

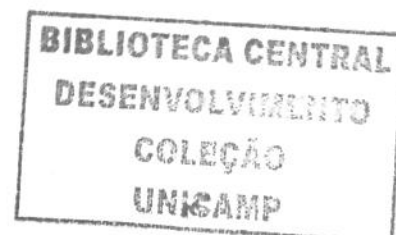
DANIEL GUIMARÃES BITTENCOURT

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTERÓIDE
SOBRE O INTESTINO DE RATOS SUBMETIDOS À
GASTROSQUISE EXPERIMENTAL INTRA-ÚTERO:
Avaliação morfológica, histológica e bioquímica**

CAMPINAS

2005

i



DANIEL GUIMARÃES BITTENCOURT

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE CORTICOSTERÓIDE
SOBRE O INTESTINO DE RATOS SUBMETIDOS À
GASTROSQUISE EXPERIMENTAL INTRA-ÚTERO:
Avaliação morfológica, histológica e bioquímica**

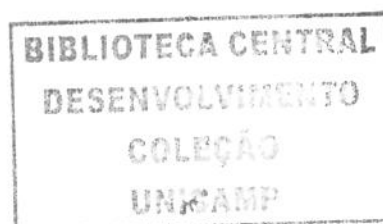
*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Doutor em Cirurgia, área de concentração Cirurgia*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

CAMPINAS

2005

ii



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TIUNICAMP
	B548e
V	EX
TOMBO BC/	68738
PROC.	16.123-06
C	☐
D	☒
PREÇO	1400
DATA	02/06/06
	Dir. id 382990

Bittencourt, Daniel Guimarães
B548e Efeitos da administração de corticosteróide sobre o intestino de
fetos de ratos submetidos à gastrosquise experimental intra-útero:
avaliação morfológica, histológica e bioquímica / Daniel Guimarães Bittencourt.
Campinas, SP : [s.n.], 2005.

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

1. Gastrosquise. 2. Doenças fetais. 3. Feto - cirurgia. 4. Citocinas.
5. Corticosteróides. I. Sbragia Neto, Lourenço. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Membros:

1. Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

2. Prof. Dr. Luiz César Peres

3. Prof. Dr. José Luiz Martins

4. Prof. Dr. Joaquim Murray Brustorff Silva

5. Prof. Dr. Antonio Gonçalves de Oliveira Filho

Handwritten signatures of the five members of the examining board, corresponding to the list on the left. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized.

Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/12/2005

686119007

DEDICATÓRIA

À Ariane e Elisa, esposa e filha, que dão o sentido e
tornam mais bela minha vida.

À minha mãe Maria Christina e ao meu pai Oswaldo,
pelas bases que me impulsionaram e pelo estímulo à minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Lourenço Sbragia Neto, orientador completo. Participou ativamente de todas as fases deste estudo, inspirando-me com seu entusiasmo, conhecimento e generosidade.

Aos Professores Doutores José Antônio Gontijo e Mário José Abdalla Saad, que cederam seus laboratórios para a realização dos experimentos.

Ao Professor Doutor Lício Augusto Velloso, pelos conhecimentos teórico e prático que possibilitaram os estudos bioquímicos.

Ao Professor Doutor Luís Antônio Violin Pereira, pela orientação e auxílio.

Ao Dr Willy Marcus Gomes França e aos alunos Anderson Gonçalves e Maria Weber Guimarães Barreto, pela colaboração nos experimentos.

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

“Todo homem, por natureza, quer saber.”

Aristóteles

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xiv</i>
ABSTRACT.....	<i>xvii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	19
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1- Resposta inflamatória.....	27
2.2- Citocinas.....	29
2.3- Citocinas e Sistema amniótico.....	32
2.4- Corticosteróide e resposta inflamatória.....	36
3- OBJETIVOS.....	38
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1- Avaliação do comitê de ética e experimentação animal.....	41
4.2- Animal.....	41
4.3- Constituição dos grupos.....	41
4.4- Organograma do experimento.....	43
4.5- Procedimento cirúrgico padrão.....	44
4.6- Coleta de dados.....	47
4.7- Avaliação morfométrica.....	49
4.8- Avaliação histológica.....	49
4.9- Análise bioquímica.....	50
4.10- Metodologia estatística.....	51
5- RESULTADOS.....	52
6- DISCUSSÃO.....	74
7- CONCLUSÃO.....	83
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

CI	Comprimento intestinal
DI	Diâmetro da alça intestinal
Dx	Dexametasona
ECN	Enterocolite necrosante
IFN-γ	Interferon-gama.
IL-1	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
LA	Líquido amniótico
MC	Camada muscular circular
ML	Camada muscular longitudinal
MU	Camadas mucosa e submucosa
PC	Peso fetal
PI	Peso intestinal
RCIU	Retardo do crescimento intra-uterino
SE	Camada serosa
Th	Linfócito T helper

LISTA DE NOTAÇÕES

g	gramas
mg	miligramas
%	por cento
cm	centímetros
mm	milímetros
µm	micrômetro
kg	quilogramas
US\$	dólar norte-americano
°C	graus celcius
rpm	rotações por minuto

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

	<i>Pág.</i>
Organograma do experimento.....	43

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Resultados das variáveis morfométricas de fetos de ratas submetidos à gastrosquise aos 18,5 dias de gestação sem (Grupo I) e com a administração materna de corticosteróide (Grupo II).....	62
Tabela 2 Resultados das variáveis histológicas de intestinos de fetos de ratas submetidos à gastrosquise aos 18,5 dias de gestação sem (Grupo I) e com a administração materna de corticosteróide (Grupo II).....	69
Tabela 3 Resultados das dosagens intestinais de proteína e citocinas: IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e proteína de fetos submetidos à gastrosquise, controle e sham, com e sem administração de corticosteróide.....	73

	<i>Pág.</i>
Figura 1 Modelo experimental de gastrosquise.....	46
Figura 2 Coleta fetal; coleta intestinal; mensuração intestinal.....	48
Figura 3 Triade no dia da coleta (21,5 dias de gestação): G= feto com gastrosquise, C= feto controle e S= feto sham, evidenciando o RCUI no feto G.....	55
Figura 4 Comparação do comprimento intestinal entre G e C.....	58
Figura 5 Fotografia microscópica demonstrando os achados histológicos: (A) intestino de feto controle; (B) intestino de feto com gastrosquise (magnificação x200).....	70
Figura 6 Fotografia microscópica demonstrando as diferenças no diâmetro intestinal: (A) intestino de feto controle; (B) intestino de feto com gastrosquise (magnificação x20).....	71

	<i>Pág.</i>
Gráfico 1 Comparação entre as medidas do peso corporal	54
Gráfico 2 Comparação entre as medidas do peso intestinal	56
Gráfico 3 Comparação entre as medidas do comprimento intestinal.....	57
Gráfico 4 Comparação entre a relação PI/PC.....	59
Gráfico 5 Comparação entre as relações PI/CI.....	60
Gráfico 6 Comparação entre PC – PI.....	61
Gráfico 7 Espessura, em micrômetros, das camadas mucosa e submucosa dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II.....	63
Gráfico 8 Espessura, em micrômetros, da camada muscular circular dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II.....	64
Gráfico 9 Espessura, em micrômetros, da camada muscular longitudinal dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II.....	65
Gráfico 10 Espessura, em micrômetros, da serosa dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II.....	66
Gráfico 11 Diâmetro, em micrômetros, em corte transversal dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II.....	68

RESUMO

Introdução: Gastrosquise é o defeito congênito de fechamento da parede abdominal, com herniação das alças intestinais. O contato prolongado do intestino com o líquido amniótico promove alterações inflamatórias, acarretando imaturidade e dismotilidade intestinal; além do retardo de crescimento intra-uterino.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração materna de corticosteróide sobre o processo inflamatório intestinal de fetos de ratos com gastrosquise, através da análise morfológica, histológica e bioquímica.

Materiais e Métodos: Utilizou-se o modelo experimental para a criação de gastrosquise em fetos de ratas *Spreague-Dowley* aos 18,5 dias de gestação (termo da gestação = 22 dias). Dois grupos de fetos foram estudados: com e sem administração materna de dexametasona. Cada grupo foi composto por fetos submetidos a gastrosquise e seus respectivos controles. *Morfometria:* Avaliou-se o peso fetal (PC), peso (PI) e comprimento intestinal (CI). *Histologia:* Mediu-se o diâmetro das alças intestinais (DI), espessura da mucosa e submucosa (MU), das camadas musculares longitudinal (ML) e circular (MC) e serosa (SE). *Bioquímica:* Incluiu dosagens intestinais de proteína e das citocinas: interleucina (IL)-1, IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral-alfa e interferon-gama. As diferenças entre os Grupos e subgrupos foram testadas pelo método ANOVA, com valores significativos de $p < 0,05$.

Resultados: *Morfometria:* Fetos com gastrosquise têm PC e CI reduzidos e PI elevado ($p < 0,005$). No grupo onde houve administração de dexametasona observou-se redução significativa ($p < 0,005$) do PC e PI. *Histologia:* Fetos com gastrosquise apresentaram DI aumentado em ambos os grupos ($P < 0,0001$). As quatro camadas da parede intestinal: MU, ML, MC e SE apresentaram-se mais espessas nos fetos com gastrosquise. *Bioquímica:* As dosagens de proteína intestinal estavam reduzidas nos fetos com gastrosquise. A administração de dexametasona elevou o conteúdo de proteína intestinal. As dosagens de citocinas intestinais não mostraram diferenças significativas entre fetos do mesmo grupo, tampouco em relação à administração de corticosteróide.

Conclusões: Fetos de rato submetidos à gastrosquise experimental apresentaram PC reduzido, que foi acentuado pela administração de dexametasona. O PI elevado e CI reduzido dos fetos com gastrosquise podem refletir o intenso processo inflamatório intestinal intra-uterino, sendo que a administração de dexametasona foi capaz de reduzir o PI. A histologia demonstrou que o aumento do PI nos fetos com gastrosquise foi relacionado ao aumento da espessura de todas as camadas da parede intestinal. As dosagens de proteína intestinal, reduzidas nos fetos com gastrosquise, podem sugerir uma baixa taxa de proliferação celular. A administração de dexametasona reduziu o déficit de proteína intestinal. Não houve um padrão distinto de ativação de citocinas intestinais para os fetos com gastrosquise.

ABSTRACT

Background: Gastroschisis is the congenital anomaly of the abdominal wall closure. The eviscerated bowel is exposed to the amniotic fluid, which leads to an intestinal inflammatory reaction. The goal in the treatment of gastroschisis is to prevent intestinal injury, as well as the motility, absorptive and infectious complications.

Purpose: The author evaluated the effects of maternal corticosteroid administration on the intestines of rats submitted to fetal gastroschisis, through morphometrical, histological and biochemical analysis.

Methods: A fetal gastroschisis rat model was used. Pregnant rats were submitted to surgery on day 18.5 of pregnancy (term = 22 days). Two groups were assessed: with and without maternal dexamethasone administration. Each group was composed by gastroschisis, control and sham fetuses. *Morphometry:* Fetal body weight, intestinal weight and intestinal length were assessed. *Histology:* Analysis involved measures of intestinal loop diameter, total intestinal wall, mucosal and submucosal, both circular and longitudinal muscles layers and serosal thickness. *Biochemics:* The intestinal cytokine profile: IL-1, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor, gamma-interferon and protein content were assessed. Differences between groups and subgroups were tested by the ANOVA method with a significant p value <0.05 .

Results: Dexamethasone promoted a decrease in all the morphometric data, except in the intestinal length. There was a decreased intestinal protein content in gastroschisis fetuses. Dexamethasone increased the intestinal protein content in gastroschisis, control and sham fetuses. In both groups, all histological parameters were increased in gastroschisis fetuses ($p<0.0001$). It could not be identified a particular profile of cytokine for gastroschisis fetuses.

Conclusions: Rat fetuses submitted to experimental gastroschisis had decreased body weight and increased intestinal weight. Histological analysis demonstrated that the increased intestinal weight was related to an increased thickness of all intestinal wall layers in gastroschisis fetuses. Dexamethasone triggered a substantial decrease in intestinal weight, and increased the intestinal protein content in gastroschisis fetuses. It may be useful in managing the intestinal damage in gastroschisis.

1- INTRODUÇÃO

A primeira descrição de um defeito da parede abdominal anterior em fetos humanos foi realizada pelo cirurgião francês Ambroise Paré (1510-1590) (PUTNAN & EMMENS, 1990). Em 1733, Calder não deixou dúvidas ao relatar a ocorrência de herniação do intestino delgado em feto natimorto com anatomia umbilical normal (GRAY & SKANDALAKIS, 1972).

Gastrosquise, termo de origem grega que significa “abdome fendido”, foi designado em 1953 (MOORE & STROKES). Por definição, constitui o defeito de fechamento da espessura total da parede abdominal, com herniação das alças intestinais na parte lateral direita do cordão umbilical (PUTNAN & EMMENS, 1990).

O fechamento das cavidades corporais do embrião ocorre através do crescimento dos folhetos laterais, cranial e caudal, quando este 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 cavidade abdominal, durante a terceira e quarta semanas do desenvolvimento fetal, cresce rapidamente, enquanto o saco vitelino não muda de dimensões. Com isso, a ampla comunicação do intestino primitivo com o saco vitelino é reduzida paulatinamente, até que, na quinta semana, restringe-se apenas ao conduto ônfalo-mesentérico. Ocorre, então, um abrupto crescimento do intestino médio, desproporcional ao desenvolvimento da cavidade abdominal, causando a exteriorização de grande parte do intestino através do umbigo. Tal herniação fisiológica permanece até a décima semana, quando a cavidade abdominal já se desenvolveu suficientemente para acomodar o retorno do intestino. Deste momento até a décima segunda semana, ocorre o processo de rotação e fixação intestinal. A ausência do retorno do intestino à cavidade abdominal explica, em parte, a embriologia da gastrosquise.

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 esterno. Quando o defeito acomete o folheto caudal, o feto poderá apresentar extrofia de bexiga ou cloaca. O não fechamento dos folhetos laterais pode cursar com hérnia umbilical, onfalocele ou gastrosquise.

Mais recentemente, uma nova hipótese foi sugerida para explicar a gênese do defeito da parede abdominal 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 da somatopleura pára-umbilical, ao nível da veia umbilical direita, durante tal migração, permitiria a herniação do intestino, agora livre no LA (HOYME *et al.*, 1981).

A incidência da gastrosquise é de aproximadamente um neonato acometido para cada 5.000 a 10.000 nascidos vivos, não apresentando herança mendeliana (MORRISON *et al.*, 1998; STEIN *et al.*, 2004). Nos últimos dez anos, devido ao uso cada vez maior de tabaco e drogas ilícitas, a incidência de gastrosquise parece estar aumentando em alguns países (HUME *et al.*, 1997; HAUSTEIN, 1999; SUITA *et al.*, 2000).

Vários são os fatores pré-natais que parecem influenciar na evolução clínica dos neonatos com gastrosquise. Entre eles destacam-se: idade materna, via de parto, idade gestacional do aparecimento do defeito no feto, presença de estresse fetal e o tipo de correção cirúrgica pós-natal (MORETTI *et al.*, 1990; STRINGER *et al.*, 1991; CRAWFORD *et al.*, 1992; SIMMONS & GEORGESON, 1996; DUNN *et al.*, 1999; MOORE *et al.*, 1999). O aumento da espessura das alças intestinais, diminuição do fluxo sanguíneo intestinal das alças expostas detectadas pelo ultrassom Doppler e presença de atresias associadas são achados relacionados a uma pior evolução neonatal (ADRA *et al.*, 1996; ABUHAMAD *et al.*, 1997; DEANS *et al.*, 1999; FLEET & DE LA HUNT, 2000).

Portadores de gastrosquise geralmente são prematuros e possuem baixo peso ao nascer (média de 2700 g) (CURRY *et al.*, 2000). 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 em sua correção.

Atualmente, a mortalidade dos neonatos portadores de gastrosquise em países desenvolvidos é de cerca de 10% e está relacionada à presença de atresia intestinal, volvo e enterocolite necrosante (RINEHART *et al.*, 1999; SNYDER, 1999). Tal mortalidade é, certamente, superior em países subdesenvolvidos. A associação de anomalias cromossômicas é baixa e sugere maior importância dos fatores ambientais em sua gênese. Apesar da relativa baixa mortalidade, os portadores de gastrosquise apresentam complicações em 45% dos casos. A alta morbidade está relacionada, principalmente, ao lento retorno da motilidade intestinal, que predispõe à translocação bacteriana e sepse (BLAKELOCK *et al.*, 1997). A necessidade de repetidas cirurgias e o tempo prolongado de internação hospitalar agravam o quadro, colaborando com o aumento das taxas globais de morbidade.

Nas últimas décadas, 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 possibilitaram uma melhor estabilidade hemodinâmica e respiratória durante o ato cirúrgico (DRIVER *et al.*, 2000).

Os primeiros esforços para o fechamento primário do defeito de parede na gastrosquise resultaram, na maioria das tentativas, em óbito. Mortalidade esta, relacionada à insuficiência respiratória e renal, além de desnutrição. Na década de 60, SCHUSTER propôs o uso de próteses para a correção de defeitos abdominais. Após a fixação da prótese à aponeurose, realizavam-se compressões progressivas desta, promovendo pressão sobre as alças herniadas e acomodando-as lentamente de volta à cavidade abdominal. Após um determinado período, era possível a retirada da prótese e o fechamento da parede abdominal (SCHUSTER, 1967).

Baseados neste princípio, ALLEN & WRENN idealizaram a utilização de prótese de silicone em formato cilíndrico (silo), que seria ordenhada progressivamente, direcionando o conteúdo intestinal de volta à cavidade abdominal (ALLEN & WRENN, 1969).

O tratamento preconizado, atualmente, para os neonatos com gastrosquise é o fechamento primário do defeito (CANTY & COLLINS, 1983). No entanto, nos casos onde existe uma desproporção muito acentuada entre o volume das alças intestinais e a cavidade abdominal, o fechamento primário pode acarretar grandes transtornos respiratórios e hemodinâmicos. Pressões intra-vesicais superiores a 20 mmHg ao fechamento abdominal indicam um tratamento estadiado, utilizando-se o silo (SAUTER *et al.*, 1991; LACEY & CARRIS, 1993).

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

A exposição das alças ao LA promove alterações funcionais, histológicas e bioquímicas na parede intestinal de fetos com gastrosquise, as quais são as principais causas da morbi-mortalidade neonatal (TIBBOEL *et al.*, 1986; AMOURY *et al.*, 1988; SALEH *et al.*, 1993; BEALER *et al.*, 1996). Tais alterações intestinais são conseqüentes ao processo inflamatório iniciado intra-útero (OLDHAM *et al.*, 1988; LANGER *et al.*, 1989; DILSIZ *et al.*, 1999). Macroscopicamente, o intestino exposto apresenta-se espessado, dilatado, 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 (SRINATAN *et al.*, 1995; LANGER *et al.*, 1990).

Os modelos experimentais mais utilizados para o estudo da gastrosquise são fetos de galinhas (AKTUG *et al.*, 1998), de ovelhas (LANGER, *et al.*, 1990), de coelhas (PHILLIPS *et al.*, 1991; ALBERT *et al.*, 2001) e, mais recentemente, de ratas (CORREIA PINTO *et al.*, 2001). O modelo de gastrosquise em ratas é vantajoso por ser de baixo custo, 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 para estudos de biologia molecular são disponíveis no mercado.

De forma geral, nos modelos experimentais, o defeito é criado no final da gestação. Entretanto, em humanos, a gastrosquise ocorre ao redor da décima semana de gestação, quando a herniação fisiológica do intestino deve desaparecer.

