatally diagnosed gastroschisis. **Obstet Gynecol,** 100(4):695-99, 2002.

HUME, R.F., JR.; MARTIN, L.S.; BOTTOMS, S.F.; HASSAN, S.S.; BANKER-COLLINS, K.; TOMLINSON, M.; JOHNSON, M.P.; EVANS, M.I. Vascular disruptions birth defects and history of prenatal cocaine exposure: a case control study. **Fetal Diagn Ther,** 12:292-95, 1997.

JAPARAJ, R.P.; HOCKEY, R.; CHAN, F.Y. Gastroschisis: can prenatal sonography predict neonatal outcome? **Ulttrasound Obstet Gynecol,** 21(4):329-33, 2003.

KING, C.R. & LOVRIEN, E.W. Chorangioma of the placenta and intrauterine growth failure. **J Pediatr,** (93):1027-8, 1978.

KING, J. & ASKIN, D.F. Gastroschisis: etiology, diagnosis, delivery options and care. **Neonatal Netw,** 22(4):7-12, 2003.

LANGER, J.C. & BRAMLETT, G. Effect of prokinetic agents on ileal contractility in rabbit model of gastroschisis. **J Pediatr Surg,** 32(4):605-8,1997.

LANGER, J.C.; BELL, J.G.; CASTILLO, R.O.; CROMBLEHOLME, T.M.; LONGAKER, M.T.; DUNCAN, B.W.; BRADLEY, S.M.; FINKBEINER, W.E.; VERRIER, E.D.; HARRISON, M.R. Etiology of intestinal damage in gastroschisis, II. Timing and reversibility of histological changes, mucosal function, and contractility. **J Pediatr Surg,** 35:1122-6, 1990.

LANGER, J.C.; LONGAKER, M.T.; CROMBLEHOLME, T.M.; BOND, S.J.; FINKBEINER, W.E.; RUDOLPH, C.A.; VERRIER, E.D.; HARRISON, M.R. Etiology of intestinal damage in gastroschisis I: effects of amniotic fluid exposure and bowel constriction in a fetal lamb model. **J Pediatr Surg,** 24:992-7, 1989.

LEMONS, J.A.; RIDENOUR, R.; ORSINI, E.N. Congenital absence of the pancreas and uterine growth retardation. **Pediatrics**, (64):255-57, 1979

LOPEZ de TORRE, B.; TOVAR, J.A.; URIARTE, S; ALDAZABAL, P. The nutrition of the fetus with intestinal atresia: studies in the chick embryo model. **J Pediatr Surg**, 27(10):1325-28, 1992.

LUTON D, deLAGAUSIE P, GUIBOURDENCHE J, OURY JF, SIBONY O, VUILLARD E, BOISSSINOT C, AIGRAIN Y, BEAUFILS F, NAVARRO J, BLOT P. Effect of amnioinfusion on the outcome of prenatally diagnosed gastroschisis. **Fetal Diagn Ther,** 14(3):152-5, 1999.

LUTON D, GUIBOURDENCHE J, VUILLARD E, BRUNER J, deLAGAUSIE P. Prenatal management of gastroschisis: the place of amnioexchange procedure. **Clin Perinatol,** 30(3):551-72, VIII, 2003.

LUTON, D.; deLAGAUSIE, P.; GUIBOURDENCHE, J.; PEUCHMAUR, M.; SIBONY, O.; ALGRAIN, Y.; OURY, J.F.; CLOT, P. Influence of amnioinfusion in a model of in utero created gastroschisis in the pregnant ewe. **Fetal Diagn Ther,** 15:224-8, 2000.

MA, Y.; TOTH, B.; KEETON, A.B.; HOLLAND, L.T.; CHAUDRY, I.H.; MESSINA, J.L. Mechanisms of hemorrhage-induced hepatic insulin resistance: role of TNF-alpha. **Endocrinology,** Aug 5 [Epub ahead of print], 2004.

MATHIAS, L. O sistema amniótico. In: **Obstetrícia Básica**- Bussâmara Neme. 2. ed. São Paulo, SP: Ed Sarvier, 2000, vol.1, p.33-37.

MILLIKEN, G.A. & JOHNSON, D.E. **Analysis of Messy Data. Volume I: Designed Experiments.** New York: Ed. Van Nostrand Reinhold Company, 1984.