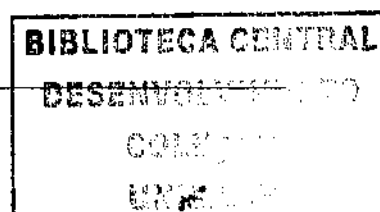
LANGER *et al.* (1989), na tentativa experimental de explicar a lesão intestinal na gastrosquise, sugeriram que a compressão exercida pelo orifício da parede abdominal sobre o mesentério é um fator importante na gênese da lesão intestinal. Entretanto, outros estudos mostraram que a criação de defeitos de parede abdominal com diferentes dimensões de orifícios não alteraram as lesões do intestino extruso (ALBERT *et al.*, 2001). Em estudos subseqüentes, ficou comprovado que o contato com o LA é o principal fator causal do processo inflamatório intestinal, ao invés da compressão exercida pelo orifício da parede abdominal (ALBERT *et al.*, 1993, 2001, 2003; KLUCK *et al.*, 1993; GUO *et al.*, 1995; CORREIA-PINTO *et al.*, 2001, 2002). As alterações morfológicas e histológicas intestinais na gastrosquise ocorrem, principalmente, no último trimestre de gestação (LANGER *et al.*, 1989; SHAW *et al.*, 1994). TIBBOEL *et al.* (1986) observaram ausência de serosite na gastrosquise humana antes da trigésima semana de gestação. No último trimestre, o LA humano sofre modificações em sua composição relacionadas à maturação da função renal fetal. Níveis de uréia, creatinina e mecônio aumentam, enquanto a osmolaridade e os níveis de sódio diminuem. Experimentos em ratos e coelhos sugerem que a presença de mecônio no LA tem relação positiva com a inflamação intestinal, enquanto que a urina não foi capaz de desencadear tal lesão (CORREIA-PINTO *et al.*, 2002; ALBERT *et al.*, 2003). Por conta dessas alterações teciduais locais, o intestino é mais susceptível à ocorrência de fenômenos de translocação bacteriana, ileo paralítico e desenvolvimento de enterocolite necrosante (MORRISON *et al.*, 1998; GOMEZ *et al.*, 1998).

Modelos experimentais também demonstraram a importância do LA no desenvolvimento intestinal e somático fetal (MULVHILL *et al.*, 1985). 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) (BLAKELOCK *et al.*, 1997).

RCIU é uma manifestação freqüente dos fetos portadores de gastrosquise (FRIES *et al.*, 1993), cujo mecanismo não está completamente esclarecido, pois pode ser resultante primariamente da gastrosquise ou então de fatores outros que não o próprio defeito (BLAKELOCK *et al.*, 1997). Em estudo prévio, realizado em nossa instituição, evidenciamos que o RCIU está diretamente relacionado à gastrosquise (FRANCHI-TEIXEIRA *et al.*, 2005).

A prevenção ou redução da lesão inflamatória intestinal tem sido o alvo recente na pesquisa do tratamento da gastrosquise. A administração experimental de corticosteróides demonstrou, além das ações anti-inflamatórias, efeitos favoráveis sobre o desenvolvimento pulmonar e intestinal fetal (JOBE & SOLL, 2004; YU *et al.*, 2004).

Entretanto, pouco tem sido esclarecido sobre os eventos iniciais, agentes causais e mediadores da resposta inflamatória intestinal na gastrosquise.



2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Resposta Inflamatória

O processo inflamatório agudo é a resposta precoce do organismo à infecção, lesão imune ou tóxica tecidual. Uma de suas principais funções é recrutar células inflamatórias ao local da lesão, onde poderão auxiliar na erradicação dos agentes nocivos, além de degradarem o tecido necrótico resultante do dano celular. A inflamação, por natureza, é essencialmente uma resposta protetora, que objetiva a diluição, isolamento ou destruição do fator agressor; bem como desencadear os eventos de cura e reconstituição dos tecidos danificados. Durante a fase de reparo, as estruturas danificadas são substituídas por regeneração das células nativas e tecido fibroblástico. Entretanto, as células inflamatórias também podem apresentar efeitos deletérios, prolongando a inflamação e induzindo lesão tecidual. Tal efeito ocorre através da liberação de enzimas, radicais tóxicos do oxigênio e mediadores químicos, como as citocinas. Outro possível efeito deletério está relacionado ao processo cicatricial, que pode causar prejuízos funcionais ao tecido afetado (ABBAS & LICHTMAN, 2004).

Fase Aguda: Por definição, a fase aguda da resposta inflamatória é breve, apresentando três componentes principais: (1) vasodilatação: aumento do calibre vascular, propiciando o aumento local do fluxo sanguíneo e responsável pelo eritema e aumento da temperatura local; (2) aumento da permeabilidade vascular, permitindo que fluidos e proteínas plasmáticas deixem a circulação; causando o exudato responsável pelo edema e (3) emigração de leucócitos da microcirculação para o foco da lesão. Os leucócitos, através de integrinas em sua superfície, ligam-se à moléculas de adesão na superfície endotelial; como as ICAM-1 (molécula de adesão inter-celular 1) e VCAM –1 (molécula de adesão da célula vascular-1). As integrinas são glicoproteínas localizadas na membrana dos leucócitos e têm a capacidade de se ligarem às moléculas de adesão do endotélio, quando ativadas por agentes quimiotáticos. Após a adesão, os leucócitos migram entre as células endoteliais, ao longo da junção inter-celular e através da membrana basal (diapedese).

Após a emigração, os leucócitos se direcionam ao local da lesão através de gradiente químico, processo este denominado quimiotaxia. Fatores endógenos e exógenos podem exercer ação quimiotática sobre os leucócitos, incluindo: (1) produtos bacterianos solúveis, como lipopolissacarídeos; (2) componentes do sistema complemento; (3) produtos

do metabolismo do ácido araquidônico e (4) citocinas. Os agentes quimiotáticos se ligam a receptores específicos na superfície dos leucócitos, induzindo elevação dos níveis intra-celulares de cálcio. As concentrações aumentadas de cálcio no citosol ativam elementos contráteis do citoesqueleto celular, permitindo o movimento através dos pseudópodes. A direção de tal movimento é, provavelmente, determinada pela maior concentração de agentes quimiotáticos naquele lado da célula. Além da locomoção, os agentes quimiotáticos também induzem outras respostas nos leucócitos, denominadas ativação leucocitária. Uma vez ativados, os leucócitos apresentam degranulação e secreção de enzimas lisossômicas, permitindo a fagocitose da partícula estranha ao organismo.

O reconhecimento da partícula a ser fagocitada depende de sua cobertura por proteínas séricas (opsoninas), as quais se ligam a receptores específicos da superfície leucocitária. Após a fagocitose, o vacúolo fagocitário se une à membrana de um lisossomo, resultando na degradação da partícula fagocitada por reação oxidativa. A liberação das enzimas do fagolisossomo no meio extra-celular pode promover lesão celular. Este fato pode ser observado em situações onde ocorre degranulação prematura dos lisossomos antes do completo fechamento do vacúolo fagocitário, ou durante tentativas de fagocitose de grandes partículas. Além disso, os leucócitos ativados também liberam outros produtos tóxicos de seu metabolismo, como radicais livres derivados do oxigênio, capazes de causar lesão tecidual direta.

As possíveis evoluções de um processo inflamatório agudo são: (1) resolução completa, com neutralização do agente causal, remoção dos mediadores químicos e normalização da permeabilidade vascular. A resolução do edema, do tecido necrótico e das células inflamatórias é produto de um esforço conjunto entre macrófagos e drenagem linfática. Ocorre, então, a regeneração do tecido; (2) formação de fibrose, quando a inflamação ocorre em tecidos incapazes de se regenerarem, ou quando houve uma destruição tecidual extensa; (3) formação de abscesso, em casos de infecção por organismos piogênicos e (4) progressão para inflamação crônica.

Cronificação: Quando, na fase aguda da inflamação, o agente causal não é eliminado, ou sua exposição é prolongada, ocorre: (1) a persistência do acúmulo de células inflamatórias, denominado infiltrado mononuclear; (2) destruição tecidual e

(3) regeneração, envolvendo angiogênese e fibrose. A proliferação de fibroblastos e acúmulo de excesso de matriz extra-celular é comumente observada nos processos crônicos, sendo uma importante causa da disfunção do tecido, ou órgão afetado.

A persistência na secreção de mediadores inflamatórios pelos linfócitos, como as citocinas, é um importante fator na manutenção do infiltrado mononuclear. Os linfócitos e macrófagos apresentam relação recíproca na inflamação crônica: (1) macrófagos ativam linfócitos ao apresentarem fragmentos do antígeno em sua superfície; (2) os linfócitos ativados, em resposta, produzem uma série de citocinas, como IFN- γ , que estimulam e ativam os macrófagos; (3) os macrófagos ativados, então, secretam citocinas, como IL-1 e TNF- α , que também podem ativar linfócitos e outros tipos de células. O resultado é um foco inflamatório, onde linfócitos e macrófagos estimulam um ao outro até que o agente causal seja removido ou ocorra algum evento modulatório (ROITT & DELVIS, 2002).

2.2- Citocinas

As citocinas são hormônios polipeptídeos produzidos por diferentes tipos de células, como leucócitos, linfócitos e macrófagos ativados. Sua secreção é um evento breve e auto-limitado. Geralmente, as citocinas não são armazenadas na forma de moléculas pré-formadas. Uma vez sintetizadas, são rapidamente secretadas. Elas modulam a função da própria célula que as produz e de outras células, podendo apresentar efeitos autócrinos, parácrinos ou endócrinos.

As citocinas têm papel central na modulação do sistema imune intestinal. São produzidas por linfócitos, monócitos, macrófagos intestinais, granulócitos, células epiteliais e endoteliais, além de fibroblastos. Citocinas têm funções pró e anti-inflamatórias. Um desequilíbrio entre elas pode acarretar em lesão celular e cronificação da resposta inflamatória. Concentrações de várias citocinas pró e anti-inflamatórias encontram-se elevadas na análise da mucosa em doenças inflamatórias intestinais (ARAI *et al.*, 1990).

Apesar de haver a participação de vários tipos de células, os linfócitos T helper (Th) são responsáveis por orquestrar a resposta imune a uma grande variedade de agentes nocivos, através da secreção de citocinas. As células Th deixam o timo em direção a órgãos

linfóides secundários, principalmente linfonodos; tendo o potencial de se diferenciarem em um dos subtipos efetores, denominados Th1 e Th2. A divisão em subtipos efetores é baseada em suas capacidades funcionais e no perfil de citocinas que produzem. Células Th1 secretam IFN- γ , IL-2, e TNF- α , sendo importantes na erradicação de patógenos intra-celulares, através da indução da resposta imune celular. O subtipo Th2 produz IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13; ativando a resposta imune humoral, que tem papel fundamental na produção de anti-corpos e na eliminação de patógenos extra-celulares (ABBAS & LICHTMAN, 2004; CONSTANT & BOTTOMLY, 1997).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, os mediadores mais importantes da fase aguda da resposta inflamatória intestinal são: IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ (FORD *et al.*, 1997; WILLIAMS, 2001; DOHI *et al.*, 2000). São liberados sistemicamente em uma espécie de cascata. TNF- α pode induzir a produção de IL-1, a qual estimula a secreção de IL-6. No endotélio, IL-1 e TNF- α induzem um aumento na expressão de moléculas de adesão, secreção de citocinas adicionais, proliferação de células de músculo liso e fibroblastos, produção de óxido nítrico e de matriz extra-celular, além de aumentar a trombogenicidade. TNF- α também causa a agregação e ativação de neutrófilos, bem como a liberação de enzimas proteolíticas pelas células mesenquimais, desta forma contribuindo para a lesão tecidual. IL-6 estimula a síntese hepática de várias proteínas plasmáticas, como o fibrinogênio, que causa o aumento da aglutinação eritrocitária. IFN- γ é um potente ativador de macrófagos e neutrófilos, sendo um dos principais estímulos à produção de óxido nítrico, o qual promove a vasodilatação. Nos sítios de inflamação aguda, quando o agente nocivo ao tecido não é eliminado, o acúmulo de macrófagos e linfócitos persiste; desta forma cronificando o processo inflamatório. Células Th têm relação recíproca com macrófagos nos processos inflamatórios crônicos. Ocorre um estímulo mútuo através da secreção de IL-1, TNF- α e IFN- γ , sendo que ambos produzem mediadores que afetam também outras células. O resultado é um sítio inflamatório onde macrófagos e Th persistentemente estimulam um ao outro, até que o agente causal seja removido, ou que algum evento modulatório ocorra.

Estudos conduzidos nos últimos anos forneceram evidências de que vários tipos de processos inflamatórios oriundos de anormalidades na regulação imune, em última análise, estão relacionados à resposta imune celular dos subtipos Th1, ou Th2. Desta forma,

ao compreender tais tipos de respostas, tornar-se-ia possível o controle da resposta inflamatória, independentemente de suas causas. O reconhecimento do subtipo de células efectoras de Th pode permitir o melhor entendimento de uma série de respostas imunes. No intestino, existe um equilíbrio entre os subtipos Th1 e Th2, tendo sido comprovado que tal balanço está comprometido em doenças inflamatórias intestinais como doença de Crohn e retocolite ulcerativa. O mecanismo imuno-regulatório fisiológico que mantém a homeostase intestinal está comprometido na gastrosquise (RENNICK & FORT, 2000; SZABO *et al.*, 2003).

A inibição de citocinas pró-inflamatórias e a suplementação de anti-inflamatórias foi capaz de reduzir a inflamação intestinal em modelos experimentais animais e humanos, constituindo um novo horizonte na terapêutica das doenças inflamatórias intestinais (KUNKEL & GODESSART, 2002; STEIDLER, 2002).

As principais fontes e ações das citocinas avaliadas neste estudo são:

IFN- γ é produzido por Th ativados, apresentando as seguintes funções: (1) ativador de células mononucleares fagocitárias, sendo o principal meio pelo qual células Th ativam os macrófagos; (2) aumenta a expressão de receptores celulares, amplificando o reconhecimento de agentes nocivos; (3) agem nas próprias células Th, promovendo sua diferenciação no subtipo Th1 e inibindo a proliferação Th2; (4) ativa os receptores do endotélio vascular, permitindo a adesão e emigração das células Th ao local da inflamação. Quando ocorre falha na secreção de IFN- γ , observa-se maior susceptibilidade à infecções por patógenos intra-celulares, os quais não podem ser eliminados devido ao defeito na ativação dos macrófagos.

TNF- α é secretado, principalmente, por células fagocitárias mononucleares ativadas, com macrófagos e mastócitos, além de células Th. Seus principais efeitos são: (1) estimular os receptores de adesão da superfície endotelial, favorecendo a emigração de leucócitos e linfócitos para o foco da inflamação; (2) induzir células mononucleares e outros tipos celulares a secretarem diferentes citocinas, com IL-1 e IL-6, que contribuem no recrutamento leucocitário; (3) potente estimulador da ativação leucocitária; (4) indutor da angiogênese e de fibroblastos, formando novos vasos e causando deposição de tecido

conjuntivo, respectivamente. Desta forma, remodelando o tecido; (5) em altas concentrações, apresenta efeito endócrino, estimulando a produção de prostaglandinas pelo hipotálamo, a qual induz a febre, ativando a produção de proteínas plasmáticas pelos hepatócitos e causando caquexia; (6) ativa o sistema de coagulação e (7) age como importante mediador no choque séptico, deprimindo a contratilidade miocárdica, reduzindo a perfusão tecidual e causando coagulação intra-vascular disseminada.

IL-1 tem, como principal fonte, as células fagocitárias mononucleares ativadas. Sua produção pode ser estimulada por endotoxinas bacterianas, pelo contato com células Th, pelo TNF- α e pela própria presença de IL-1. Seus principais efeitos biológicos são: (1) ação sobre o endotélio vascular, promovendo coagulação e maior adesão leucocitária e (2) em altas concentrações, assim com o TNF- α , são pirógenos endógenos, ativam a produção de proteínas plasmáticas pelos hepatócitos e causam caquexia.

IL-6 é sintetizada por células fagocitárias mononucleares, células do endotélio vascular e por fibroblastos, principalmente em resposta ao estímulo de IL-1 e, em menor grau, de TNF- α . IL-6 (1) estimula a produção hepatocítica de proteínas plasmáticas, como o fibrinogênio; (2) age como co-estimulador das células Th e (3) induz a hematopoese de células precursoras pela medula óssea.

IL-10 é produzida por macrófagos ativados e linfócitos. Suas duas principais ações são a inibição da produção de citocinas, como TNF- α e IL-1, pelos macrófagos ativados e o bloqueio da ativação das células Th pelos macrófagos. A inibição experimental da IL-10 causa um processo inflamatório intestinal, provavelmente secundário à ativação descontrolada de macrófagos (ABBAS & LICHTMAN, 2004).

2.3- Citocinas e Sistema Amniótico

O líquido amniótico (LA) encontra-se no espaço delimitado pelo âmnio e cório liso. Dentro da câmara amniótica encontra-se o feto que com suas funções vitais contribui com a 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. No início da gestação, o filme líquido formado pelo LA

evita a formação de aderências entre o feto e o âmnio, prevenindo certas 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 *et al.*, 1985).

O volume do LA é controlado por vários mecanismos: Durante a primeira metade da gestação, a composição do LA é bastante semelhante ao fluido extracelular. Na décima-segunda semana, o volume é de aproximadamente 50 ml. Já na décima oitava semana, o volume pode atingir até 1000 ml, tendendo a decair até o momento do parto.

Quanto à sua composição, o LA é isotônico e contém proteínas de peso molecular de até 170.000. Com o avançar da gestação, o feto passa a contribuir cada vez mais com o conteúdo do LA, através da liberação de seus fluidos orgânicos (urina, mecônio e descamação epitelial). O feto a termo pode deglutir até 500 ml de LA ao dia. Fetos portadores de anomalias do trato gastrointestinal, ou urinário, podem apresentar polidrâmnio ou oligoâmnio.

As origens do LA são diversas. O cório liso contribui para a formação do LA por permitir transporte de água por 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.

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 *et al.*, 1985).

O LA também é inalado pelo trato respiratório do feto. Próximo ao termo, esse volume pode chegar a 200 ml/dia. O LA é hipotônico em relação ao plasma fetal e existe um gradiente de troca que chega a permitir a transferência de até 800 ml/ dia.

A reabsorção do LA se dá por vias distintas: a deglutição é um dos mais importantes deles. 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 com a maturação e o desenvolvimento do trato gastrointestinal, notadamente o intestino delgado. O LA também é fonte de energia e proteína para o feto, estimulando a maturação da capacidade absorptiva do enterócito (GITLIN *et al.*, 1972).

A composição química do LA é de 98-99% de água e 1-2% de solutos, que podem ser orgânicos e inorgânicos. Esta composição é dinâmica, sendo que 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. Uréia, creatinina e ácido úrico também são constituintes do LA.

A taxa de proteínas no LA não é muito alta e provém principalmente da mãe. No entanto, o feto contribui com frações específicas (α -feto proteína, IgA, IgG).

Em relação aos aminoácidos, estes em geral estão mais elevados no início da gestação e decaem durante a progressão desta. No entanto, a serina e a taurina parecem aumentar de concentração quando próximo ao termo.

Outras substâncias são encontradas no LA: renina, angiotensina, fontes energéticas (glicose, piruvato, lactato), prostaglandinas, além de hormônios.

Na gastrosquise, o LA em contato com as alças expostas leva a um espessamento e encurtamento dos intestinos (ALBERT *et al.*, 1993). Modelos experimentais de gastrosquise em coelhos demonstraram que quando o intestino é exposto ao LA ocorre grande encurtamento da víscera. Quando o intestino exposto é mantido fora do saco amniótico (sem contato com o LA) esse encurtamento não ocorre (ALBERT *et al.*, 1993). 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 citocinas, TNF- α , 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.

Esta inflamação crônica e prolongada do intestino na vida intra-uterina está possivelmente relacionada à disfunção intestinal após o nascimento. Essa disfunção propicia a translocação bacteriana e acaba por interferir na morbidade do paciente durante o longo período de hospitalização após o nascimento (MORRISON *et al.*, 1998).

Os níveis de citocinas no LA apresentam elevações progressivas com a evolução da gestação. Atualmente, têm sido feitas tentativas de quantificar suas concentrações, além de detectar possíveis elevações durante a evolução da gestação. Entretanto, a cinética da produção de citocinas no LA ainda não é bem compreendida. Sugere-se que tenham um papel regulatório sobre o parto, através do estímulo à produção de prostaglandinas.

Aparentemente, no final da gestação, ocorre um processo inflamatório fisiológico nos tecidos cório-amnióticos, mediados pela produção local de citocinas (OLAH *et al.*, 1996; OPSJLN *et al.*, 1993). Estudos demonstraram níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, no LA ao final da gestação (MORRISON *et al.*, 1998).

Observou-se, ainda, que a intensidade de infiltrado leucocitário se correlaciona positivamente com os níveis destas citocinas. As doenças inflamatórias e o retardo de crescimento intra-uterino são acompanhados de alterações nos padrões de citocinas do LA. Acredita-se que as citocinas no LA estejam relacionadas com a evolução de uma gravidez bem sucedida, além de estarem envolvidas com os eventos imuno-biológicos que desencadeiam o trabalho de parto. Esta observação foi comprovada por estudos clínicos e experimentais, os quais demonstraram que, no primeiro trimestre, as concentrações de TNF- α , IL-1 e IL-6 no LA são praticamente nulas. A IL-6 pode ser detectada apenas no segundo trimestre. Enquanto que, ao termo, as concentrações de TNF- α , IL-1 e IL-6 aumentam progressivamente até o trabalho de parto, momento em que alcançam seus picos no LA (KEELAN *et al.*, 1997).

A fonte das citocinas do LA tem sido investigada e, aparentemente, as membranas fetais amnion e córion são as responsáveis. Culturas de células amnióticas apresentaram produção de IL-6 e IL-8, a qual foi estimulada pela adição de IL-1 e TNF- α . A administração de corticosteróide foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 e IL-8 pela metade nestas culturas (GUNN *et al.*, 1996). Outro fator que sugere sua produção pelas membranas fetais é o fato das citocinas não cruzarem a barreira placentária. A impermeabilidade da placenta às citocinas também explica a falta de correlação entre as dosagens séricas maternas e do LA em condições inflamatórias (AALTONEN *et al.*, 2005; REISENBERGER *et al.*, 1996).

Estudos ainda concluíram que a presença de mecônio no LA apresenta efeito quimiotático sobre leucócitos e citocinas, como IL-6 e IL-8 (DE BEAUFORT *et al.*, 1998; YAMADA *et al.*, 2000).

2.4- Corticosteróides e Resposta Inflamatória

Os corticosteróides têm a capacidade de impedir ou suprimir a resposta inflamatória, independentemente do agente indutor ser de natureza radiante, mecânica, química, infecciosa ou imunológica. Apesar da administração de corticosteróides ser uma terapia paliativa, uma vez que a causa subjacente da doença persista, a supressão dos efeitos deletérios da inflamação é de grande valor. Suas ações imunossupressoras e anti-inflamatórias estão ligadas de forma indissolúvel, pois ambas resultam, principalmente, da inibição de funções específicas dos leucócitos, como a síntese e a ação das citocinas. Os corticosteróides inibem os fenômenos iniciais do processo inflamatório, como edema, deposição de fibrina, dilatação capilar, emigração de leucócitos e atividade fagocitária. Suprimem, também, as manifestações tardias, como proliferação de capilares e fibroblastos, deposição de colágeno e cicatrização.

Investigações demonstraram que os corticosteróides inibem a capacidade das células mononucleares fagocitárias em elaborar diversas substâncias quimiotáticas, bem como fatores que medeiam o aumento da permeabilidade vascular e a vasodilatação, incluindo, dentre outros: (1) ácido araquidônico e seus metabólitos, com prostaglandinas e leucotrienos; (2) fator de ativação de plaquetas; (3) TNF- α e (4) IL-1.

Ao inibirem a síntese e liberação de IL-1, os corticosteróides também suprimem a ativação das células Th. Desta forma, reduzindo sua toxicidade e inibindo a síntese de várias citocinas pelas células Th, como TNF- α e IFN- γ . A inibição do crescimento é outro efeito bem conhecido dos corticosteróides, tanto em seres humanos como em tecidos de animais de laboratório (GILMAN, 1991). AGHAJAFARI *et al.* (2002), em estudo metanalítico, reportaram que a administração pré-natal de corticosteróides em modelos animais tem efeitos benéficos ao desenvolvimento pulmonar e intestinal, porém podem causar retardo do crescimento fetal intra-uterino.

3- OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do corticosteróide sobre o processo inflamatório intestinal de fetos de ratas Spreague-Dowley submetidos a gastrosquise, analisando:

1- Morfometria intestinal.

2- Histologia intestinal.

3- Bioquímica intestinal, através da quantificação de proteína e citocinas intestinais: TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6 e IL-10.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- 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.

4.2- Animal

Fêmeas de ratos Sprague-Dawley (n=24) com peso ao redor de 250g foram submetidas ao acasalamento. O casal foi mantido em conjunto durante uma noite. No dia seguinte, a região genital da fêmea foi examinada para verificação de mancha vaginal de esperma. A presença da mancha vaginal configura o acasalamento e é considerado dia zero de gravidez (tempo de gestação normal de ratas até o termo é de aproximadamente 22 dias).

4.3- Constituição dos grupos

Para as análises morfológica e histológica foram operadas 14 ratas, enquanto para a análise bioquímica 10 ratas grávidas. Houve a divisão em dois grupos, dependendo da administração materna randomizada de solução fisiológica ou corticosteróide:

- (1) Grupo I (n=78), fetos submetidos à cirurgia com 18,5 dias de idade gestacional, com administração materna de solução fisiológica intra-peritoneal.
- (2) Grupo II (n=78), fetos submetidos à cirurgia com 18,5 dias de idade gestacional, com administração materna de corticosteróide intra-peritoneal.

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

Grupo I: Cirurgia com 18,5 dias de gestação e administração materna de solução salina intra-peritoneal (n=60 para morfometria e histologia e n=18 para bioquímica).

Subgrupos (n=20 para morfometria e histologia e n=6 para bioquímica):

G: Fetos submetidos à gastrosquise.

C: Fetos normais (controle).

S: Fetos apenas manipulados fora do útero (sham).

Grupo II: Cirurgia com 18,5 dias de gestação e administração materna de corticosteróide intra-peritoneal (n=60 para morfometria e histologia e n=18 para bioquímica).

Subgrupos (n=20 para morfometria e histologia e n=6 para bioquímica):

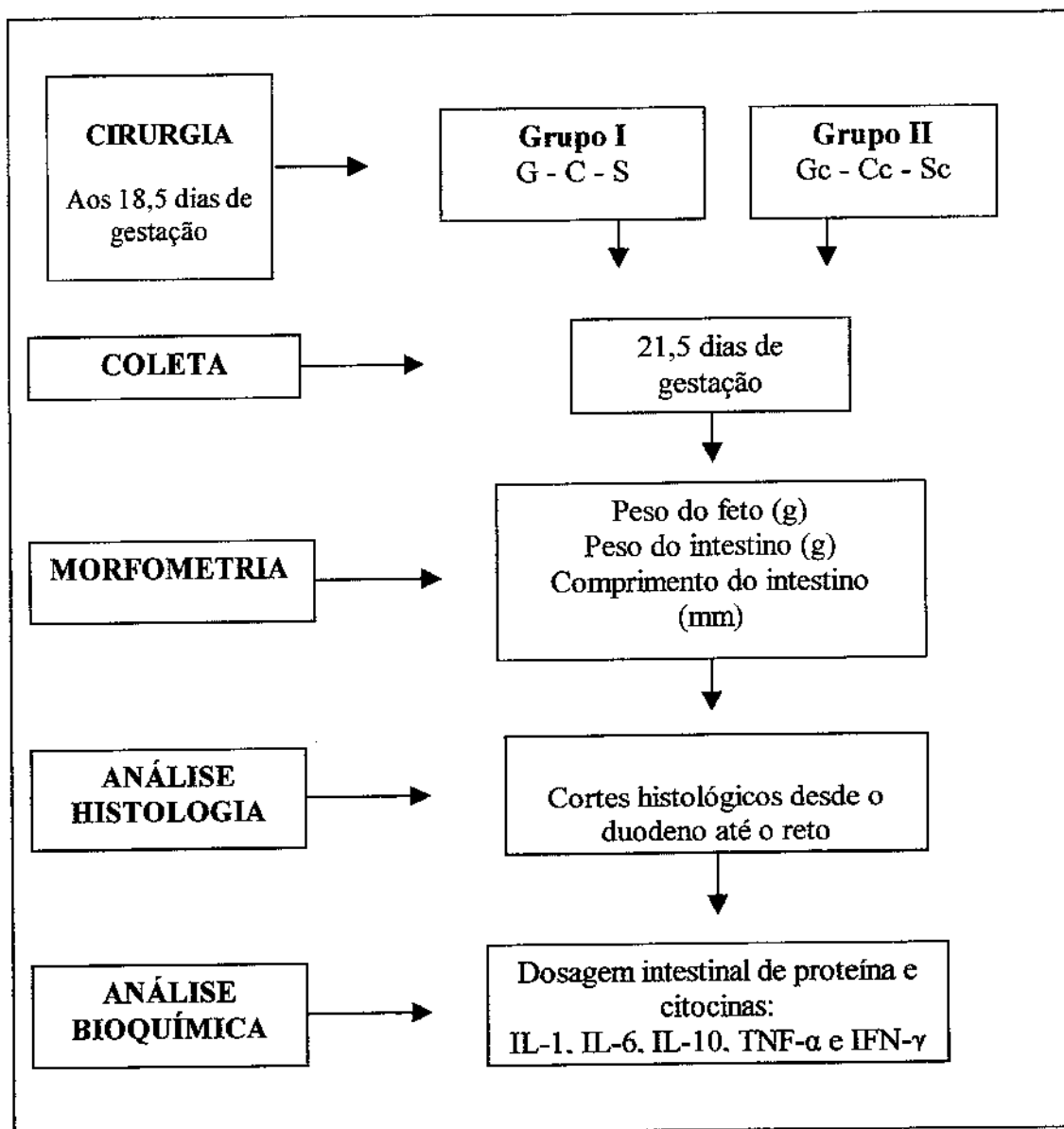
Gc: Fetos submetidos à gastrosquise.

Cc: Fetos normais (controle).

Sc: Fetos apenas manipulados fora do útero (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 coletados imediatamente. O intestino foi fixado imediatamente em solução adequada para posterior análise histológica. Os fetos dos grupos destinados à análise bioquímica tiveram seus intestinos ressecados e preparados em solução apropriada para posterior congelamento.

4.4- Organograma do experimento



4.5- Procedimento cirúrgico (Figura 1)

Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas com oferecimento de ração específica e água *ad libitum*. Os procedimentos cirúrgicos ocorreram às terças-feiras pela manhã, com idade gestacional de 18,5 dias. A coleta de dados ocorreu com 21,5 dias de gestação, realizada sempre às sextas-feiras pela manhã.

Após aclimação 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 (Rompum®- Bayer do Brasil Ltda) na dose de 0,6 ml por animal via intra-muscular aplicado na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha de calibre 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 transcorre 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 a laparotomia mediana em dois planos (pele e aponeurose/peritôneo).

Neste momento, foi realizada a administração materna de 2 ml de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%)(grupo I) ou 0,25 mg/kg de dexametasona diluída para 2 ml de solução salina fisiológica (grupo II). A administração foi efetuada de forma randomizada, sempre na região intra-peritoneal peri-hepática. Após dez minutos, o útero bicornio foi delicadamente exposto e protegido com gaze estéril embebidas em solução salina fisiológica aquecida a 38 graus Celsius.

Os fetos foram contados da região proximal para distal em relação ao colo uterino, iniciando-se a contagem pelo corno direito. O primeiro e o último feto de cada corno não foram utilizados no experimento pelo risco de abortamento relacionado à manipulação desses animais. O segundo feto, contado a partir do istmo uterino direito, foi considerado o primeiro feto da numeração, sendo submetido à gastrosquise,

o feto seguinte controle e o subsequente sham. Esta seqüência foi sucessivamente repetida, do corno direito para o corno esquerdo.

Sob microscopia óptica estereoscópica (microscópio JF- Vasconcellos® - 4,5 X), uma sutura em bolsa com fio de Prolene® calibre 6-0 foi realizada na parede uterina. Em seguida, o útero foi aberto em suas duas camadas, muscular e membrana amniótica. O feto foi exposto pela incisão uterina até a altura da inserção do cordão umbilical e mantido com o abdome superior e o tórax no interior do útero materno. Foi realizada a retirada parcial do membro inferior direito e do membro inferior esquerdo, para facilitar a exposição da região abdominal a ser incisada. Esta manobra técnica diminui o risco de lesão da vasculatura umbilical durante o procedimento da gastrosquise.

Para a realização da gastrosquise, uma incisão de laparotomia para-umbilical direita, com extensão padronizada em 5mm, abriu a cavidade abdominal fetal, com o cuidado de não lesar os vasos umbilicais e o fígado (Figura 1). As alças intestinais foram expostas com facilidade pela compressão delicada do abdome fetal com hastes de algodão esterilizadas (cotonetes® Johnson & Johnson do Brasil). Após a realização da gastrosquise, o feto foi, cuidadosamente, recolocado na cavidade uterina e o útero foi fechado pela sutura em bolsa previamente realizada. 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 subsequente, 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. Em seguida, foi recolocado na cavidade uterina.

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

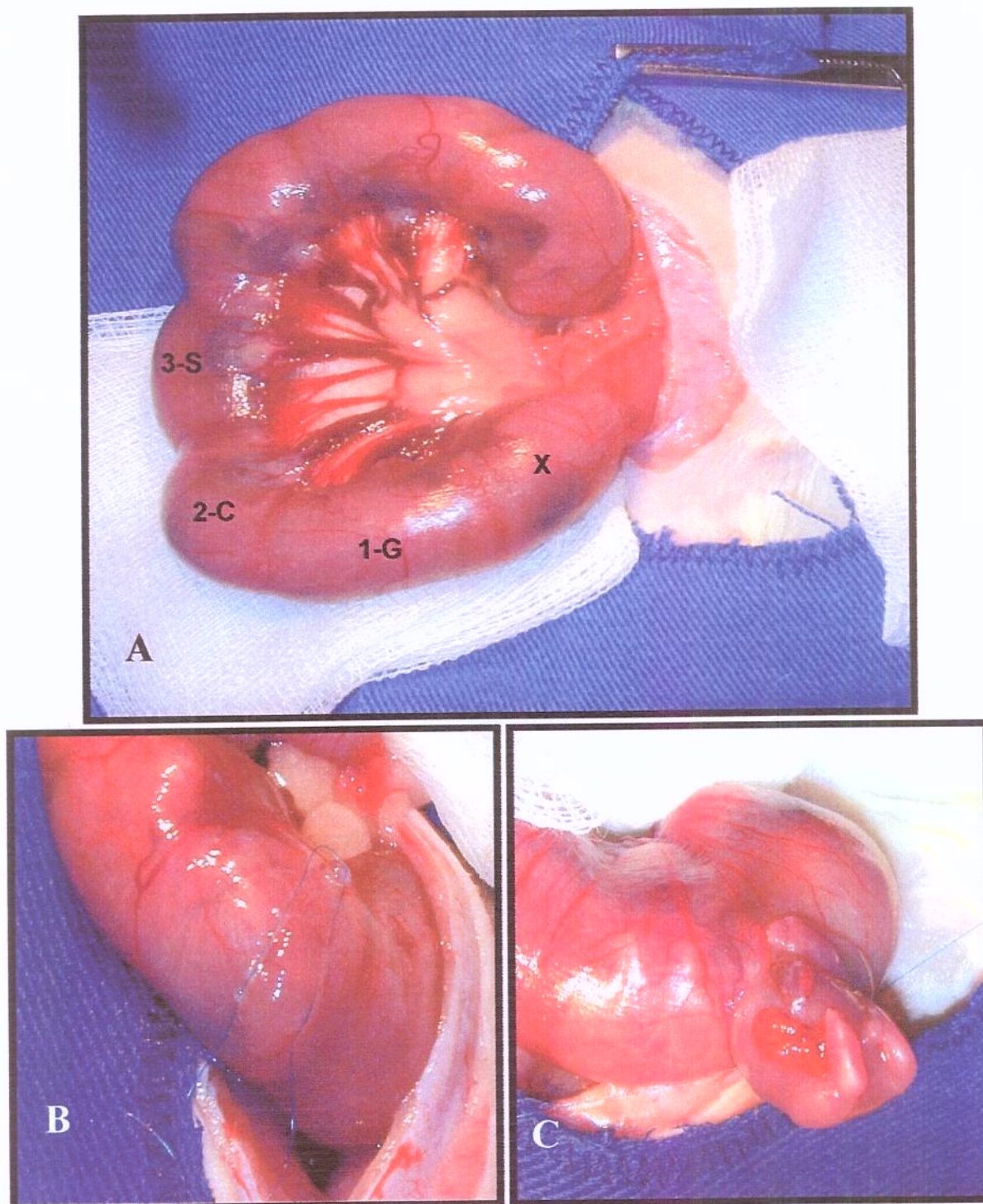


Figura 1- Modelo experimental de gastrosquise: (A) exposição do corno uterino direito e sequência da classificação fetal; (B) abertura da cavidade uterina e (C) criação da gastrosquise.

4.6- Coleta de dados (Figura 2)

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

O abdome fetal foi aberto por incisão mediana e dissecado sob foco de luz e com auxílio de microscopia óptica, expondo 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) e o mesentério dissecado com pinças oftalmológicas. As alças puderam, então, ser retificadas sem tensão em prancha de cortiça para obtenção de seu comprimento (em milímetros), com a utilização de régua e paquímetro de precisão (Figura 2).

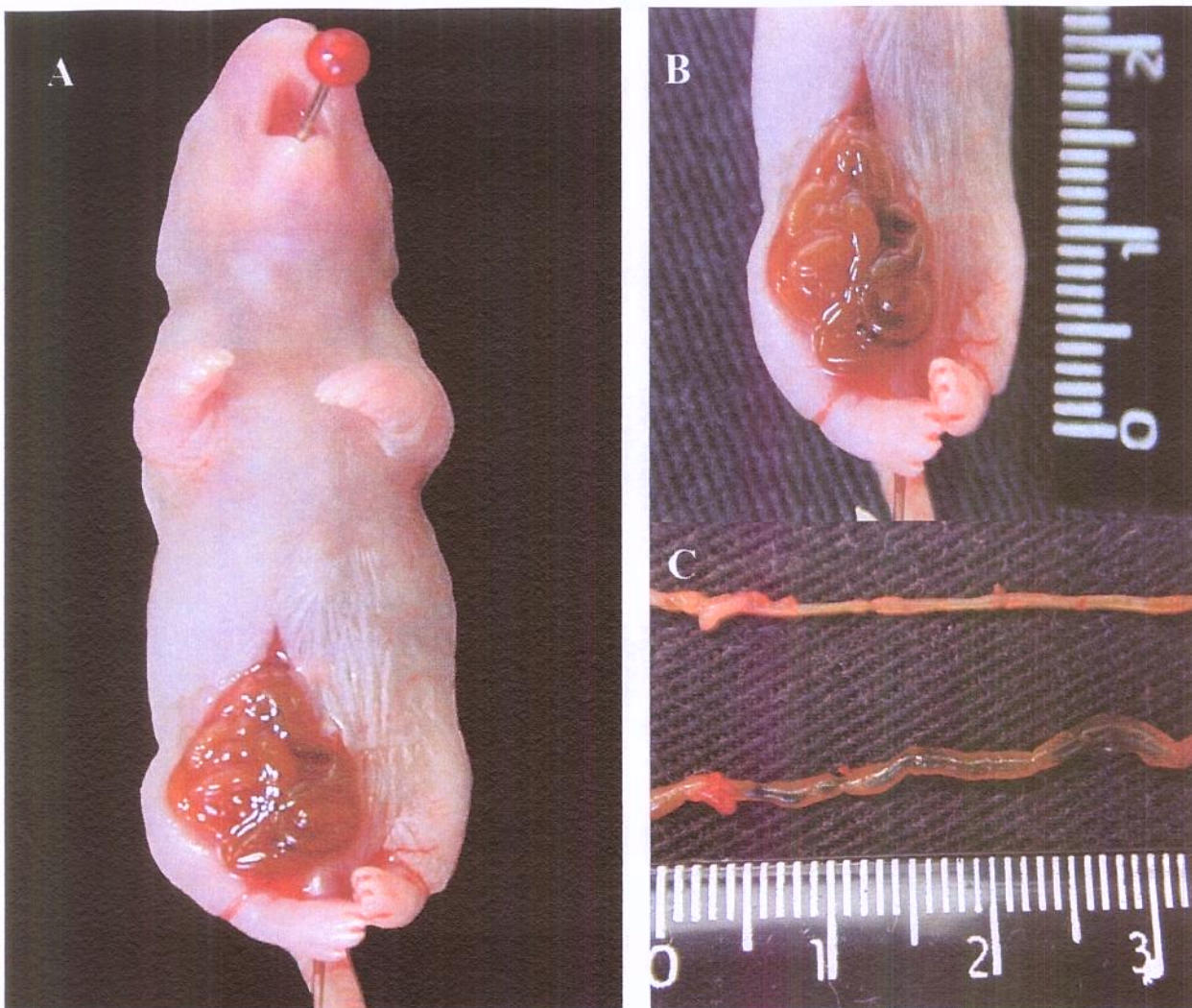


Figura 2- (A) Coleta fetal; (B) coleta intestinal e (C) mensuração intestinal de feto controle (acima) e gastrosquise (abaixo).