MONTGOMERY- DOUGLAS, C. **Design and Analysis of Experiments.** New York: Ed. John Wiley & Sons, 1991.

MOORE, T.C. & STROKES, G.E. Gastroschisis and omphalocele: clinical differences. **Surgery,** 33:112-20, 1953.

MOORE, T.C.; COLLINS, D.L.; CATANZARITE, V.; HATCH, E.I.; Jr. Preterm and particularly pre-labor cesarean section to avoid complications of gastroschisis. **Pediatr Surg Int,** 15:97-104, 1999.

MORETTI, M.; KHOURY, A; RODRIGUEZ, J.; LOBE, T.; SHAVER, D.; SIBAI, B. The effect of mode of delivery on the perinatal outcome in fetuses with abdominal wall defects. **Am J Obstet Gynecol,** (163):833-38, 1990.

MORRISON, J.J.; KLEIN, N.; CHITTY, L.S.; KOCJAN, G.; WALSHE, D.; GOULDING, M.; GEARY, M.P.; PIERRO, A.; RODECK, C.H. Intra-amniotic inflammation in human gastroschisis: possible aetiology of postnatal bowel disfunction. **Br J Obstet Gynaecol,** 105(11):1200-4, 1998.

MULVIHILL S.J.; STONE, M.M.; DEBAS, H.T.; FONKALSRUD, E.W. The role of amniotic fluid in fetal nutrition. **J Pediatr Surg,** 20(6):668-72, 1985.

MUÑOZ, M.E.; ALBERT, A.; JULIA, V.; SANCHO, M.A.; GRANDE, C.; MARTINEZ, A.; MORALES, L. Morphologic study of the intestine in an experimental model of amnioinfusion in fetal rabbits with gastroschisis. **Cir Pediatr,** 15(4):158-151, 2002.

NOGUEIRA, K.C.; LIBERMAN, B.; PIMENTEL-FILHO, F.R. Secreção de hormônio de crescimento nas diversas fases da vida: intra-uterina, recém-nascido, infância, adulto e evelhecdimento. In: LIBERMAN, B. & CUKIERT, A. **Fisiologia e Fisiopatologia do Hormônio de Crescimento.** 1.ed. São Paulo, SP: Ed Lemos, 2004, p.18-39.

OGILVY-STUART, A.L.; HANDS, S.J.; ADCOCK, C.J.; HOLLY, J.M.P.; MATTHEWS, D.R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J.S.; WILKINSON, A.R.; DUNGER, D.B. Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I) IGF-binding-protein-1, growth hormone, and feeding in the newborn. **J Clin Endocrinol Metab,** 83(10):3550-7, 1998.

OLDHAM, K.T.; CORAN, A.G.; DRONGOWSKI, R.A.; BAKER, P.J.; WESLEY, J.R.; POLLEY, T.Z. JR. The development of necrotizing enterocolitis following repair of gastroschisis: a surprisingly high incidence. **J Pediatr Surg,** 23:945-9, 1988.

OSTENSEN, M.E. & SKOMSVOLL, J.F. Anti-inflammatory pharmacotherapy during pregnancy. **Expert Opin Pharmacother,** Mar, 5(3):571-80, 2004.

PEDERSON, J. Weight and length at birth of infants of diabetic mothers. **Acta Endocrinol,** (16):330-41, 1954.

PHILLIPS, J.D.; KELLY, R.E. JR.; FONKALSRUD, E.W.; MIRZAYAN, A.; KIM, C.S. An improved model of experimental gastroschisis in fetal rabbits. **J Pediatr Surg,** 26:784-7, 1991.

PULIGANDLA, P.S.; JANVIER, A.; FLAGEOLE, H.; BOUCHARD, S.; MOK, E.; LABERGE, J.M. The significance of intrauterine growth restriction is different from prematurity for the outcome of infants with gastroschisis. **J Pediatr Surg,** 39(8): 1200-4, 2004.

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

RAYNOR; B.D. & RICHARDS, D. Growth retardation in fetuses with gastroschisis. **J Ultrasound Med,** Jan (16):13-6,1997.

RINEHART, B.K.; TERRONE, D.A.; ISLER, C.M.; LARMON, J.E.; PERRY, K.G., JR.; ROBERTS, W.E. Modern obstetric management and outcome of infants with gastroschisis. **Obstet Gynecol,** 94:112-16, 1999.

ROBINSON, J.S.; KINGSTON, E.J.; JONES, C.T.; THORBURN, G.D. Studies on experimental growth retardation in sheep. The effect of removal of endometrial caruncles on fetal size metabolism. **J Dev Physiol,** (1):379-98, 1979.

SAAD, M.J.; ARAKI, E.; MIRALPEIX, M.; ROTHENBERG, P.L.; WHITE, M.F.; KAHN, C.R. Regulation of insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. **J Clin Invest,** (90)1839-49, 1992.

SALIHU, EMUSU, D.; H.M.; ALIYU, Z.Y.; PIERRE-LOUIS, B.J.; DRUSCHEL, C.M.; KIRBY, R.S. Mode of delivery and nenoatal survival of infants with isolated gastroschisis. **Obstet Gynecol,** 104(4):678-83, 2004 (a).

SALIHU, H.M.; ALIYU, Z.Y.; PIERRE-LOUIS, B.J.; OBUSEH, F.A.; DRUSCHEL, C.M.; KIRBY, R.S. Omphalocele and gastroschisis: Black-white disparity in infant survival. **Birth Defects Res ,** 70(9):586-91, 2004 (b).

SAPIN, E.; MAHIEU, D.; BORGNON, J.; DOUVIER, S.; CARRICABURU, E.; SAGOT, P. Transabdominal amnioinfusion to avoid fetal demise and intestinal damage in fetuses with gastroschisis and severe oligohydramnios. **Pedriatr Surg,** 35(4):598-600,2000.

SAUTER, E.R.; FALTERMAN, K.W.; ARENSMAN, R.M. Is primary repair of gastroschisis and omphalocele always the best operation? **Am Surg,** 57:142-4, 1991.

SCHUSTER, S. A new method for the staged repair of the large omphaloceles. **Surg Gynecol Obstet,** 125:837-50, 1967.

SEEDS, A. E. Current concepts of amniotic fluid dynamics. **Am J Obstet Gynecol,** 138:575, 1980.

SHANKLIN, D.R. Anatomy of the placenta. In: Faulkner, F. & Tanner, J.M. **Human growth**. New York: Ed Plenum, 1978, vol. 1, p 323-53.

SHANKLIN, D.R.; COOKE, R.J.; Effects of intrauterine growth on intestinal length in the human fetus. **Biol Neonate,** 644:76-81, 1993.

SHAW, K.; BUCHMILLER, T.L.; CURR, M.; LANN, M.M.; HABIB, R.; CHOPOURIAN, H.L.; DIAMOND, J.M.; FONKALSRUD, E.W. Impairment of nutrient uptake in a rabbit model of gastroschisis. **J Pediatr Surg,** 29(3):376-78, 1994.

SHEPHERD, P.R.; NAVE, B.T.; O'RAHILLY, S. The role of phosphoinositide 3-kinase in insulin signalling.**J Mol Endocrinol,** 17(3):175-84, 1996.

SIMMONS, M. & GEORGESON, K.E. The effect of gestational age at birth on morbidity in patients with gastroschisis. **J Pediatr Surg,** (31):1060-1; discussion 1062, 1996.

SINGH, J. Gastroschisis is caused by the combination of carbon monoxide and protein-zinc deficiences in mices. **Birth Defects Res ,** 68(4):355-62, 2003.

SNYDER, C.L. Outcome analysis for gastroschisis. **J Pediatr Surg,** 34:1253-56, 1999.

SPAGNOLI, A. & ROSENFELD, R.G. The mechanisms by which growth hormone brings about growth. The relative contributions of growth hormone and insulin-like growth factors. **Endocrinol Metab Clin North Am,** 25(3):615-31, 1996.

SRINATHAN, S.K.; LANGER, J.C.; BLENNERHASSETT, M.G.; HARRISON, M.R.; PELLETIER, G.J.; LAGUNOFF, D. Etiology of intestinal damage in gastroschisis III: Morphometric analysis of the smooth muscle and submucosa. **J Pediatr Surg,** 30:379-83, 1995.

STEIN, N.R.; ZANDONA, D.; CALCAGNOTTO, H.; COSTA E; SANTOS, R.Q.; LEITE, J.C. Fatores de risco para gastrosquise: revisão da literatura. **Femina**, (32): 211-17, 2004.