4.7- Avaliação Morfométrica

A obtenção do peso corporal (PC), peso intestinal (PI) e comprimento intestinal (CI) permitiram o estudo estatístico dessas grandezas nos diversos subgrupos. No entanto, observou-se a necessidade de criar relações entre esses parâmetros, que melhor demonstrassem as diferenças entre os subgrupos. Foram criadas as razões matemáticas: (1) PI/PC , com o objetivo de se excluir a variável do PC sobre a avaliação do PI; (2) PI/CI , possibilitando eliminar as variações do CI sobre o PI; (3) $PC-PI$, a qual permite a avaliação do PC real, independente das variações do peso intestinal.

4.8- Avaliação Histológica

O intestino foi dividido em quatro segmentos a partir do ângulo de Treitz em direção ao íleo distal, cada fragmento com aproximadamente 4 cm de comprimento. O primeiro segmento compreendia a porção de jejuno proximal. O segundo segmento compreendia porção de jejuno distal. O terceiro, de íleo e o quarto da região da válvula íleocecal e intestino grosso, até o reto extra-peritoneal. Todos os segmentos foram numerados, acomodados paralelamente em sequência, da esquerda para a direita, da porção proximal para a distal, em molduras próprias de histologia. As molduras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% fresco e coradas com Hematoxilina/Eosina (H&E) para identificação histológica.

Os cortes histológicos foram realizados no sentido transversal, com espessura de 5µm. Foi convencionada a análise dos segmentos intestinais intermediários (jejuno-ileal), desta forma assegurando que, nos casos de fetos com gastrosquise, o segmento exposto ao LA seria sempre analisado e, além disso, que a comparação com os respectivos controle e sham fosse apropriada.

Os cortes histológicos intestinais transversais foram fotografados utilizando o foto-microscópio Nikon Eclipse E800, com ampliação de 20 vezes para a avaliação do diâmetro intestinal (DI) e de 200 vezes para a medida das camadas da parede intestinal.

As imagens foram digitalizadas, possibilitando a medida do DI, camadas mucosa e submucosa (MU), muscular circular (MC), muscular longitudinal (ML) e serosa (SE) através do programa Image Pro Plus®. As medidas, em micrômetros (µm), foram realizadas em orientação radial, nos quatro quadrantes de 5 cortes sequenciais, totalizando 20 medidas de cada variável para cada feto. Foram analisadas sete tríades (G, C e S) de cada Grupo (I e II).

4.9- Análise bioquímica

O intestino dos respectivos fetos com gastrosquise, controle e sham dos grupos I e II destinados à análise bioquímica foram colhidos. Dezoito fetos por grupo, num total de 36 fetos, foram destinados à dosagem de proteína total e TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 e IL-10 intestinal.

Imunoprecipitação e ELISA para determinação das citocinas: Fragmentos de intestino foram homogeneizados em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado à 11000 rpm por 20 minutos. No sobrenadante, determinou-se a concentração de proteína em miligramas, utilizando o método de BRADFORD (1976) e, posteriormente, realizou-se a imunoprecipitação com anticorpo específico. Após incubação, os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose 6 MB por 2 horas à 4°C e decantados por centrifugação por 20 minutos à 4°C/11000 rpm.

O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos, com tampão de lavagem (2 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Tris-HCl; 1 mM RDTA; 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado, ficando-se apenas com as proteínas precipitadas (imunocomplexos). Os níveis de citocinas teciduais, em picogramas por ml, foram, então, determinadas pelo extrato de proteínas totais do tecido intestinal (2,0mg/ml) por meio do ELISA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), seguindo as instruções do fabricante.

4.10- Metodologia Estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência 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. Essa análise faz 2 comparações ao mesmo tempo: uma em que se compara os grupos, Grupo I versus Grupo II (sem e com corticosteróide) em cada grupo experimental (G, C e S), através do teste de comparação múltipla de Duncan, e a outra que compara as tríades (G vs C vs S) entre si em cada grupo (Grupo I e Grupo II), através do teste de contrastes de perfil. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$.

5- RESULTADOS

Na fase inicial dos experimentos, dentre as primeiras 14 ratas operadas para as análises morfométrica e histológica, três (21%) morreram devido à complicações anestésicas. A mortalidade fetal, nesta primeira fase dos experimentos, incluiu sete (14%) dos 47 fetos submetidos à gastrosquise e um (0,02%) dos 41 fetos sham, os quais foram excluídos do estudo. A mortalidade fetal foi, provavelmente, causada pela manipulação excessiva ou por trauma durante a devolução do feto à cavidade uterina, não tendo ocorrido nenhum caso de abortamento.

Na segunda fase do estudo, quando foram operadas outras 10 ratas para a coleta de material para análise bioquímica, não houve qualquer mortalidade materna ou fetal.

Durante a coleta, no dia do sacrifício, observou-se que, macroscopicamente, os intestinos dos fetos com gastrosquise eram edemaciados, aderidos e recobertos por uma película esbranquiçada, muito similar ao defeito observado em humanos.

5.1- Resultados da análise morfométrica (Tabela 1)

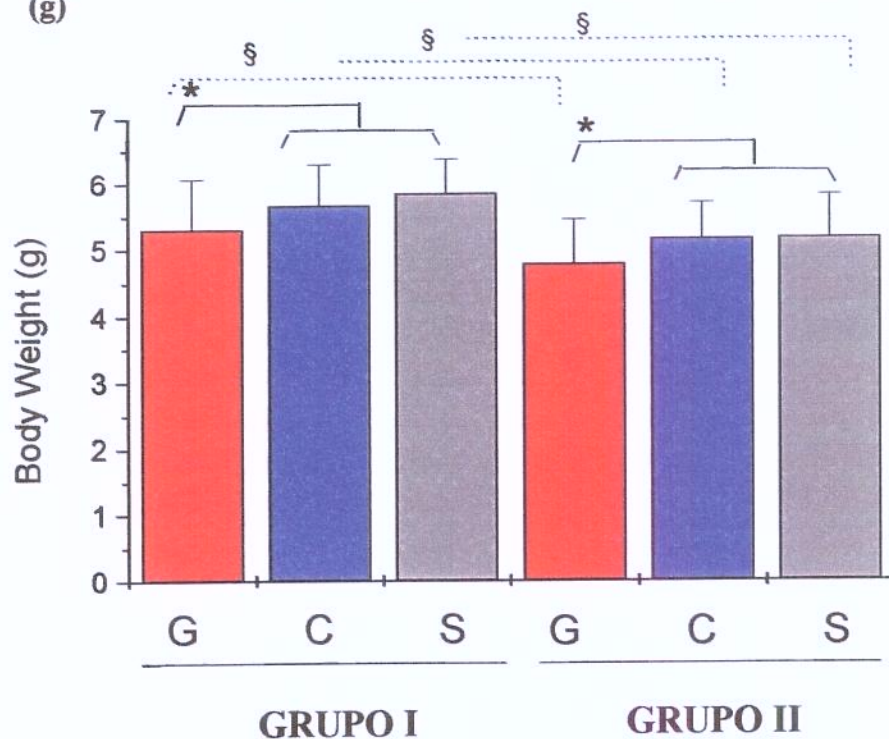
5.1.1- Peso corporal (Gráfico 1) (Figura 3)

As médias do PC para os fetos do Grupo I (sem corticosteróide) foram: G= 5,32g ($\pm 0,75$), variando de 3,85 a 6,29 g; C=5,68g ($\pm 0,62$), variando de 4,35 a 6,42g e S=5,86g ($\pm 0,53$), variando de 4,69 a 6,75g. O PC está significativamente reduzido nos fetos G ($p < 0,005$ ANOVA entre GxC e GxS).

Para os fetos do Grupo II (com corticosteróide) os resultados de peso corporal foram: Gc= 4,79g ($\pm 0,67$), variando de 3,64 a 6,09g; Cc=5,17g ($\pm 0,53$), variando de 3,86 a 6,41g e Sc=5,18g ($\pm 0,65$), variando de 3,92 a 6,52g. O PC está significativamente reduzido nos fetos Gc ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcxSc).

Na comparação do PC médio entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) observou-se que todos os subgrupos do Grupo II apresentaram PC significativamente reduzido ($p < 0,05$ ANOVA).

**Peso Corporal
(g)**



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide.

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; *p < 0,05 Intra-Grupo (G X C e G X S); §p < 0,05 Inter-Grupo (G X G, C X C e S X S).

Gráfico 1- Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos com gastrosquise, controle e sham, Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

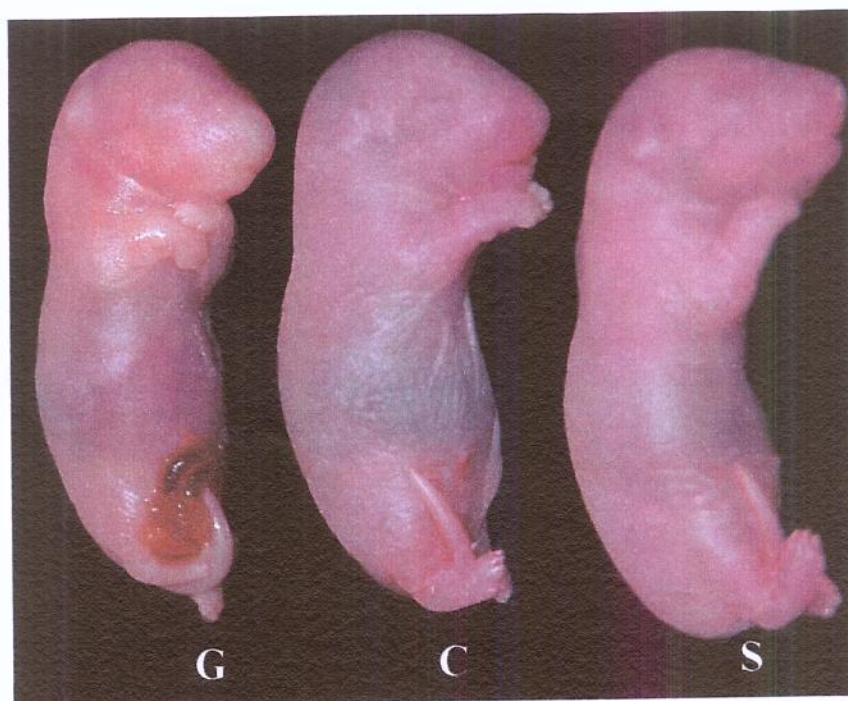


Figura 3- Foto de uma tríade no dia da coleta (21,5 dias de gestação): G= feto com gastrosquise, C= feto controle e S= feto sham, evidenciando o RCUI no feto G.

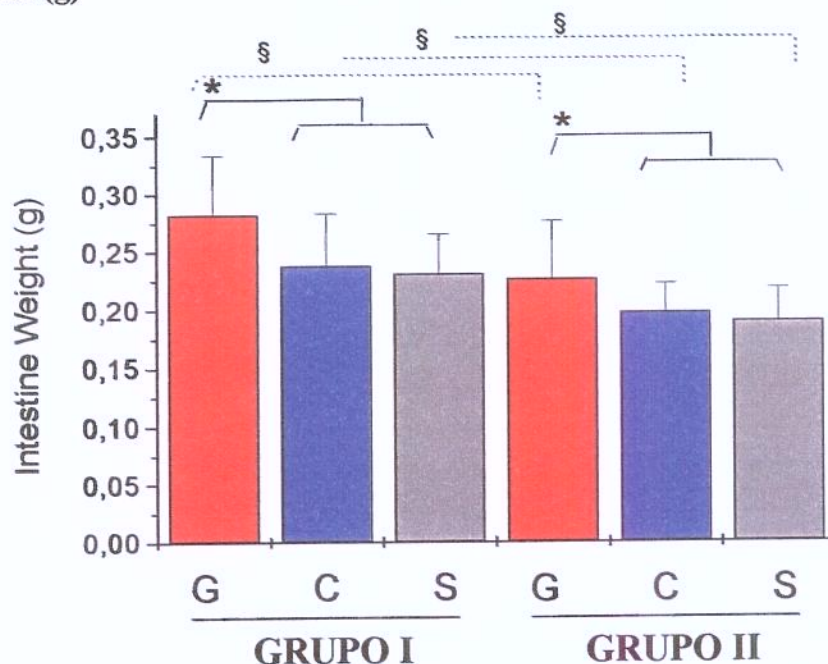
5.1.2- Peso Intestinal (Gráfico 2)

As médias do PI para os fetos do Grupo I foram: G=0,283g ($\pm 0,051$), variando de 0,19 a 0,38g; C=0,238g ($\pm 0,045$), variando de 0,184 a 0,354g; S=0,231g ($\pm 0,034$), variando de 0,186 a 0,334g. O PI está significativamente elevado nos fetos G ($p < 0,005$ ANOVA entre GxC e GxS).

As médias do PI para os fetos do Grupo II foram: Gc=0,227g ($\pm 0,050$), variando de 0,119 a 0,331g; Cc= 0,197g ($\pm 0,023$), variando de 0,144 a 0,244g; Sc=0,189g ($\pm 0,028$), variando de 0,130 a 0,230g. O PI está significativamente elevado nos fetos Gc ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcxSc).

Na comparação do PI médio entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) observou-se que todos os subgrupos do Grupo II apresentaram PI significativamente reduzidos ($p < 0,05$ ANOVA).

Peso Intestinal (g)



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide.

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; * $p < 0,05$ Intra-Grupo (G X C e G X S); § $p < 0,05$ Inter-Grupo (G X G, C X C e S X S).

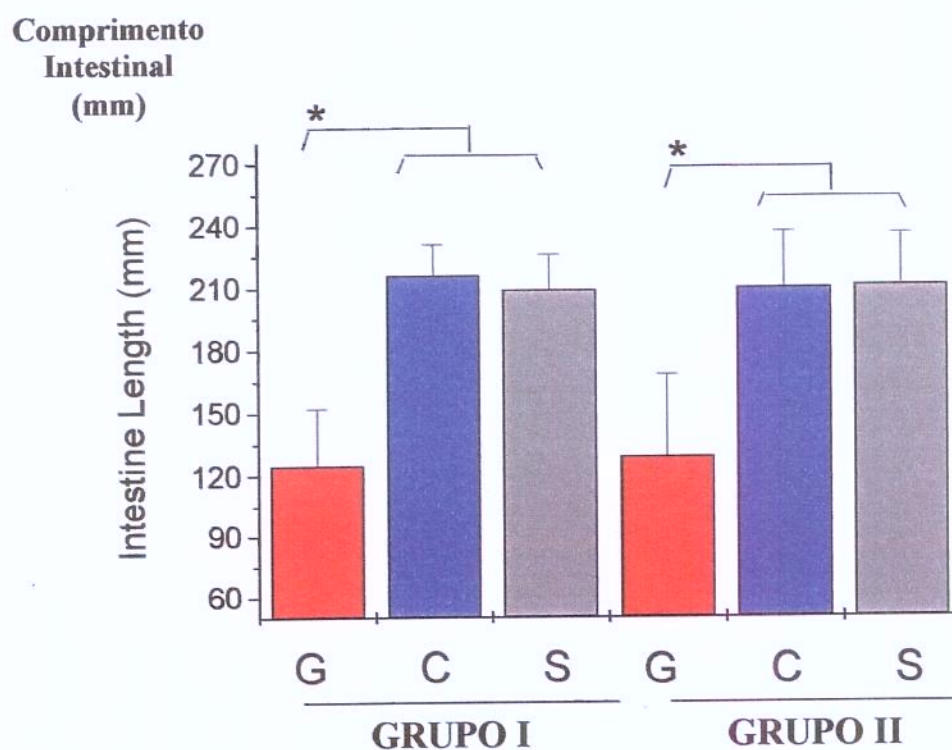
Gráfico 2- Comparação entre as medidas do peso intestinal dos fetos com gastrosquise, controle e sham, nos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

5.1.3- Comprimento Intestinal (Gráfico 3)

As médias dos CI para os fetos do Grupo I foram: G=125mm ($\pm 27,1$), variando de 80 a 168mm; C=216mm ($\pm 15,2$), variando de 194 a 245mm; S= 209mm ($\pm 17,2$), variando de 156 a 232mm. O CI está significativamente reduzido nos fetos G ($p < 0,005$ ANOVA entre GxC e GxS).

As médias dos CI para os fetos do Grupo II foram: G=129mm ($\pm 38,5$), variando de 60 a 195mm; C=209mm ($\pm 27,4$), variando de 160 a 267mm; S=211mm ($\pm 24,7$), variando de 160 a 267 mm. O CI está significativamente reduzido nos fetos Gc ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcxSc).

Na comparação do CI médio entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) não houve diferenças significativas ($p > 0,05$ ANOVA).



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; * $p < 0,05$ Intra-Grupo (G X C e G X S)

Gráfico 3- Comparação entre as medidas do comprimento intestinal dos fetos com gastrosquise, controle e sham, nos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

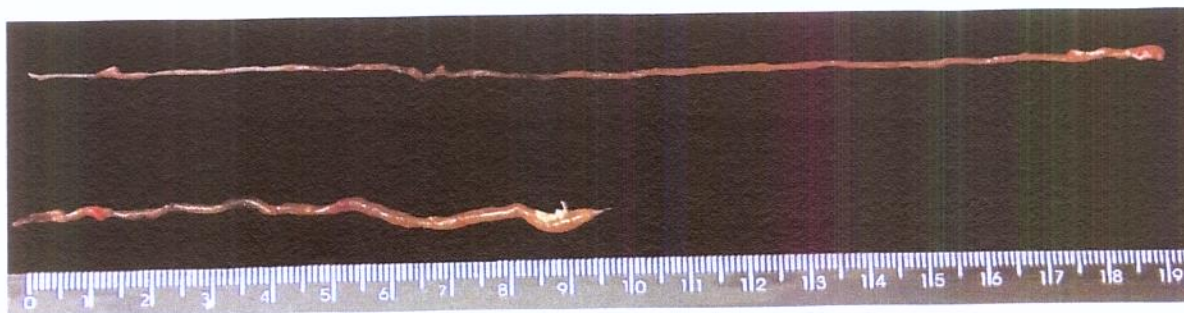


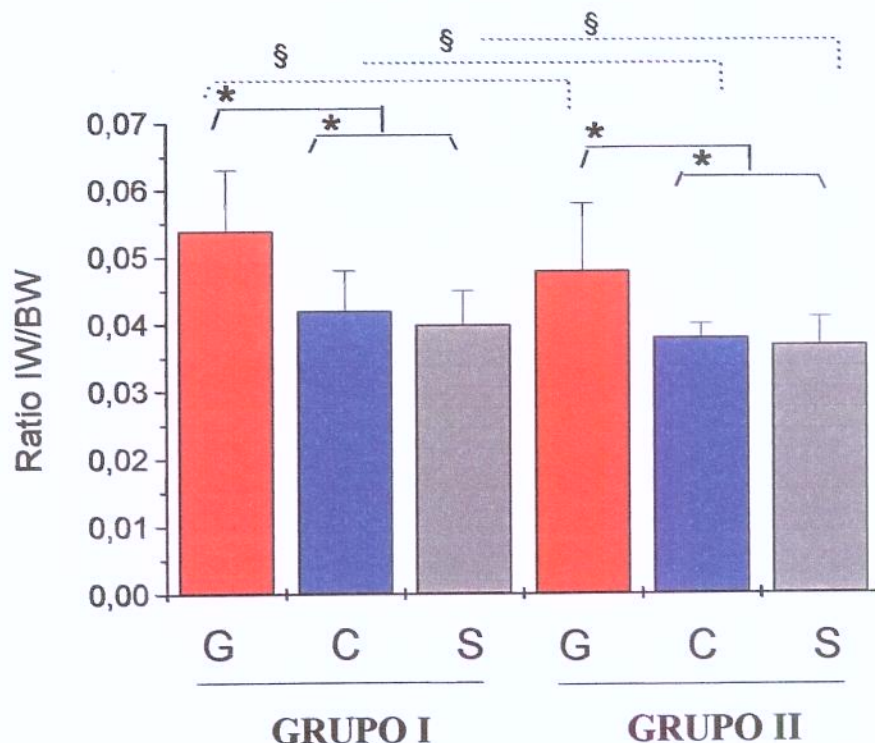
Figura 4- Fotografia evidenciando a diferença de comprimento intestinal entre fetos G (gastrosquise) e C (controle).