STRINGER, M.D.; BRERETON, R.J.; WRIGHT, V.M. Controversies in the management of gastroschisis: a study of 40 patients. **Arch Dis Child,** (66):34-6, 1991.

SUITA, S.; OKAMATSU, T.; YAMAMOTO, T.; HANDA, N.; NIRASAWA, Y,; WATANABE, Y.; YANAGIHARA, J.; NISHIJIMA, E.; HIROBE, S.; NIO, M.; GOMI, A.; HORISAWA, M. Changing profile of abdominal wall defects in Japan: results of a national survey. **J Pediatr Surg,** 35:66-71, 2000.

SYDORAK, R.M.; NIJAGAL, A.; SBRAGIA, L.; HIROSE, S.; TSAO, K.; PHIBBS, R.H.; SCHMITT, S.K.; LEE, H.; FARMER, D.L.; HARRISON, M.R.; ALBANESE, C.T. Gastroschisis: small hole, big cost. **J Pediatr Surg,** Dec, 37(12):1669-72, 2002.

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

TOTH, P.P. & KIMURA, K. Left-sided gastroschisis. **J Pediatr,** 28:1543-44, 1993.

TOULOUKIAN, R.J. & SMITH, G.J. Normal intestinal length in pre -term infants. **J Pediatr Surg,**18(6):720-23,1983.

VANNUCCHI, M.G.; MIDRIO, P.; FLAKE, A.W.; FAUSSONE-PELLEGRINI. Neuronal differentiation and myoenteric plexus organization are delayed in gastroschisis: an immunohistochemical study in a rat model. **Neurosci Lett,** 339:77-81, 2003.

VELLOSO, L.A.; CARVALHO, C.R.; ROJAS, F.A.; FOLLI, F.; SAAD, M.J. Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrate –2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK2 related pathway. **Cardiovasc Res,** 40(1):96-102, 1998.

VILELA, P.C.; RAMOS DE AMORIM, M.M.; FALBO, G.H. , SANTOS, L.C. Risk factors for adverse outcome of newborns with gastroschisis in a Brazilian hospital. **J Pediatr Surg,** 36(4):559-64, 2001.

WERNER E.D.; LEE, J.; HANSEN, L.; YUAN, M.; SHOELSON, S.E. Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. **J Biol Chem**, 279(34):35298-305, 2004.

8- BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES

1. HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. BIREME, São Paulo, 1991. 45p.

2. Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Ed. SAD - OF. CIR/ PRPG/06/95 - Normas ABNT. 1995. 8p. (alterado 2002)

9- ANEXOS

Anexo 1- Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g), Comprimento Intestinal (CI) (mm), Relação Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC) (%), Relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/PC) (mg/mm) e a diferença entre Peso Corporal e Peso Intestinal (PC - PI) (g) de fetos de ratos submetidos à Gastrosquise (G), Controle (C) e Sham (S) com 18,5 dias de idade gestacional.

Feto	TRÍADE	PC	PI	CI	PI/PC	PI/CI	PC - PI
1	G	5,7968	0,3111	163	5	190	5,4857
2	C	5,4203	0,2164	213	4	101	5,2039
3	S	5,7049	0,2065	156	3	132	5,4984
4	G	5,8624	0,3091	168	5	183	5,5533
5	C	5,3481	0,2308	194	4	118	5,1173
6	S	6,1254	0,2295	204	3	112	5,8959
7	G	5,3309	0,2433	125	4	194	5,0876
8	C	5,8616	0,2118	195	3	108	5,6498
9	S	6,0059	0,2103	196	3	107	5,7956
10	G	5,7760	0,2356	162	4	145	5,5404
11	C	5,1655	0,1962	225	4	87	4,9693
12	S	5,9686	0,1991	213	3	93	5,7695
13	G	4,3320	0,2441	125	5	195	4,0879
14	C	4,5276	0,2077	225	4	92	4,3199
15	S	4,6912	0,1947	202	4	96	4,4965
16	G	3,8514	0,2632	95	7	277	3,5882
17	C	4,6636	0,1864	196	4	95	4,4772
18	S	5,4052	0,2068	193	4	107	5,1984
19	G	4,4347	0,2573	153	6	168	4,1774
20	C	4,3496	0,1835	220	4	83	4,1661
21	S	4,8361	0,1864	225	4	82	4,6497

22	G	5,3678	0,2844	125	5	227	5,0834
23	C	5,5143	0,2250	203	4	110	5,2893
24	S	6,3062	0,2210	208	3	106	6,0852
25	G	5,0854	0,2142	80	4	267	4,8712
26	C	6,2966	0,2669	240	4	111	6,0297
27	S	6,1401	0,1865	210	3	88	5,9536
28	G	5,0062	0,3553	130	7	273	4,6509
29	C	6,3938	0,3429	210	5	163	6,0509
30	S	6,1811	0,2434	212	4	114	5,9377
31	G	5,8713	0,3875	130	6	298	5,4838
32	C	6,0428	0,3537	210	6	168	5,6891
33	S	5,9764	0,2478	197	4	125	5,7286
34	G	6,0251	0,2335	95	4	245	5,7916
35	C	5,9647	0,2184	225	3	97	5,7463
36	S	6,0054	0,2638	230	4	114	5,7416
37	G	6,1665	0,3126	111	5	281	5,8539
38	C	5,8584	0,2487	245	4	101	5,6097
39	S	6,7547	0,3336	225	5	148	6,4211
40	G	3,8924	0,1899	155	5	122	3,7025
41	C	6,1179	0,2682	238	4	112	5,8497
42	S	5,1068	0,2645	195	5	135	4,8423
43	G	5,7068	0,3515	130	6	270	5,3553
44	C	5,9248	0,2374	202	4	117	5,6874
45	S	6,4602	0,2358	221	3	106	6,2244
46	G	4,5071	0,2495	82	5	304	4,2576
47	C	6,1057	0,2326	224	4	103	5,8731
48	S	6,1627	0,2370	218	4	108	5,9257

49	G	5,7863	0,3194	111	5	287	5,4669
50	C	6,0311	0,2304	205	4	112	5,8007
51	S	5,7981	0,2376	232	4	102	5,5605
52	G	6,2943	0,3172	150	5	211	5,9771
53	C	6,3008	0,2464	201	4	122	6,0544
54	S	5,6243	0,2168	206	4	105	5,4075
55	G	6,0053	0,2910	118	5	246	5,7143
56	C	6,4223	0,2588	223	4	116	6,1635
57	S	6,3236	0,2318	223	3	103	6,0918
58	G	5,2040	0,2898	96	5	301	4,9142
59	C	5,3636	0,2038	217	4	93	5,1598
60	S	5,5800	0,2612	214	4	122	5,3188

Anexo 2- Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g), Comprimento Intestinal (CI) (mm), Relação Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC) (%), Relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/PC) (mg/mm) e a diferença entre Peso Corporal e Peso Intestinal (PC - PI) (g) de fetos de ratos submetidos à Gastrosquise (G), Controle (C) e Sham (S) com 19,5 dias de idade gestacional.

Feto	TRÍADE	PC	PI	CI	PI/PC	PI/CI	PC - PI
1	G	4,1894	0,1795	135	4	133	4,0099
2	C	5,0793	0,2084	200	4	104	4,8709
3	S	5,0458	0,2178	210	4	103	4,8280
4	G	4,3073	0,2616	110	6	2,7	4,0457
5	C	5,6088	0,2312	220	4	105	5,3776
6	S	5,1298	0,2298	223	4	103	4,9000
7	G	4,3414	0,2310	130	5	177	4,1104
8	C	4,6740	0,1673	167	3	100	4,5067
9	S	4,3715	0,1555	193	3	80	4,2160
10	G	4,3894	0,2029	165	4	123	4,1865
11	C	5,1250	0,2155	223	4	96	4,9095
12	S	4,9884	0,2093	216	4	97	4,7791
13	G	5,5460	0,2851	175	5	162	5,2609
14	C	5,9765	0,2320	226	4	102	5,7445
15	S	5,7763	0,2534	225	4	112	5,5229
16	G	5,1346	0,2425	160	5	151	4,8921
17	C	5,8155	0,2791	257	5	108	5,5364
18	S	5,3347	0,2307	234	4	98	5,1040
19	G	5,1421	0,3304	140	6	236	4,8117
20	C	5,2675	0,2343	250	4	93	5,0332