5.1.4- Relação Peso Intestinal/Peso Corporal (PI/PC) (Gráfico 4)

As médias das relações PI/PC para os fetos do Grupo I foram: G=0,054 ($\pm 0,009$), variando de 0,039 a 0,071; C=0,042 ($\pm 0,006$), variando de 0,036 a 0,059; S=0,039 ($\pm 0,0050$), 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: Gc=0,048 ($\pm 0,01$), variando de 0,031 a 0,073; Cc=0,038 ($\pm 0,002$), variando de 0,03 a 0,043; Sc=0,036 ($\pm 0,003$), variando de 0,028 a 0,042 ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcxSc).

Na comparação inter-grupos do PI/PC médio entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) não houve diferenças significativas ($p > 0,05$ ANOVA). Ao se ajustar o PI em relação ao PC dos fetos, observou-se um aumento ainda mais intenso no PI dos fetos G, uma vez que seu PC é reduzido.



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide

G= gastrosquise; **C**= controle; **S**= sham; * $p < 0,05$ Intra-Grupo (G X C e G X S); § $p < 0,05$ Inter-Grupo (G X G, C X C e S X S)

Gráfico 4- Comparação entre a relação PI/PC dos fetos com gastrosquise, controle e sham, nos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

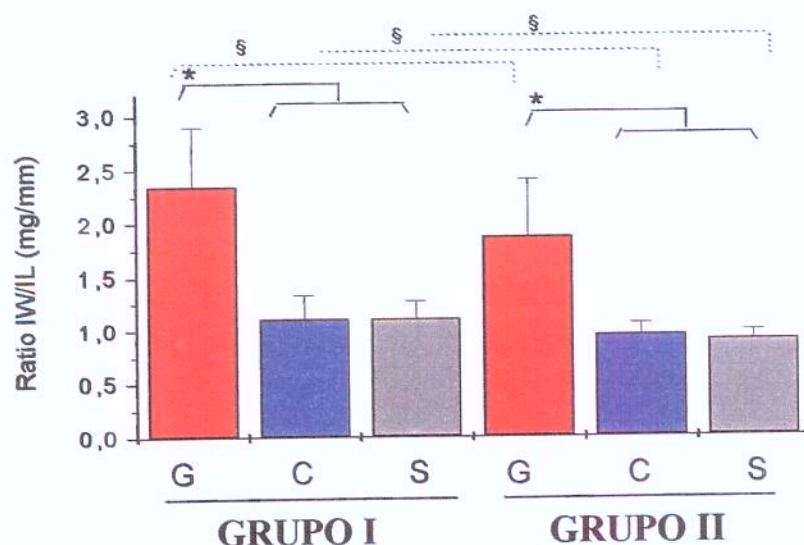
5.1.5- Relação Peso Intestinal/Comprimento Intestinal (PI/CI) (Gráfico 5)

As médias das relações PI/CI para os fetos do Grupo I foram: G=2,35 mg/mm ($\pm 0,55$), variando de 1,23 a 3,04 mg/mm; C=1,11 mg/mm ($\pm 0,22$), variando de 0,83 a 1,68 mg/mm; S=1,11 mg/mm ($\pm 0,16$), variando de 0,83 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: Gc=1,87 mg/mm ($\pm 0,54$), variando de 0,93 a 2,79 mg/mm; Cc=0,95 mg/mm ($\pm 0,11$), variando de 0,82 a 1,25 mg/mm; Sc=0,90 mg/mm ($\pm 0,09$), variando de 0,72 a 1,09 mg/mm ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcxSc).

Essa relação é significativamente maior nos animais submetidos à gastrosquise em ambos os Grupos. Ao se dividir o PI pelo CI ocorre uma sensibilização nos fetos G, uma vez que o numerador é maior e o denominador menor, traduzindo o real aumento no peso intestinal por mm de intestino.

PI / CI



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; *p < 0,05 Intra-Grupo (G X C e G X S); \$p < 0,05 Inter-Grupo (G X G, C X C e S X S)

Gráfico 5- Comparação entre as relações PI/CI dos fetos com gastrosquise, controle e sham, nos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

5.1.6- Diferença Peso Corporal - Peso Intestinal (PC-PI) (Gráfico 6)

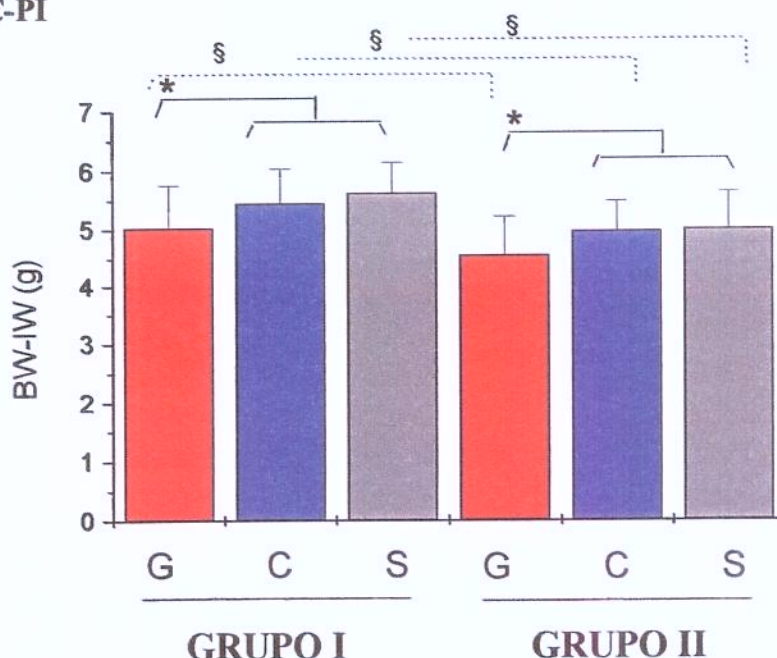
As médias das diferenças entre peso corporal e peso intestinal para os fetos do Grupo I foram: G=5,03g ($\pm$ 0,72), variando de 3,59g a 5,98g; C=5,45g ($\pm$ 0,59), variando de 4,17 a 6,16g; S=5,63g ($\pm$ 0,51), variando de 4,50g a 6,42g (p<0,005 ANOVA entre GxC e GxS).

Para os fetos do Grupo II os resultados foram: Gc= 4,56g ($\pm 0,65$), variando de 3,53g a 5,84g; Cc= 4,97g ($\pm 0,51$), variando de 3,71g a 6,17g; Sc=4,99g ($\pm 0,63$), variando de 3,77g a 6,30g ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcxSc).

Na comparação inter-grupos do PI/PC médio entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) houve redução significativa para o Grupo II ($p > 0,05$ ANOVA).

Quando se exclui o componente do peso intestinal do peso corporal total, anula-se o viés do PI ser maior nos fetos G, além do fato de haver redução do PI no grupo com administração de corticosteróide (Grupo II). Desta forma obteve-se uma medida mais fidedigna do quanto os fetos submetidos à gastrosquise são realmente mais leves que seus irmãos-controle (C e S).

PC-PI



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; * $p < 0,05$ Intra-Grupo (G X C e G X S); \$ $p < 0,05$ Inter-Grupo (G X G, C X C e S X S)

Gráfico 6- Comparação entre PC - PI nos fetos com gastrosquise, controle e sham, dos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

Tabela 1- Resultados das variáveis morfométricas de fetos de ratas submetidos à gastrosquise aos 18,5 dias de gestação sem (Grupo I) e com a administração materna de corticosteróide (Grupo II).

	GRUPO I			GRUPO II		
	G n=20	C n=20	S n=20	G c n=20	Cc n=20	Sc n=20
Peso Corporal (PC) (g)	5.32 (± 0.75)*	5.68 (± 0.62)	5.86 (± 0.53)	4.79 (± 0.67)#+	5.17 (± 0.53)§	5.18 (± 0.65)∞
Peso Intestinal (PI) (g)	0.28 (±0.051)*	0.23 (± 0.045)	0.23 (± 0.034)	0.22 (± 0.050)#+	0.19 (± 0.023)§	0.19 (± 0.028)∞
Comprimento Intestinal (CI) (mm)	125 (± 27.1)*	216 (± 15.2)	209 (± 17.2)	129 (± 38.5)#	209 (± 27.4)	210 (± 24.7)
PI/PC	0.054 (± 0.009)*	0.042 (± 0.006)	0.039 (± 0.005)	0.048 (±0.01)#+	0.038 (± 0.002)§	0.037 (± 0.003)∞
PI/CI (mg/mm)	2.35 (± 0.55)*	1.11 (± 0.21)	1.11 (± 0.16)	1.88 (± 0.53)#+	0.95 (± 0.11)§	0.90 (± 0.10)∞
PC- PI (g)	5.03 (± 0.72)*	5.45 (± 0.59)	5.63 (± 0.51)	4.56 (± 0.65)#+	4.98 (± 0.52)§	4.99 (± 0.63)∞

Os valores representam as médias (desvio padrão). Não houve diferenças significativas nas comparações entre C versus S ou Cc versus Sc.

G=gastrosquise sem corticosteróide; C=controle sem corticosteróide; S=sham sem corticosteróide; Gc=gastrosquise com corticosteróide; Cc=controle com corticosteróide; Sc=sham com corticosteróide.

*p< 0.05 versus C and S; #p< 0.05 versus Cc and Sc; +p< 0.05 versus G; §p< 0.05 versus C; ∞ p< 0.05 versus S.

5.2- Resultados da análise histológica (Tabela 2) (Figuras 5 e 6)

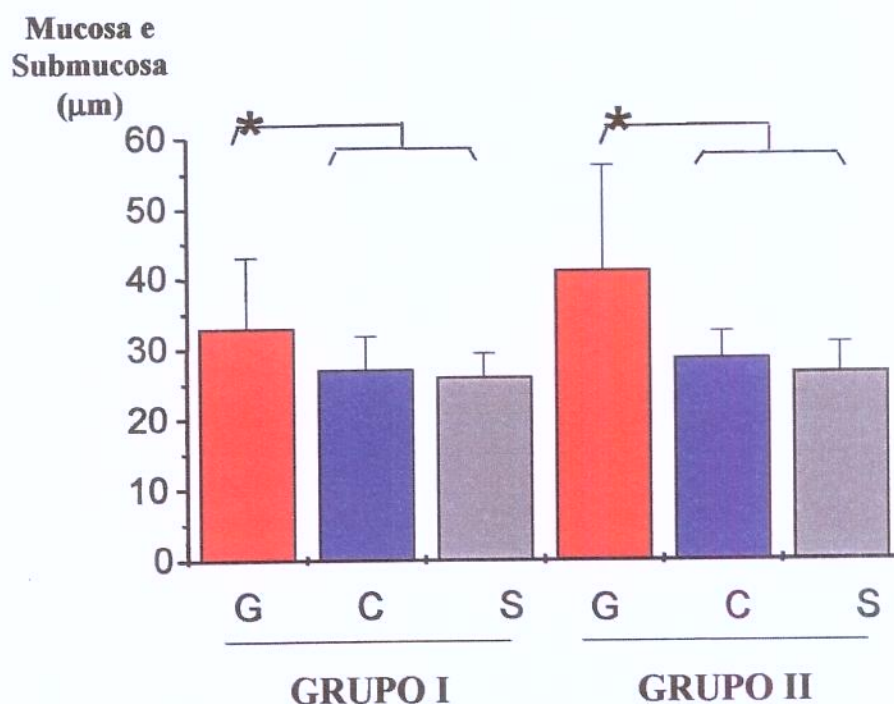
A histologia dos intestinos dos fetos portadores de gastrosquise revelou aumento da luz intestinal, aumento da espessura da parede intestinal, diminuição e espessamento das vilosidades, ectasia linfática e venosa do mesentério e deposição difusa de colágeno na camada submucosa.

5.2.1- Mucosa e Submucosa (MU) (Gráfico 7)

As médias da MU para os fetos do Grupo I (sem corticosteróide) foram: G= 33,37 μ m ($\pm$ 10,80), variando de 20,67 a 51,27 μ m; C=27,08 μ m ($\pm$ 4,72), variando de 18,30 a 35,44 μ m e S=26,85 μ m ($\pm$ 3,35), variando de 19,95 a 30,51 μ m. A espessura da MU está significativamente elevada nos fetos G ($p < 0,005$ ANOVA entre GxC e GxS).

Para os fetos do Grupo II (com corticosteróide) os resultados da MU foram: Gc= 40,97 μ m ($\pm$ 15,23), variando de 23,98 a 69,05 μ m; Cc=28,66 μ m ($\pm$ 3,62), variando de 22,00 a 33,61 μ m e Sc=26,54 μ m ($\pm$ 4,18), variando de 18,69 a 30,77 μ m. A espessura da MU está significativamente elevada nos fetos Gc ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcSc).

Na comparação das médias da espessura da MU entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) não houve diferenças significativas ($p > 0,05$ ANOVA).



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; * $p < 0,05$ Intra-Grupo (G X C e G X S)

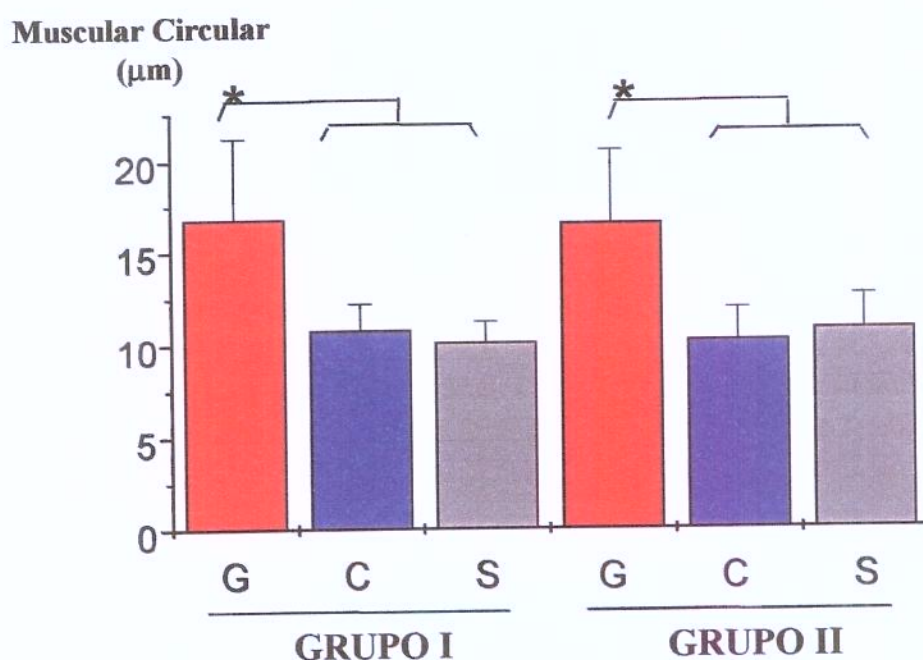
Gráfico 7- Espessura, em micrômetros, das camadas mucosa e submucosa dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

5.2.2- Muscular Circular (MC) (Gráfico 8)

As médias da MC para os fetos do Grupo I (sem corticosteróide) foram: G= 16,84 μ m ($\pm$ 4,48), variando de 11,73 a 24,43 μ m; C=10,83 μ m ($\pm$ 1,41), variando de 8,88 a 13,24 μ m e S=10,15 μ m ($\pm$ 1,14), variando de 8,83 a 11,76 μ m. A espessura da MC está significativamente elevada nos fetos G ($p < 0,005$ ANOVA entre GxC e GxS).

Para os fetos do Grupo II (com corticosteróide) os resultados da MC foram: Gc= 16,52 μ m ($\pm$ 4,07), variando de 11,00 a 23,13 μ m; Cc=10,25 μ m ($\pm$ 1,72), variando de 7,95 a 12,67 μ m e Sc=10,82 μ m ($\pm$ 1,86), variando de 8,61 a 13,29 μ m. A espessura da MC está significativamente elevada nos fetos Gc ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcSc).

Na comparação das médias da espessura da MC entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) não houve diferenças significativas ($p > 0,05$ ANOVA).



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; * $p < 0,05$ Intra-Grupo (G X C e G X S)

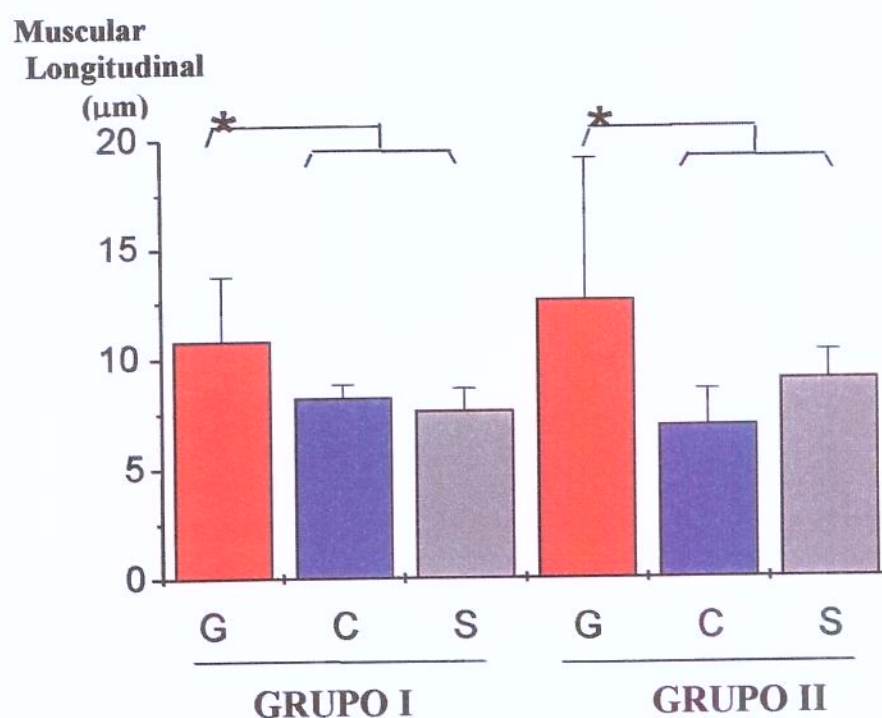
Gráfico 8- Espessura, em micrômetros, da camada muscular circular dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

5.2.3- Muscular Longitudinal (ML) (Gráfico 9)

As médias da ML para os fetos do Grupo I (sem corticosteróide) foram: G= 10,85 μ m ($\pm$ 2,98), variando de 7,33 a 16,55 μ m; C=8,20 μ m ($\pm$ 0,65), variando de 7,34 a 9,32 μ m e S=7,62 μ m ($\pm$ 1,00), variando de 6,62 a 9,76 μ m. A espessura da ML está significativamente elevada nos fetos G ($p < 0,005$ ANOVA entre GxC e GxS).