21	S	5,2730	0,2082	251	4	83	5,0648
22	G	5,5440	0,4212	140	7	300	5,1228
23	C	5,7106	0,2200	226	4	97	5,4906
24	S	5,5960	0,2446	246	4	99	5,3514
25	G	4,7938	0,0812	80	2	101	4,7126
26	C	5,6382	0,2542	240	4	105	5,3840
27	S	5,5548	0,2341	224	4	104	5,3207
28	G	5,6498	0,2586	178	4	145	5,3912
29	C	5,6619	0,2254	214	4	105	5,4365
30	S	5,5728	0,2382	216	4	110	5,3346
31	G	5,6562	0,2322	177	4	131	5,4240
32	C	5,6812	0,2270	221	4	102	5,4542
33	S	5,3006	0,1911	220	3	86	5,1095
34	G	4,9944	0,2089	181	4	115	4,7855
35	C	6,6736	0,2306	246	3	93	6,4430
36	S	5,7901	0,2295	227	4	101	5,5606
37	G	5,5097	0,3827	95	7	402	5,1270
38	C	6,0774	0,2392	210	4	113	5,8382
39	S	7,2410	0,2830	261	4	108	6,9580
40	G	5,7212	0,2488	184	4	135	5,4724
41	C	6,3514	0,2588	267	4	96	6,0926
42	S	6,6966	0,2704	263	4	102	6,4262
43	G	6,5997	0,3067	148	4	207	6,2930
44	C	6,0212	0,2379	231	4	102	5,7833
45	S	5,9577	0,2627	268	4	98	5,6950
46	G	6,1255	0,3146	193	5	163	5,8109
47	C	6,4358	0,2467	246	4	100	6,1891

48	S	5,9094	0,2351	233	4	100	5,6743
49	G	6,4421	0,2935	153	4	191	6,1486
50	C	6,8874	0,2657	194	4	136	6,6217
51	S	6,9114	0,2800	160	4	175	6,6314
52	G	5,3750	0,4287	96	7	446	4,9463
53	C	6,2352	0,2424	240	4	101	5,9928
54	S	5,4217	0,2369	214	4	110	5,1848
55	G	5,7282	0,2730	160	5	170	5,4552
56	C	5,9044	0,2256	232	4	97	5,6788
57	S	5,0734	0,2234	224	4	99	4,8500
58	G	5,2465	0,2646	166	5	159	4,9819
59	C	5,1126	0,1721	200	3	86	4,9405
60	S	6,3169	0,2266	213	3	106	6,0903

Anexo 3- Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g), Comprimento Intestinal (CI) (mm), Relação Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC) (%), Relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/PC) (mg/mm) de fetos de ratos normais com 18,5 dias de idade gestacional.

Feto	PC	PI	CI	PI/PC	PI /CI
1	2,1232	0,0477	98	2%	0,49
2	2,6220	0,0715	102	3%	0,70
3	2,2024	0,0563	88	3%	0,64
4	2,3104	0,0571	95	2%	0,60
5	2,4252	0,0551	96	2%	0,57
6	2,5648	0,0535	90	2%	0,59
7	2,6248	0,0682	103	3%	0,66
8	2,6806	0,0507	94	2%	0,54
9	2,6150	0,0701	96	3%	0,73
10	2,4756	0,0604	96	2%	0,63
11	2,7503	0,0736	98	3%	0,75
12	2,7382	0,0698	102	3%	0,68
13	2,4194	0,0662	100	3%	0,66
14	2,4198	0,0571	98	2%	0,58
15	2,6632	0,0692	101	3%	0,69
16	2,2800	0,0587	92	3%	0,64
17	2,5885	0,0643	108	2%	0,60
18	2,6868	0,0558	95	2%	0,59
19	2,5214	0,0538	100	2%	0,54
20	2,4630	0,0642	106	3%	0,61
21	2,5923	0,0648	111	2%	0,58

22	2,7170	0,0674	111	2%	0,61
23	2,8004	0,0663	114	2%	0,58
24	2,9033	0,0619	108	2%	0,57
25	2,9566	0,0676	100	2%	0,68
26	2,7687	0,0686	112	2%	0,61
27	2,8630	0,0680	117	2%	0,58
28	2,0995	0,0464	130	2%	0,36
29	2,4887	0,0547	93	2%	0,59
30	2,4305	0,0552	105	2%	0,53
31	2,8789	0,0475	120	2%	0,40
32	2,2068	0,0507	98	2%	0,52
33	2,1281	0,0439	93	2%	0,47
34	2,6218	0,0542	91	2%	0,60
35	2,3256	0,0452	125	2%	0,36
27	2,4252	0,0541	89	2%	0,61
28	2,4158	0,0540	89	2%	0,61
29	2,5092	0,0597	116	2%	0,51
30	2,4913	0,0540	145	2%	0,37
31	2,2953	0,0441	94	2%	0,47
32	2,4050	0,0556	118	2%	0,47
Média	2,5243	0,0587	103	2%	0,57
SD	0,2205	0,0083	12	0,2%	0,09
MIN	2,0995	0,0439	88	2%	0,36
MAX	2,9566	0,0736	145	3%	0,75

Anexo 4- Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g), Comprimento Intestinal (CI) (mm), Relação Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC) (%), Relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/PC) (mg/mm) de fetos de ratos normais com 19,5 dias de idade gestacional.

Feto	PC	PI	CI	PI/PC	PI /CI
1	3,5372	0,0961	137	3%	0,70
2	4,0672	0,0745	157	2%	0,47
3	3,9330	0,1246	137	3%	0,91
4	3,7275	0,0658	143	2%	0,46
5	3,6631	0,0593	154	2%	0,39
6	3,6218	0,0705	185	2%	0,38
7	3,6424	0,1045	165	3%	0,63
8	3,6905	0,1015	170	3%	0,60
9	3,3775	0,0883	161	3%	0,55
10	3,7568	0,1058	171	3%	0,62
11	3,6438	0,0965	155	3%	0,62
12	3,6285	0,0971	143	3%	0,68
13	4,4136	0,1275	175	3%	0,73
14	4,4695	0,1236	164	3%	0,75
15	2,8644	0,0878	131	3%	0,67
16	4,2739	0,1293	164	3%	0,79
17	4,6991	0,1285	158	3%	0,81
18	4,2084	0,1064	166	3%	0,64
19	4,5073	0,1303	163	3%	0,80
20	4,8188	0,1542	170	3%	0,91
21	4,0955	0,1214	172	3%	0,71

22	4,0956	0,1042	167	3%	0,62
23	4,5304	0,1328	171	3%	0,78
24	4,4901	0,1152	152	3%	0,76
25	4,3435	0,0947	185	2%	0,51
26	2,9961	0,0601	130	2%	0,46
27	3,9506	0,1171	146	3%	0,80
28	3,8737	0,1075	145	3%	0,74
29	3,6649	0,1039	153	3%	0,68
30	3,8902	0,1167	163	3%	0,72
31	4,1927	0,1210	187	3%	0,65
32	4,0425	0,1182	194	3%	0,61
33	4,6011	0,1166	168	3%	0,69
34	3,9396	0,1042	170	3%	0,61
35	3,8906	0,0931	150	2%	0,62
36	4,0621	0,1056	158	3%	0,67
37	4,2476	0,1194	175	3%	0,68
38	4,1102	0,0987	155	2%	0,64
Média	3,9885	0,1059	161	3%	0,66
SD	0,4350	0,0211	15	0,4%	0,12
MIN	2,8644	0,0593	130	2%	0,38
MAX	4,8188	0,1542	194	3%	0,91

Anexo 5 Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g), Comprimento Intestinal (CI) (mm), Relação Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC) (%), Relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/PC) (mg/mm) de fetos de ratos normais com 20,5 dias de idade gestacional.

Feto	PC	PI	CI	PI/PC	PI/CI
1	5,7324	0,1770	210	3%	0,84
2	5,9323	0,1971	220	3%	0,90
3	5,8056	0,1520	190	3%	0,80
4	5,8380	0,1792	215	3%	0,83
5	5,6083	0,1677	210	3%	0,80
6	5,8563	0,1804	200	3%	0,90
7	5,6230	0,1728	195	3%	0,89
8	5,3528	0,1660	190	3%	0,87
9	5,4424	0,1783	200	3%	0,89
10	5,7736	0,1638	190	3%	0,86
11	5,2261	0,1741	225	3%	0,77
12	5,7383	0,1830	187	3%	0,98
13	5,4227	0,1753	216	3%	0,81
14	6,0018	0,1873	219	3%	0,86
15	5,3756	0,1732	235	3%	0,74
16	5,3227	0,1718	225	3%	0,76
17	5,9021	0,1799	226	3%	0,80
18	5,7044	0,1592	205	3%	0,78
19	5,2831	0,1655	212	3%	0,78
20	5,0408	0,1539	198	3%	0,78
21	5,3479	0,2138	204	4%	1,05