Para os fetos do Grupo II (com corticosteróide) os resultados da ML foram: Gc= 12,60 μ m ($\pm$ 6,52), variando de 6,37 a 27,09 μ m; Cc=6,95 μ m ($\pm$ 1,61), variando de 4,20 a 9,17 μ m e Sc=9,02 μ m ($\pm$ 1,27), variando de 7,55 a 10,81 μ m. A espessura da ML está significativamente elevada nos fetos Gc ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcSc).

Na comparação das médias da espessura da ML entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) não houve diferenças significativas ($p > 0,05$ ANOVA).



Grupo I = sem corticosteróide; Grupo II = com corticosteróide

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; * $p < 0,05$ Intra-Grupo (G X C e G X S)

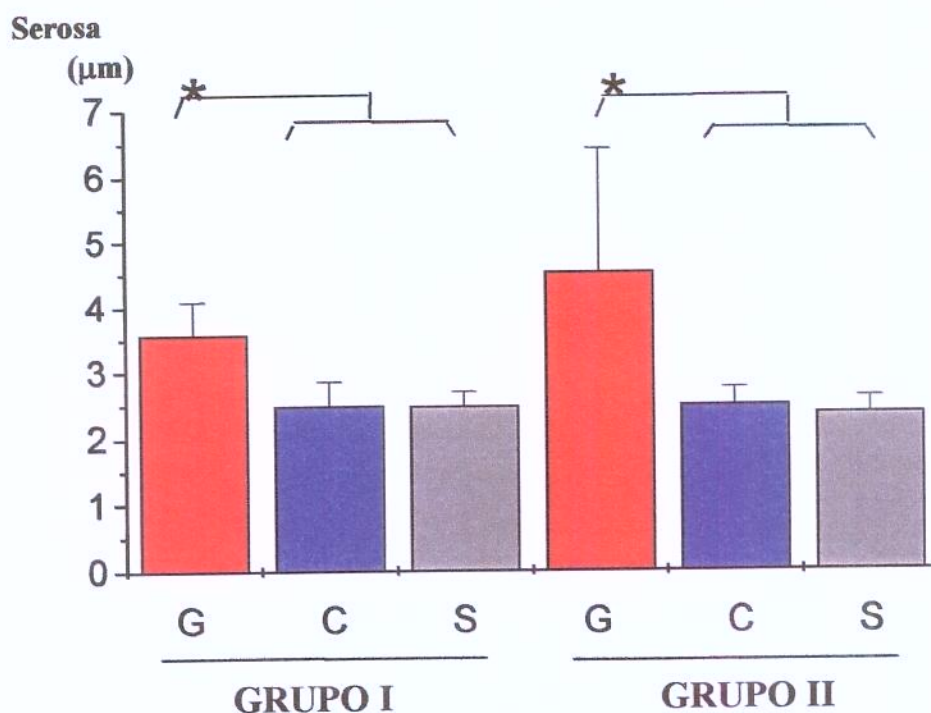
Gráfico 9- Espessura, em micrômetros, da camada muscular longitudinal dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

5.2.4- Serosa (SE) (Gráfico 10)

As médias da SE para os fetos do Grupo I (sem corticosteróide) foram: G= 3,58 μ m ($\pm$ 0,50), variando de 2,89 a 4,17 μ m; C=2,49 μ m ($\pm$ 0,36), variando de 2,04 a 3,16 μ m e S=2,47 μ m ($\pm$ 0,21), variando de 2,19 a 2,77 μ m. A espessura da SE está significativamente elevada nos fetos G ($p < 0,005$ ANOVA entre GxC e GxS).

Para os fetos do Grupo II (com corticosteróide) os resultados da SE foram: Gc= 4,52 μ m ($\pm$ 1,89), variando de 2,96 a 7,36 μ m; Cc=2,48 μ m ($\pm$ 0,26), variando de 2,09 a 2,83 μ m e Sc=3,36 μ m ($\pm$ 0,24), variando de 1,94 a 2,64 μ m. A espessura da SE está significativamente elevada nos fetos Gc ($p < 0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcxSc).

Na comparação das médias da espessura da SE entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) não houve diferenças significativas ($p > 0,05$ ANOVA).



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; * $p < 0,05$ Intra-Grupo (G X C e G X S)

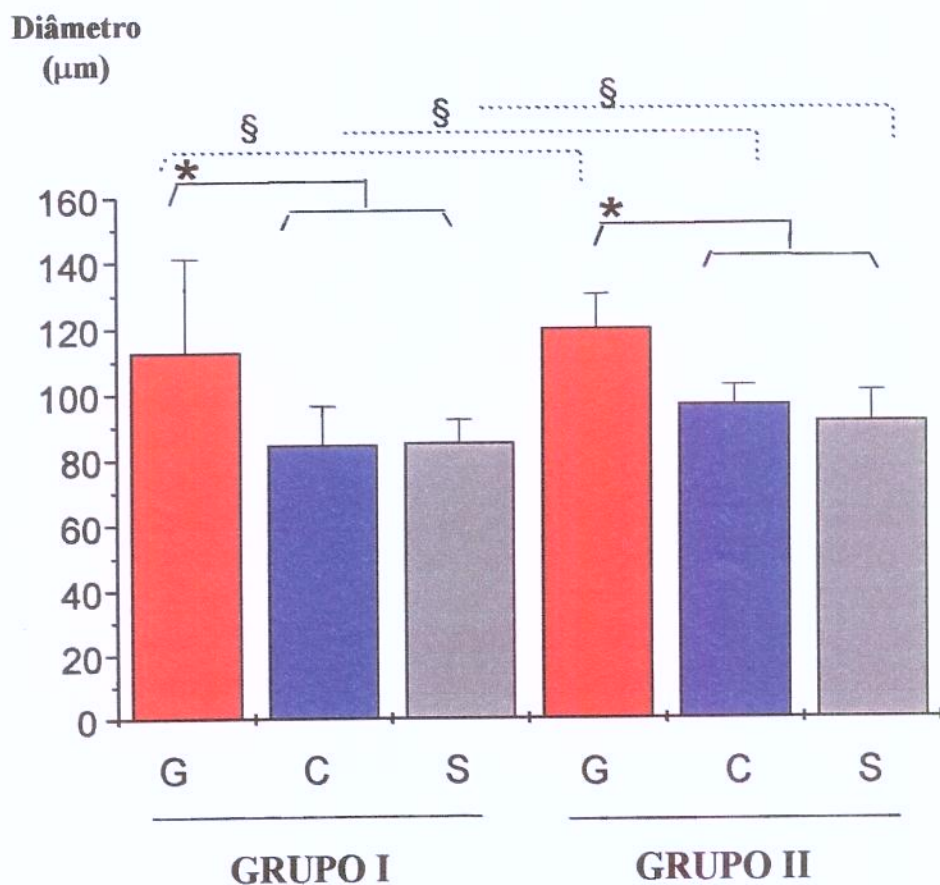
Gráfico 10- Espessura, em micrômetros, da serosa dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

5.2.5- Diâmetro (DI) (Gráfico 11)

As médias do DI da alça intestinal, em corte transversal, para os fetos do Grupo I (sem corticosteróide) foram: G= 1.128,54 μ m ($\pm$ 285,65, variando de 674,47 a 1.462,29 μ m; C=848,19 μ m ($\pm$ 114,87), variando de 602,62 a 967,96 μ m e S=852,20 μ m ($\pm$ 68,36), variando de 760,69 a 944,31 μ m. O DI da alça intestinal está significativamente elevada nos fetos G ($p<0,005$ ANOVA entre GxC e GxS).

Para os fetos do Grupo II (com corticosteróide) os resultados do DI foram: Gc= 1.200,94 μ m ($\pm$ 102,09), variando de 1.041,57 a 1348,63 μ m; Cc=967,36 μ m ($\pm$ 59,60), variando de 856,37 a 1.041,16 μ m e Sc=916,79 μ m ($\pm$ 93,18), variando de 752,40 a 1.005,54 μ m. O DI da alça intestinal está significativamente elevada nos fetos Gc ($p<0,005$ ANOVA entre GcxCc e GcSc).

Na comparação das médias do DI entre os 3 subgrupos respectivos dos Grupos I e II (GxGc, CxCc e SxSc) observou-se elevação significativa em todos subgrupos do Grupo II ($p>0,05$ ANOVA).



Grupo I = sem corticosteróide; **Grupo II** = com corticosteróide

G= gastrosquise; C= controle; S= sham; *p < 0,05 Intra-Grupo (G X C e G X S); §p < 0,05 Inter-Grupo (G X G, C X C e S X S)

Gráfico 11- Diâmetro, em micrômetros, em corte transversal dos intestinos de fetos G, C e S dos Grupos I e II, com desvio padrão e diferença estatística.

Tabela 2- Resultados das variáveis histológicas de intestinos de fetos de ratas submetidos à gastrosquise aos 18,5 dias de gestação sem (Grupo I) e com a administração materna de corticosteróide (Grupo II).

	GRUPO I			GRUPO II		
	G n=20	C n=20	S n=20	Gc n=20	Cc n=20	Sc n=20
Espessura Mucosa (MU) (μm)	33,37 ($\pm 10,80$)*	27,08 ($\pm 4,72$)	26,85 ($\pm 3,35$)	40,97 ($\pm 15,23$)#	28,66 ($\pm 3,62$)	26,54 ($\pm 4,18$)
Muscular Circular (MC) (μm)	16,84 ($\pm 4,48$)*	10,83 ($\pm 1,41$)	10,15 ($\pm 1,14$)	16,52 ($\pm 4,07$)#	10,25 ($\pm 1,72$)	10,82 ($\pm 1,86$)
Muscular Longitudinal (ML) (μm)	10,85 ($\pm 2,98$)*	8,20 ($\pm 0,65$)	7,62 ($\pm 1,00$)	12,60 ($\pm 6,52$)#	6,95 ($\pm 1,61$)	9,05 ($\pm 1,27$)
Espessura Serora (SE) (μm)	3,58 ($\pm 0,50$)*	2,49 ($\pm 0,36$)	2,47 ($\pm 0,21$)	4,52 ($\pm 1,89$)#	2,48 ($\pm 0,26$)	2,36 ($\pm 0,24$)
Espessura Total Parede (μm)	64,66 ($\pm 17,35$)*	48,62 ($\pm 6,55$)	47,11 ($\pm 4,80$)	74,62 ($\pm 27,01$)#	48,36 ($\pm 5,44$)	48,76 ($\pm 6,86$)
Diâmetro Intestinal (DI) (μm)	1.128,54 ($\pm 285,66$)*	848,19 ($\pm 114,87$)	852,20 ($\pm 68,36$)	1.200,94 ($\pm 102,09$) #+	967,36 ($\pm 59,60$) §	916,79 ($\pm 93,18$) ∞

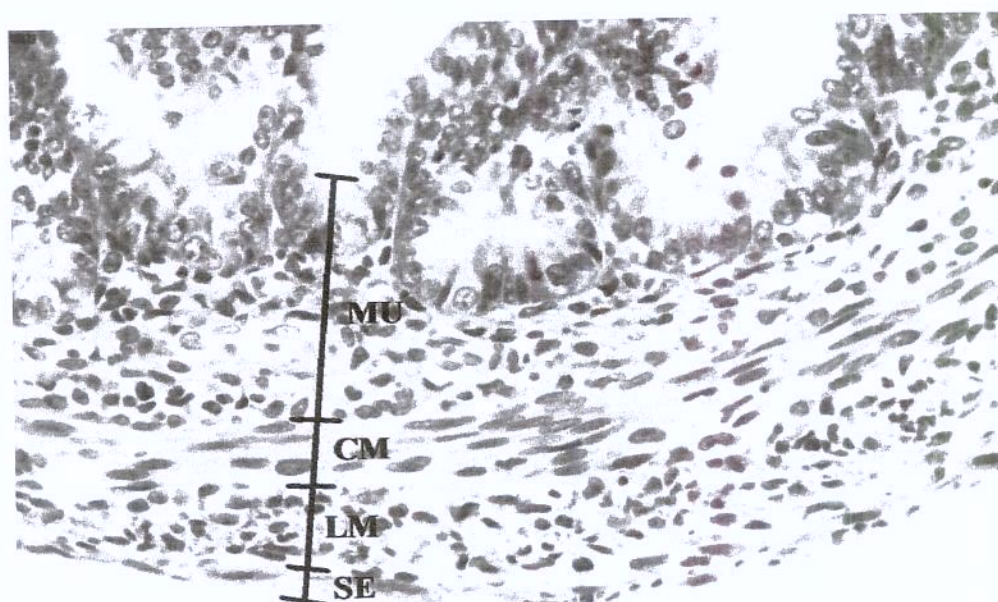
Os valores representam as médias (desvio padrão). Não houve diferenças significativas nas comparações entre C versus S ou Cc versus Sc.

G=gastrosquise sem corticosteróide; C=controle sem corticosteróide; S=sham sem corticosteróide; Gc=gastrosquise com corticosteróide; Cc=controle com corticosteróide; Sc=sham com corticosteróide.

*p< 0.05 versus C and S; #p< 0.05 versus Cc and Sc; +p< 0.05 versus G; §p< 0.05 versus C; ∞ p< 0.05 versus S.



A



B

MU= camadas mucosa e submucosa; CM= camada muscular circular; LM= camada muscular longitudinal; SE= serosa.

Figura 5- Fotografia microscópica demonstrando os achados histológicos: (A) intestino de feto controle; (B) intestino de feto com gastrosquise (magnificação x 200).

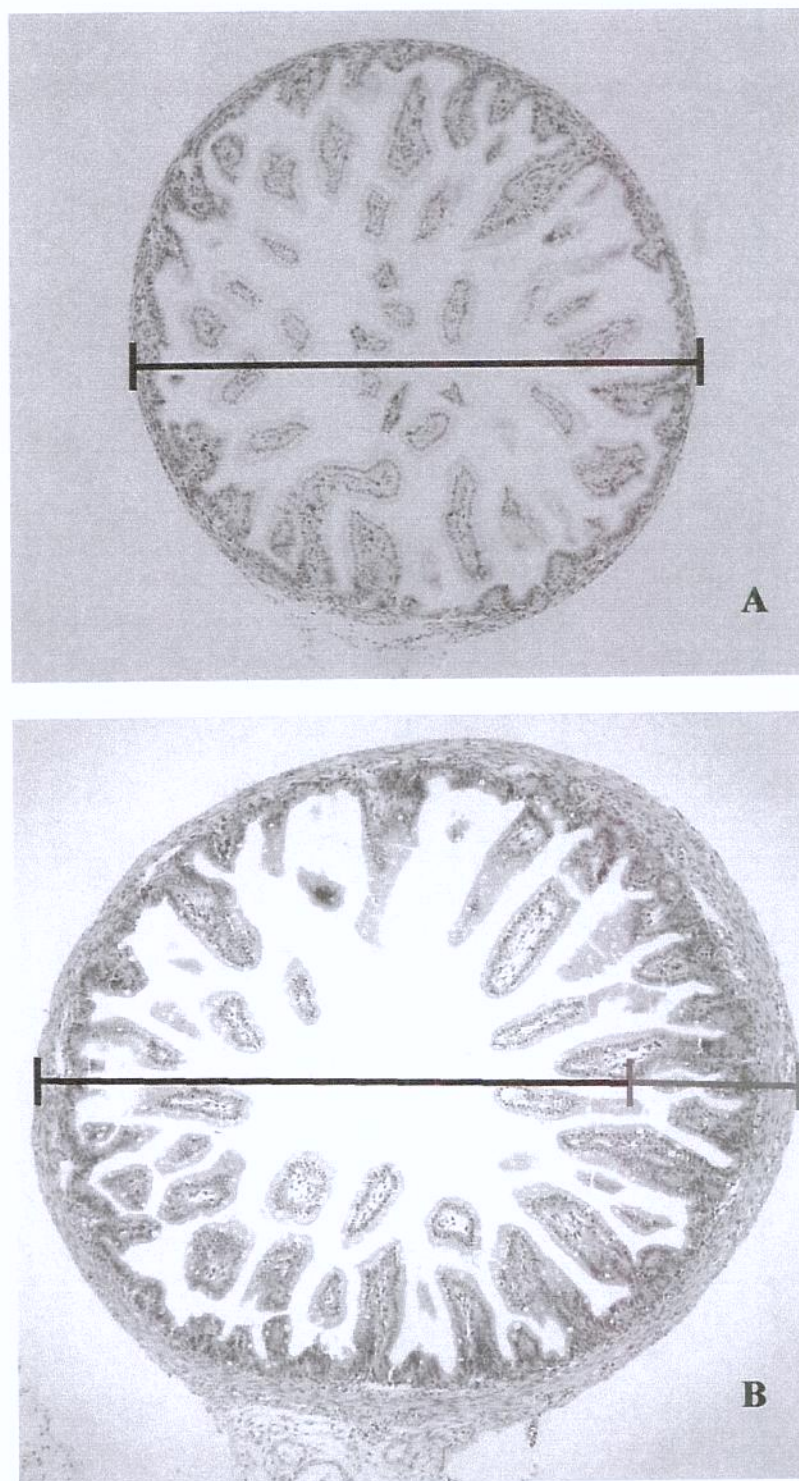


Figura 6- Fotografia microscópica demonstrando as diferenças no diâmetro intestinal: (A) intestino de feto controle (863µm); (B) intestino de feto com gastrosquise (1.407µm) (magnificação x 20).

5.3- Resultados da análise bioquímica (Tabela 3)

5.3.1- Proteína

As dosagens de proteína foram corrigidas pelo peso intestinal, desta forma, obtendo-se a quantidade de proteína por grama de tecido intestinal e excluindo-se a variável das diferenças significativas do peso intestinal entre os fetos com gastrosquise e seus respectivos controles e sham. Na comparação intra-grupo (G x C x S) aos 18,5 dias de gestação, com e sem corticosteróide, notou-se que as dosagens de PI são reduzidas nos fetos com gastrosquise.

A análise comparativa entre os grupos de diferentes idades gestacionais não demonstrou diferenças significativas nas dosagens de PI. Entretanto, na comparação entre os grupos com versus sem corticosteróide, em ambas idades gestacionais, observou-se elevação significativa no conteúdo de PI em todos subgrupos (G, C e S), quando houve administração de corticosteróide ($p < 0,05$ ANOVA).

5.3.2- Citocinas

As dosagens intestinais de proteína e citocinas IL-1, IL6, IL10, TNF- α e IFN- γ , com defeitos criados aos 18,5 dias de gestação, com e sem administração corticosteróide, estão condensadas na Tabela 3. Na análise comparativa entre fetos G, C e S dos mesmos grupos (intra-grupo) não houve diferenças significativas para nenhuma das citocinas investigadas.

Ao comparar os grupos com e sem administração de corticosteróide, de mesma idade gestacional, também não houve mudanças significativas nas dosagens das citocinas.

Tabela 3- Resultados das dosagens intestinais de interleucinas: IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e proteína de fetos submetidos à gastrosquise, controle e sham aos 18,5 dias de gestação, com (GRUPO I) e sem (GRUPO II) administração de corticosteróide.