22	5,3228	0,1690	188	3%	0,90
23	5,3862	0,1484	195	3%	0,76
24	5,4730	0,1800	221	3%	0,81
25	5,7348	0,1921	202	3%	0,95
26	6,4217	0,2168	235	3%	0,92
27	6,1442	0,1989	215	3%	0,93
28	6,1747	0,2114	223	3%	0,95
29	6,2380	0,2175	225	3%	0,97
30	5,7220	0,2167	205	4%	1,06
31	6,3115	0,1837	230	3%	0,80
32	6,2080	0,2168	250	3%	0,87
33	5,7350	0,1680	210	3%	0,80
34	6,2108	0,1966	210	3%	0,94
35	5,7558	0,2166	238	4%	0,91
36	6,0650	0,1895	210	3%	0,90
37	6,1936	0,1779	250	3%	0,71
38	6,0786	0,2097	215	3%	0,98
39	5,6832	0,1727	215	3%	0,80
40	5,3886	0,1810	215	3%	0,84
41	5,5836	0,2102	200	4%	1,05
Média	5,7356	0,1840	213	3%	0,87
SD	0,3440	0,0197	16	0,3%	0,09
MIN	5,0408	0,1484	187	3%	0,71
MAX	6,4217	0,2175	250	4%	1,06

Anexo 6- Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g), Comprimento Intestinal (CI) (mm), Relação Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC) (%), Relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/PC) (mg/mm) de fetos de ratos normais com 21,5 dias de idade gestacional.

Feto	PC	PI	CI	PI/PC	PI/CI
1	5,8616	0,2118	195	4%	1,09
2	6,2966	0,2669	240	4%	1,11
3	6,3938	0,3429	210	5%	1,63
4	6,0428	0,3537	210	6%	1,68
5	5,9647	0,2184	225	4%	0,97
6	5,8584	0,2487	245	4%	1,02
7	6,1179	0,2682	238	4%	1,13
8	5,9248	0,2374	202	4%	1,18
9	6,1057	0,2326	224	4%	1,04
10	6,0311	0,2304	205	4%	1,12
11	6,3008	0,2464	201	4%	1,23
12	6,4223	0,2588	223	4%	1,16
13	5,9765	0,2320	226	4%	1,03
14	5,8155	0,2791	257	5%	1,09
15	6,6736	0,2306	246	3%	0,94
16	6,0774	0,2392	210	4%	1,14
17	6,3514	0,2588	267	4%	0,97
18	6,0212	0,2379	231	4%	1,03
19	6,4358	0,2467	246	4%	1,00
20	6,8874	0,2657	194	4%	1,37
21	6,2352	0,2424	240	4%	1,01

22	5,9044	0,2256	232	4%	0,97
23	6,0812	0,2916	270	5%	1,08
24	6,0753	0,2464	226	4%	1,09
25	5,9651	0,2288	238	4%	0,96
26	6,1843	0,2506	243	4%	1,03
27	6,5687	0,2541	227	4%	1,12
28	6,6422	0,2480	248	4%	1,00
29	6,1179	0,2375	263	4%	0,90
30	6,6060	0,2841	255	4%	1,11
31	6,6062	0,2606	270	4%	0,97
32	6,2141	0,2772	280	4%	0,99
33	6,4478	0,2518	261	4%	0,96
34	6,5733	0,2618	255	4%	1,03
35	6,5002	0,2557	275	4%	0,93
36	6,8243	0,2475	274	4%	0,90
37	6,4296	0,2540	261	4%	0,97
38	6,5218	0,2682	257	4%	1,04
39	6,8845	0,2676	259	4%	1,03
Média	6,2805	0,2554	239	4%	1,08
SD	0,3014	0,0282	24	0,5%	0,17
MIN	5,8155	0,2118	194	3%	0,90
MAX	6,8874	0,3537	280	6%	1,68