	GRUPO I			GRUPO II		
	G	C	S	Gc	Cc	Sc
	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6	n = 6
IL-1	49 ($\pm$ 4.0)	71.5 ($\pm$ 27.1)	52.2 ($\pm$ 13)	52 ($\pm$ 13.3)	36.5 ($\pm$ 3.8)	47 ($\pm$ 11.5)
IL-6	166.5 ($\pm$ 1.1)	190.5 ($\pm$ 10.7)	186.8 ($\pm$ 15.9)	190.5 ($\pm$ 11.5)	213.5 ($\pm$ 38.1)	192.5 ($\pm$ 6.9)
IL-10	28 ($\pm$ 5.2)	24.6 ($\pm$ 1.3)	28.8 ($\pm$ 0.3)	22.5 ($\pm$ 0.6)	28 ($\pm$ 4)	28.3 ($\pm$ 5.5)
TNF-α	0.11 ($\pm$ 0.04)	0.19 ($\pm$ 0.03)	0.16 ($\pm$ 0.04)	0.09 ($\pm$ 0.01)	0.14 ($\pm$ 0.05)	0.14 ($\pm$ 0.1)
IFN-γ	5.6 ($\pm$ 0.9)	7.9 ($\pm$ 2.0)	5.6 ($\pm$ 1.5)	5.4 ($\pm$ 0.17)	5.5 ($\pm$ 0.14)	6.2 ($\pm$ 0.44)
Proteína/PI	0,144 ($\pm$ 0,01)*	0,211 ($\pm$ 0,03)	0,233 ($\pm$ 0,02)	0,186 ($\pm$ 0,02)#+	0,208 ($\pm$ 0,03)§	0,256 ($\pm$ 0,04) ∞

Os valores representam as médias (desvio padrão) em pg/ml de homogenato de tecido intestinal. Não houve diferença significativa entre G x C x S do mesmo grupo (intra-grupo) ou inter-grupos para as citocinas.

G=gastrosquise; C=controle; S=sham; Gc=gastrosquise com corticosteróide; Cc=controle com corticosteróide; Ss=sham com corticosteróide; PI= peso intestinal

*= p<0,05 versus C e S; #= p<0,05 versus Cc e Sc; += p<0,05 versus G; §= p<0,05 versus C; ∞ = p<0,05 versus S

6- DISCUSSÃO

Os avanços nas técnicas cirúrgicas e nos cuidados pós-operatórios foram fatores decisivos para o aumento da sobrevivência dos neonatos portadores de gastrosquise nas últimas décadas. A compreensão das consequências hemodinâmicas da redução sob pressão das alças edemaciadas, para uma cavidade abdominal pouco desenvolvida, resultou na prevenção da síndrome de compartimento abdominal. Desta forma, as consequências pós-operatórias da hipertensão do compartimento abdominal, como insuficiência renal e respiratória, puderam ser minimizadas.

Entretanto, o dano intestinal é ainda responsável pela elevada morbidade e, eventualmente, pela mortalidade destes pacientes. Os fatores que contribuem para a morbi-mortalidade da doença são consequências diretas ou indiretas do processo inflamatório iniciado intra-útero, decorrente da prolongada exposição das alças intestinais ao LA (SNYDER, 1999; DRIVER, *et al*, 2000; SANTOS *et al*, 2003). As complicações mais frequentes incluem prematuridade, baixo peso, atresias e estenoses intestinais, além de ECN e hipomotilidade intestinal.

Sugere-se que a inflamação intestinal é consequência do contato com componentes do LA e não uma lesão primariamente isquêmica (ALBERT *et al.*, 1993, 2001; GUO *et al.*, 1995; CORREIA-PINTO *et al.*, 2001, 2002; YU *et al.*, 2003, 2004). O encurtamento, dilatação e espessamento intestinal na gastrosquise ocorrem, principalmente, no último trimestre da gestação, quando o LA sofre modificações em sua composição relacionadas, em parte, à maturação da função renal fetal (TIBBOEL *et al.*, 1986; LANGER *et al.*, 1989; SHAW *et al.*, 1994). Os níveis de uréia, creatinina e mecônio se elevam, enquanto a osmolaridade e o sódio diminuem.

Acredita-se que tais alterações nas concentrações do LA desempenhem papel importante na gênese do processo inflamatório intestinal da gastrosquise (KLUCK *et al.*, 1983; TIBBOEL *et al.*, 1985). Estudos experimentais comprovaram que a presença de mecônio no LA está relacionada ao dano intestinal, porém o mesmo não ocorreu em relação à urina (CORREIA-PINTO *et al.*, 2002; ALBERT *et al.*, 2003).

A compreensão da fisiopatologia do dano intestinal causado pela exposição das alças ao LA, especialmente no final da gestação, é de fundamental importância para traçar estratégias no tratamento deste defeito congênito. Estudos já demonstraram que as alças

intestinais apresentam-se inflamadas, com conseqüentes alterações funcionais, como perda da contratilidade, diminuição da atividade enzimática das vilosidades e alterações da síntese de colágeno na região submucosa (O'NEIL & GROSFELD, 1974; STRINGEL & FILLER, 1979; TIBBOEL *et al.*, 1985). Entretanto, a compreensão dos processos iniciais da resposta inflamatória na gastrosquise, bem como seus mediadores, carece de investigação e é de vital importância para seu planejamento terapêutico.

O processo inflamatório agudo é a resposta precoce do organismo à infecção, lesão imune, ou tóxica tecidual. Uma de suas principais funções é recrutar células inflamatórias ao local da lesão, onde poderão auxiliar na erradicação dos agentes nocivos; além de degradarem o tecido necrótico resultante do dano celular, desencadeando os eventos de cura e reconstituição dos tecidos danificados. Entretanto, as células inflamatórias também podem apresentar efeitos deletérios, prolongando a inflamação e induzindo lesão tecidual. Tal efeito ocorre através da liberação de enzimas, radicais tóxicos do oxigênio e mediadores químicos, como as citocinas (ABBAS & LICHTMAN, 2004).

Os níveis de citocinas no LA apresentam elevações progressivas com a evolução da gestação. Entretanto, a cinética da produção de citocinas no LA ainda não é bem compreendida. Aparentemente, no final da gestação, ocorre um processo inflamatório fisiológico nos tecidos cório-amnióticos, mediados pela produção local de citocinas (OPSJLN *et al.*, 1993; GUNN *et al.*, 1996; KEELAN *et al.*, 1997).

A busca por um método que previna ou minimize a lesão inflamatória intestinal é um esforço atual. Autores desenvolveram técnicas experimentais para evitar o contato entre o intestino extruso e o LA com resultados favoráveis (LANGER *et al.*, 1990; ALBERT *et al.*, 1993). Outras pesquisas incluem a amniocentese com âmnio-diluição e administração de corticosteróides (GUO *et al.*, 1995; YU *et al.*, 2003, 2004).

Os corticosteróides têm conhecidas ações anti-inflamatórias, além de agirem sobre a permeabilidade de membranas, síntese enzimática e transporte da mucosa. Sua administração no período pré-natal é capaz de acelerar a maturação da barreira mucosa intestinal, bem como de elevar a atividade de algumas enzimas (BUCHMILLER *et al.*, 1994; GUO *et al.*, 1995). Suas ações imunossupressoras e anti-inflamatórias estão ligadas

de forma indissolúvel, pois ambas resultam, principalmente, da inibição de funções específicas dos leucócitos, como a síntese e a ação das citocinas. Os corticosteróides inibem os fenômenos iniciais do processo inflamatório, como edema, deposição de fibrina, dilatação capilar, emigração de leucócitos e atividade fagocitária. Suprimem, também, as manifestações tardias, como proliferação de capilares e fibroblastos, deposição de colágeno e cicatrização. Ao inibirem a síntese e liberação de IL-1, os corticosteróides também suprimem a ativação das células Th. Desta forma, reduzindo sua toxicidade e inibindo a síntese de várias citocinas, como TNF- α e IFN- γ . A inibição do crescimento é outro efeito bem conhecido dos corticosteróides, tanto em seres humanos como em tecidos de animais de laboratório (GILMAN, 1991). AGHAJAFARI *et al.* (2002), em estudo metanalítico, reportaram que a administração pré-natal de corticosteróides em modelos animais tem efeitos benéficos ao desenvolvimento pulmonar, porém causa retardo do crescimento fetal intra-uterino.

SLOTKIN *et al.* (1992) demonstraram a ocorrência de retardo do crescimento intra-uterino em fetos de ratos expostos a altas doses, fato este não reproduzido em baixas doses de corticosteróide. Além disto, as mesmas baixas doses administradas a ratas grávidas promoveram o desenvolvimento renal fetal, enquanto doses elevadas não. Em mulheres grávidas, a dose total de dexametasona é preconizada em 24 mg, correspondendo à cerca de 0,3 a 0,4 mg/kg. A meia-vida da dexametasona é de 36 a 72 horas e uma dose única foi suficiente para induzir a maturação pulmonar e renal em fetos de ovelha (ERVIN *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2000). JOBE & SOLL (2004) sugeriram que uma única dose de corticosteróide de 0,1 mg/kg seria um tratamento efetivo e menos tóxico para mulheres em trabalho de parto prematuro.

No presente estudo, optou-se pela administração intra-peritoneal materna de corticosteróide, presumindo que haveria efeito favorável sobre o processo inflamatório intestinal fetal, bem como sobre sua maturação. Realizou-se o procedimento ao final da gestação, período em que ocorre a lesão intestinal na gastrosquise, além de coincidir com o pico da maturação intestinal fetal. A dose de corticosteróide foi definida com base na literatura, onde foram relatados resultados positivos na maturação intestinal e pulmonar, com doses de 0,2 a 0,5 mg/kg (BUCHMILLER *et al.*, 1994; GUARINO *et al.*, 2000).

CORREIA-PINTO *et al.* (2001), observaram que os fetos submetidos à gastrosquise experimental apresentaram peso corpóreo reduzido ao nascimento. Este achado foi corroborado pelo presente estudo. A subtração do peso intestinal, elevado nos fetos com gastrosquise, permitiu a confirmação da ocorrência de RCIU. O índice PC-PI, desta forma, contribuiu para a determinação do peso fetal real, excluindo-se a variável do peso intestinal entre os fetos G, C e S. A hipótese de que o RCIU está diretamente relacionado à gastrosquise além de ser evidenciada em humanos, também foi confirmada em modelo experimental (FRANCHI-TEIXEIRA *et al.*, 2005).

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). Aproximadamente metade dos fetos portadores de gastrosquise apresenta RCIU (ANTEBY *et al.*, 1999). A administração de corticosteróide no Grupo II não apenas intensificou o RCIU dos fetos G, como também induziu RCIU nos fetos C e S. Fato este não observado em estudos experimentais prévios (GUO *et al.*, 1995; YU *et al.*, 2003, 2004). Tais achados demonstram que a dose de dexametasona utilizada foi efetiva e corroboram as evidências de que os corticosteróides exercem efeito inibitório sobre as vias hormonais do crescimento (SLOTKIN *et al.*, 1992; THIRONE *et al.*, 2002). Altas doses de corticosteróides no terceiro trimestre também estão associadas à RCIU em humanos (OSTENSEN & SKOMSVOLL, 2004).

O CI também foi drasticamente afetado nos fetos com gastrosquise, demonstrando o impacto negativo da exposição ao LA sobre seu desenvolvimento. O CI atingiu apenas 60% do normal nos fetos G e a administração de corticosteróide não apresentou efeito sobre esta variável. O CI reduzido na gastrosquise ainda é pouco compreendido. Questiona-se se haveria a ocorrência de encurtamento intestinal ou de retardo em seu desenvolvimento. Além do dano intestinal causado pelo contato direto com o LA, ocorreria uma resposta inflamatória sistêmica, que, assim como justificaria o RCIU, também explicaria um retardo no desenvolvimento intestinal (GOMEZ *et al.*, 1998).

O PI dos fetos com gastrosquise foi significativamente maior que dos fetos C e S. Considerando-se que os fetos G são menores e seus intestinos mais curtos, o fato de apresentarem intestinos mais pesados traduz a intensidade do processo inflamatório.

Quando o PI foi corrigido para o CI (PI/CI) as diferenças se tornaram ainda maiores, com valores mais de 100% aumentados para fetos G, quando comparados aos respectivos controles. A administração de dexametasona foi capaz de reduzir significativamente o PI, mesmo quando corrigido pelo CI. Entretanto, a redução do PI não ocorreu apenas nos fetos G, como também nos C e S. Este fato poderia ser explicado pela ação inibitória do corticosteróide sobre o desenvolvimento intestinal; além de seus efeitos anti-inflamatórios com redução do edema e da deposição de colágeno na matriz extra-celular.

O processo inflamatório causa dismotilidade e suboclusão intestinal, com diâmetro intestinal aumentado e, desta forma, podendo haver um aumento no conteúdo intra-luminal nos fetos com gastrosquise. Embora o conteúdo intra-luminal possa influenciar na determinação do PI dos fetos G, assim como em estudos prévios, não foi possível a utilização de um método que excluísse o conteúdo intestinal, que não comprometesse outras variáveis (CORREIA-PINTO *et al.*, 2001, 2002; YU *et al.*, 2003, 2004).

O estudo histológico demonstrou o aumento da espessura de todas as camadas da parede intestinal nos fetos submetidos a gastrosquise, demonstrando que o aumento do PI está relacionado ao espessamento global do intestino. Contrariando estudos prévios, a administração de corticosteróide não reduziu o espessamento da parede intestinal nos fetos G (YU *et al.*, 2003, 2004). Entretanto, tais estudos não consideraram as diferenças de espessura entre os segmentos intestinais, uma vez que não padronizaram qual porção do intestino foi avaliada.

No presente estudo, observou-se uma grande discrepância na espessura da parede intestinal entre segmentos proximais e distais. Constatou-se maior espessura e diâmetro intestinal para segmentos proximais. O achado histológico de maior diâmetro intestinal em fetos G corrobora as evidências de que ocorre dismotilidade intestinal e um processo de suboclusão já no período fetal. O fato da administração de corticosteróide ter reduzido o PI nos fetos G sem diminuir o espessamento da parede intestinal, pode representar evidência indireta de que a redução do peso foi secundária ao decréscimo na deposição de água, colágeno e proteínas na matriz extra-celular (LANGER *et al.*, 1990; SRINATHAN *et al.*, 1995; YU *et al.*, 2003, 2004).

Fetos portadores de gastrosquise apresentam perda de proteínas durante o período gestacional. Amostras colhidas do LA e do cordão umbilical, no momento do parto, demonstraram que esses indivíduos apresentam uma significativa diminuição do conteúdo protéico. (CARROL *et al.*, 2001). Esta observação foi confirmada no presente estudo. A dosagem de proteína intestinal estava reduzida nos fetos com gastrosquise. Estes achados estão em concordância com a literatura, a qual demonstra uma reduzida população e proliferação celular intestinal na gastrosquise (SRINATHAN *et al.*, 1995; YU *et al.*, 2003, 2004). A administração de corticosteróide elevou as dosagens de proteína em todos os subgrupos, sugerindo um estímulo a maturação intestinal, com elevação da atividade enzimática e redução da apoptose (YU *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2004). Entretanto, deve-se considerar que as concentrações de proteína foram corrigidas pelo peso intestinal e que o corticosteróide o reduziu. Desta forma, não foi possível determinar se realmente houve um estímulo à maturação intestinal pelo corticosteróide, ou apenas seu efeito sobre a redução do PI.

Pesquisas sobre os mediadores inflamatórios intestinais na gastrosquise são escassas, sendo que, até o momento, existe apenas um estudo experimental onde foram pesquisadas citocinas em tecidos de fetos portadores de gastrosquise (SBRAGIA, 2005).

MORRISON *et al.* (1998) demonstraram, em fetos humanos com gastrosquise, a correlação da presença de mecônio no LA com o dano intestinal, presença de exsudato inflamatório agudo composto de células polimorfonucleares e considerável elevação dos níveis de IL-8 no LA. Por sua vez, a IL-8 é encontrada em altas concentrações no mecônio, além de ser uma potente indutora de quimiotaxia (DE BEAUFORT *et al.*, 1998). TSANG *et al.* (1994) observaram que IL-6 e IL-8 encontram-se elevadas em pacientes que possuem complicações cirúrgicas no período neonatal. Ambas citocinas podem constituir possíveis marcadores precoces de morbidade neonatal.

BOLKE *et al.* (2002) encontraram aumento de IL-6 plasmática em neonatos submetidos à correção de gastrosquise, fato que não foi observado em neonatos operados por outras malformações gastrointestinais; sugerindo que existe uma resposta inflamatória sistêmica iniciada intra-útero nos recém-nascidos com gastrosquise.

Citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ , estão relacionadas ao desequilíbrio imunológico das doenças inflamatórias intestinais (MACDONALD *et al.*, 1990; BRESSE *et al.*, 1994; MONTELEONE *et al.*, 1997; CAMOGLIO *et al.*, 1998; PIZARRO *et al.*, 1999; KANAI *et al.*, 2001). Além disto, a ativação destas citocinas induz a expressão e a produção de IL-1 e IL-6 (SANDER *et al.*, 1997; HAVEMAN *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000).

Os primeiros estudos clínicos utilizando anti-corpos monoclonais contra TNF- α e a citocina anti-inflamatória IL-10 em pacientes com doença inflamatória intestinal mostraram resultados promissores, com regressão das lesões mucosas (ROGLER & ANDUS, 1998; PAPADAKIS & TARGAN, 2000).

Até o momento, não foi determinado o perfil de citocinas envolvidas na gastrosquise. No presente estudo, as citocinas teciduais intestinais foram dosadas com o intuito de verificar um padrão distinto de ativação nos fetos G, bem como avaliar se haveria interferência do corticosteróide sobre as mesmas.

As citocinas avaliadas neste estudo não apresentaram alterações significativas na comparação entre fetos com gastrosquise e seus respectivos C e S em ambos os grupos. Tampouco houve alteração em relação à administração de corticosteróide. Este fato poderia ser explicado pela rápida elevação e redução dos níveis teciduais das citocinas, sendo que o momento da dosagem é de fundamental importância na detecção de seus picos de secreção.

Outro fator importante a ser considerado é o rápido crescimento fetal do rato, pois cada dia após os 18 dias de gestação equivale a aproximadamente a 1 mês da gestação de humanos. Seria possível que, ao sacrifício, 3 dias após o procedimento, já tenha havido uma fase de hiperprodução das citocinas dosadas. Em humanos, os picos de produção de citocinas podem durar apenas algumas horas. Por este motivo, pode não ter havido diferenças nas citocinas entre G, C e S, ou na comparação entre os grupos.

Uma explicação para o fato de não ter sido possível a identificação de um perfil de citocinas intestinais próprio aos fetos com gastrosquise, seria a possível origem extra-intestinal das citocinas, como sistema cório-amniótico, por exemplo. Esta hipótese é

baseada em estudos que demonstraram que: (1) os níveis de citocinas no LA apresentam elevações progressivas com a evolução da gestação; (2) aparentemente, no final da gestação, ocorre um processo inflamatório fisiológico nos tecidos cório-amnióticos, mediados pela produção local de citocinas; (3) observaram-se níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, no LA ao final da gestação; (4) a intensidade de infiltrado leucocitário no LA se correlaciona positivamente com os níveis destas citocinas; (5) a fonte das citocinas do LA é, aparentemente, as membranas fetais âmnion e córion; (6) a impermeabilidade da placenta às citocinas explica a falta de correlação entre as dosagens séricas maternas e do LA em condições inflamatórias; (7) a presença de mecônio no LA apresenta efeito quimiotático sobre leucócitos e citocinas, como IL-6 e IL-8.

Tais averiguações vão de encontro à patologia da gastrosquise, uma vez que: (1) o maior dano intestinal ocorre no último trimestre da gestação, coincidindo com a elevação dos níveis de citocinas no LA; (2) acredita-se que algum elemento presente no LA seja responsável por desencadear o processo inflamatório na gastrosquise; (3) a presença de mecônio no LA está relacionada à lesão intestinal e (4) a âmnio-transfusão parece reduzir o processo inflamatório intestinal.

O melhor entendimento do processo inflamatório intestinal intra-uterino poderá, certamente, beneficiar o prognóstico dos neonatos portadores de gastrosquise e outros processos inflamatórios fetais. Portanto, a identificação dos mediadores inflamatórios envolvidos, bem como sua origem é um importante alvo para o desenvolvimento de novas terapias para a gastrosquise, bem como para outras doenças onde ocorra dano inflamatório intestinal.

7- CONCLUSÃO

Em conclusão, pôde ser averiguado que, no modelo experimental utilizado, fetos com gastrosquise apresentam:

- 1- *Análise Morfométrica*: Retardo do crescimento intra-uterino; comprimento intestinal reduzido e peso intestinal elevado. A administração de corticosteróide promoveu agravamento do retardo de crescimento intra-uterino e redução do peso intestinal nos fetos com gastrosquise.
- 2- *Análise Histológica*: Espessamento de todas as camadas da parede intestinal e dilatação das alças intestinais. A administração de corticosteróide não apresentou efeito sobre tais variáveis.
- 3- *Análise Bioquímica*: Déficit de proteína intestinal, sugerindo inibição da população e proliferação celular pelo processo inflamatório. Ausências de ativação intestinal do perfil de citocinas investigado. A administração de corticosteróide foi capaz de reduzir o déficit de proteína intestinal, sem, entretanto apresentar efeito sobre as citocinas avaliadas.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTONEN, R.; HEIKKINEN, T.; HAKALA, K.; LAINE, K. Transfer of proinflammatory cytokines across term placenta. *Obstet Gynecol.*;106(4):802-7, 2005.

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

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

AGHAJAFARI, F.; MURPHY, K.; MATTHEWS, S.; OHLSSON, A.; HANNAH, M. Repeated doses of antenatal corticosteroids in animals: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* 186(4):843-9, 2002.

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. Gastroschisis in the partially extraamniotic fetus: experimental study. *J Pediatr Surg.* 28:656-9, 1993.

ALBERT, A.; MARGARIT, J.; JULIA, V.; SANCHO M. A.; GALAN X.; LOPEZ, D.; MORALES, L. Morphology and mucosal biochemistry of gastroschisis intestine in urine-free amniotic fluid. *J Pediatr Surg.* 38(8):1217-20, 2003.

ALBERT, A.; SANCHO, M. A.; JULIA, V.; DIAZ, F.; BOMBI, J. A.; MORALES, L. Intestinal damage in gastroschisis is independent of the size of the abdominal defect. *Pediatr Surg Int.* 17:116-9, 2001.

ALLEN, R. G.; WRENN Jr, E. L. Silon as a sac in the treatment of omphalocele and gastroschisis. *J Pediatr Surg*, 4:3, 1969.

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*, 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, O.; OZER, E.; AKGUR, F. M. Intestinal damage in gastroschisis correlates with the concentration of intraamniotic meconium. *J Pediatr Surg*, 36:1811-5, 2001.

ARAI, K. F.; LEE, A.; MIYAJIMA, S. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann Rev Bioch*, 59: 783-836, 1990.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunol Today*, 15: 74-80, 1994.

BEALER, J. F.; GRAF, J.; BRUCH, S. W.; ADZICK, N. S.; HARRISON, M. R. Gastroschisis increases small bowel nitric oxide synthase activity. *J Pediatr Surg*, 31:1043-55; discussion 1045-46, 1996.

DE BEAUFORT, A. J.; PELIKAN, D. M.; ELFERINK, J. G.; BERGER, H. M. Effect of interleukin 8 in meconium on in-vitro neutrophil chemotaxis. *Lancet*, 352:102-5, 1998.

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

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. *Pediatr Res*, 51(3):361-9, 2002.

BOLKE, E.; JEHL, P. M.; TRAUTMANN, M.; GOTZ, I.; KREBS, B.; STEINBACH, G.; ORTH, K. Different acute-phase response in newborns and infants undergoing surgery. *Pediatr Res*; 51: 333-8, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54, 1976.

BRESSE, E. J.; MICHIE, C. A.; NICHOLLS, S. W.; MURCH, S. H.; WILLIAMS, C. B.; DOMIZIO, P.; WALKER-SMITH, J. A.; MACDONALD, T. T. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of the children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; 106:1455-66, 1994.

BUCHMILLER, T. L.; SHAW, K.; FONKALSRUD, E. W. Effect of prenatal dexamethasone administration: fetal rabbit intestinal nutrient uptake and disaccharidase development. *J Surg Res*; 57:274-9, 1994.

CAMOGLIO, L.; TE VELDE, A. A.; TIGGES, A. J.; DAS, P. K.; VAN DEVENTER, S. J. Altered expression of interferon-gamma and interleukin-4 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*; 4:285-90, 1998.

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*, 186(6):1297-301, 2001.

CHEN, J.; ZHOU, Y. P.; RONG, X. Z. An experimental study on systemic inflammatory response syndrome induced by subeschar tissue fluid. *Burns*; 26:149-55, 2000.

CHINEN, J.; SHEARER, W. T. Basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol*, 116 (2): 411-8, 2005.

CONSTANT, S. L.; BOTTOMLY, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*; 15: 297-322, 1997.

CORREIA-PINTO, J.; ESTEVÃO-COSTA, J. Prolonged intestinal exposure to amniotic fluid does not result in peel formation in gastroschisis. *J Pediatr Surg* 35:399, 2000 (letter).

CORREIA-PINTO, J.; TAVARES, M. L.; BAPTISTA, M. J.; ESTEVAO-COSTA, J.; FLAKE, A. W.; LEITE-MOREIRA, A. F. A new fetal rat model of gastroschisis: development and early characterization. *J Pediatr Surg*; 36:213-16, 2001.

CORREIA-PINTO, J.; TAVARES, M. L.; BAPTISTA, M. J.; ESTEVAO-COSTA, J. Meconium dependence of bowel damage in gastroschisis. *J Pediatr Surg*; 37:31-4, 2002.

CRAWFORD, R.A.; RYAN, G.; WRIGHT, 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.; THORTON, J. G.; STRINGER, M. D. The aetiology of gastroschisis. *Br J Obstet Gynaecol*; 107(11):1339-46, 2000.

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*; 34:975-6, 1999.

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.

DOHI, T.; FUJIIHASHI, K.; KIYONO, H.; ELSON, C. O.; MCGHEE, J. R. Mice deficient in Th1 and Th2 type cytokines develop distinct forms of hapten-induced colitis. *Gastroenterol*; 119: 724-33, 2000.

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):142-7, 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*; 34:1393-5, 1999.

- EDELSON, M. B.; BAGWELL, C. E.; ROZYCKI, H. J. Circulating pro-and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*; 103:766-71,1999.
- ERVIN, M. G.; PADBURY, J. F.; POLK, D. H. Antenatal glucocorticoids alter premature newborn lamb neuroendocrine and endocrine responses to hypoxia. *Am J Physiol*; 279:R830-R8, 2000.
- 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.
- FORD, H.; WATKINS, S.; REBLOCK, K.; ROWE, M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*; 32:275-82, 1997.
- FRANCHI-TEIXEIRA, A. R.; BARRETO, M. W. G.; NOGUEIRA, B.; BITTENCOURT, D. G.; VIOLIN, L.; SBRAGIA, L. Amniotic Fluid And Intrauterine Growth Restriction in a Gastroschisis Fetal Rat Model. *Fetal Diagn Ther*; 20(6):494-7, 2005.
- 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):583-8,1993.
- FURIE, M. B.; RANDOLPH, G. J. Chemokines and Tissue Injury. *Am J Pathol*, 146(6): 1287-301, 1995.
- GILMAN, A. G. As bases farmacológicas da terapêutica. Ed. Guanabara-Koogan, 1991. p. 954-969.
- GITLIN, D.; KUMATE, J.; MORALES, C. The turnover of amniotic fluid protein in the human conceptus. *Am J Obstet Gynecol*, 1;113(5):632-45, 1972.
- 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*; 20:406-9, 1985.

- GOMEZ, R.; ROMERO, R.; EDWIN, S.; DAVID, C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am*; 11:135-76, 1997.
- GOMEZ, R.; ROMERO, R.; GHEZZI, F.; YOON, B. H.; MAZOR, M.; BERRY, S. M. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*; 179:194-202, 1998.
- GRAY, S. W.; SKANDALAKIS, J. E. *Embriology for Surgeons*. Philadelphia: Ed. W.B. Saunders Co., 1972. p.387-441.
- GUARINO, N.; OUE, T.; SHIMA, H. Antenatal dexamethasone enhances surfactant protein synthesis in the hypoplastic lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg*; 35:1468-73, 2000.
- GUNN, L.; HARDIMAN, P.; THARMARATNAM, S.; LOWE, D.; CHARD, T. Measurement of interleukin-1 alpha and interleukin-6 in pregnancy-associated tissues. *Reprod Fertil Dev*; 8(7):1069-73, 1996.
- GUO, W.; SWANIKER, F.; FONKALSRUD, E. W. Effect of intraamniotic dexamethasone administration on intestinal absorption in a rabbit gastroschisis model. *J Pediatr Surg*; 30: 983-7, 1995.
- HALPERN, M. D.; HOLUBEC, H.; DOMINGUEZ, J. A.; WILLIAMS, C. S.; MEZA, Y. G.; MCWILLIAM, D. L.; PAYNE, C. M.; MCCUSKEY, R. S.; BESSELSSEN, D. G.; DVORAK, B. Up-regulation of IL-18 and IL-12 in the ileum of neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*; 51:733-9, 2002.
- HALPERN, M. D.; HOLUBEC, H.; DOMINGUEZ, J. A.; MEZA, Y. G.; WILLIAMS, C. S.; RUTH, M. C.; MCCUSKEY, R. S.; DVORAK, B. Hepatic inflammatory mediators contribute to intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 284:G695-702, 2003.
- HAUSTEIN, K. O. Cigarette smoking, nicotine and pregnancy. *Int J Clin Pharmacol Ther*; 37:417-27, 1999.
- HAVEMAN, J. W.; MULLER KOBOLD, A. C.; TERVART, J. W.; VAN DEN BERG, A. P.; TULLEKEN, J. E.; KALLENBERG, C. G.; THE, T. H. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Mes*; 55:132-41, 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.

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

IIMURO, Y.; NISHIURA, T.; HELLERBRAND, C.; BEHRNS, K. E.; SCHOONHOVEN, R.; GRISHAM, J. W.; BRENNER, D. A. NFkB Prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest*, 101:802-11, 1998.

JOBE, A. H.; SOLL, R. F. Choice and dose of corticosteroid for antenatal treatments. *Am J Obst and Gynecol*, 190: 878-81, 2004.

KANAI, T.; WATANABE, M.; OKAZAWA, A.; SATO, T.; YAMAZAKI, M.; OKAMOTO, S.; ISHII, H.; TOTSUKA, T.; IYAMA, R.; OKAMOTO, R.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; HIBI, T. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 121:875-88, 2001.

KEELAN, J. A.; SATO, T.; MITCHELL, M. D. Interleukin (IL)-6 and IL-8 production by human amnion: regulation by cytokines, growth factors, glucocorticoids, phorbol esters, and bacterial lipopolysaccharide. *Biol Reprod*, 57(6):1438-44, 1997.

KLUCK, P.; TIBBOEL, D.; VAN DER KAMP, A. W. The effect of fetal urine on the development of the bowel in gastroschisis. *J Pediatr Surg*, 18:47-50, 1983.

KUNKEL, S. L.; GODESSART, N. Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmun Rev*, 1 (6): 313-20, 2002.

LACEY, S. R.; CARRIS, L. A.; BREYER III, A. J. Bladder pressure monitoring significantly enhances care of infants with abdominal wall defects: a prospective clinical study. *J Pediatr Surg*, 28:1370, 1993.

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*; 25:1122-6, 1990.

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

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.

LUTON, D.; DE LAGAUSIE, 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.

MACDONALD, T. T.; HUTCHINGS, P.; CHOY, M. Y.; MURCH, S.; COOKE, A. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol*; 81:301-5, 1990.

MACDONALD, R. S. The role of insulin-like growth factors in small intestinal cell growth and development. *Horm Metab Res*; 31:103-13, 1999.

MATHIAS, L.; NOBILE, L.; HOFSTETTER, M. M. Análise da maturidade fetal através do líquido amniótico. *AMB Rev Assoc Med Bras*; 31(5-6):76-80, 1985.

MONTELEONE, G.; BIANCONE, L.; MARASCO, R.; MORRONE, G.; MARASCO, O.; LUZZA, F.; PALLONE, F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 112:1169-78, 1997.

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

MOORE, T. C.; COLLINS, D. L.; CATANZARITE, V.; HATCH, E. I. JR. Pre-term 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.; SIBA, I. B. The effect of mode of delivery on the perinatal outcome in fetuses with abdominal wall defects. *Am J Obstet Gynecol*; 163:833-8, 1990.
- MORRISON, J. J.; KLEIN, N.; CHITTY, L. S.; KOCJAN, G.; WALSH, D.; GOULDING, M.; GEARY, M. P.; PIERRO, A.; RODECK, C. H. Intra-amniotic inflammation in human gastroschisis: possible aetiology of postnatal bowel dysfunction. *Br J Obstet Gynaecol*; 105:1200-4, 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.
- OLAH, K. S.; VINCE, G. S.; NEILSON, J. P.; JOHNSON, P. M. Interleukin-6, interferon-gamma, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony stimulating factor levels in human amniotic fluid at term. *J Reprod Immunol*; 32(1):89-98, 1996.
- 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.
- O'NEIL, A. JR.; GROSFELD, J. L. Intestinal malfunction after antenatal exposure of viscera. *Am J Surg*; 127:128-32, 1974.
- OPSJLN, S. L.; WATHEN, N. C.; AUSTGULEN, R. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 169(1):397-404, 1993.
- OSTENSEN, M. E. & SKOMSVOLL, J. F. Anti-inflammatory pharmacotherapy during pregnancy. *Expert Opin Pharmacother*, 5(3):571-80, 2004.
- PAPADAKIS, K. A.; TARGAN, S. R. The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*; 6 (4): 303-13, 2000.
- 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.

PIZARRO, T. T.; MICHIE, M. H.; BENTZ, M.; WORARATANADHARM, J.; SMITH, M. F. JR.; FOLEY, E.; MOSHALUK, C. A.; BICKSTON, S. J.; COMINELLI, F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol*; 162:6829-35, 1999.

PROTONOTARIOU, E.; PUCHNER, A.; GIANNAKI, G.; RIZOS, D.; PHOCAS, I.; SARANDAKOU, A. Patterns of inflammatory cytokine serum concentrations during the perinatal period. *Early human develop*; 56: 31-8, 1999.

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

RENNICK, D. M.; FORT, M. M. Lessons from genetically engineered animal models XII. IL-10-deficient mice and intestinal inflammation. *Am J Phisiol Gastrointest Liver Phisiol*; 278: 829-33, 2000.

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

REISENBERGER, K.; EGARTER, C.; VOGL, S.; KISS, H. The transfer of interleukin-8 across the human placenta perfused in vitro. *Obstet Gynecol*;87(4):613-6, 1996.

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*; 94:112-6, 1999.

ROGLER, G.; ANDUS, T. Cytokines and Inflammatory Bowel Disease. *World J Surg*, 22: 382-9, 1998.

ROITT, I.; DELVIS, P. *Essential Immunology*. 10a. Ed. Blackwell Publishing Ltd, 2002-2005.

SALEH, A. A.; ISADA, N. B.; JOHNSON, M. P.; SOKOL, R. J.; DOMBROWSKI, M. P.; EVANS, M. I. Amniotic fluid acetylcholinesterase is found in gastroschisis but not omphalocele. *Fetal Diagn Ther*; 8:168-70, 1993.

SANDER, A.; ATMBRUSTER, W.; SANDER, B.; DAUL, A. E.; LANGE, R.; PETER, S. J. Hemofiltration increases IL-6 clearance in early systemic inflammatory response syndrome but does not alter IL-6 and TNF alpha plasma concentrations. *Intensive Care Med*; 23: 878-84, 1997.

SANTOS, M. M.; TANNURI, U.; MAKSOUD, J. G. Alterations of enteric nerve plexus in experimental gastroschisis: is there a delay in the maturation? *J Pediatr Surg*; 38:1506-11, 2003.

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.

SBRAGIA, L. Avaliação morfológica, histológica e bioquímica de fígado de fetos de ratas Spreague-Dowley, submetidos à gastrosquise experimental intra-útero em diferentes idades gestacionais. Campinas, 2005. (Tese de Livre-Docência, Universidade Estadual de Campinas).

SCHUSTER, S. A New Method for the Staged Repair of The Large Omphaloceles. *Surg Gynecol Obstet*; 125:837-50, 1967.

SHAW, K.; BUCHMILLER, T. L.; CURR, M. Impairment of nutrient uptake in a rabbit model of gastroschisis. *J Pediatr Surg*; 29:376-8, 1994.

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.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J.; KAVLOCK, R. J.; GRAY, J. A. Fetal dexamethasone exposure accelerates development of renal function: relationship to dose, cell differentiation and growth inhibition. *J Dev Physiol*; 17(2):55-61, 1992.

SMITH, L. M.; ERVIN, M. G.; WADA, N. Antenatal glucocorticoids alter postnatal preterm lamb renal and cardiovascular responses to intravascular volume expansion. *Pediatr Res*; 47:622-7, 2000.

SNYDER, C. L. Outcome analysis for gastroschisis. *J Pediatr Surg*; 34:1253-6, 1999.

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.

STEIDLER, L. In situ delivery of cytokines. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 82 (1-4): 323-31, 2002.

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

STRINGEL, G.; FILLER, R. M. Prognostic factors in omphalocele and gastroschisis. *J Pediatr Surg*; 14:515-9, 1979.

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.; SBRAGIA, L.; NJAGAL, A.; PHIBBS, R. H.; HARRISON, M. R.; ALBANESE, C. T. A Big Hole in the System: Gastroschisis. *J Pediatr Surg*; 37:1669-72, 2002.

SZABO, S. J.; SULLIVAN, B. M.; PENG, S. L.; GLIMCHER, L. H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*; 21: 713-58, 2003.

THAKUR, A.; SASE, M.; LEE, J. J. Effect of dexamethasone on insulin-like growth factor-I expression in a rabbit model of growth retardation. *J Pediatr Surg*; 35:898-904, 2000.

THIRONE, A. C.; SCARLETT, J. A.; GASPARETTI, A. L. Modulation of growth hormone signal transduction in kidneys of streptozotocin-induced diabetic animals: effect of a growth hormone receptor antagonist. *Diabetes*; 51(7):2270-2281, 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.

TIBBOEL, D.; KLUCK, P.; VAN DER KAMP, A. W. The development of the characteristic anomalies found in gastroschisis – experimental and clinical data. *Z Kinderchir*; 40:355-60, 1985.

TOTH, P. P.; KIMURA, K. Left-sided gastroschisis. *J Pediatr Surg*; 28:1543-4, 1993.

TOULOUKIAN, R. J.; SMITH, G. J. Normal intestinal length in pre-term infants. *J Pediatr Surg*; 18(6):720-3, 1983.

TSANG, T. M.; TAM, P. K. M. Cytokine response of neonates to surgery. *J Pediatr Surg*; 29:794-7, 1994.

UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C. R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol*; 24:5434-46, 2004.

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

VANNUCCHI, M. G.; MIDRIO, P.; ZARDO, C. Neurofilament formation and synaptic activity are delayed in the myenteric neurons of rat fetus with gastroschisis. *Neurosci Lett*; 364:81-5, 2004.

VINTZILEOS, A.; CAMPBELL, W.; NOCHIMSON, D.; CONNOLLY, M. E.; FUENJER, M. M.; HOEHN, G. J. The fetal biophysical profile in patients with premature rupture of membranes-an early predictor of fetal infection. *Am J Obstet Gynecol*; 152:511-6, 1985.

VINTZILEOS, A.; CAMPBELL, W.; RODIS J. The fetal biophysical profile scoring: current status. *Clin Perinatol*; 16: 661-89, 1989.

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

WIGGLESWORTH, J. S. Experimental Growth Retardation in the Foetal Rat. J Pathol Bacteriol; 88:1-13, 1964.

WILLIAMS, D. A. Inflammatory Cytokines and Mucosal Injury. J Nat Cancer Inst, 29: 26-30, 2001.

YAMADA, T.; MINAKAMI, H.; MATSUBARA, S.; SATO, I. Meconium-stained amniotic fluid exhibits chemotactic activity for polymorphonuclear leukocytes in vitro. J Reprod Immunol; 46(1):21-30, 2000.

YU, J.; GONZALEZ-REYES, S.; DIEZ-PARDO, J.A. Effects of prenatal dexamethasone on the intestine of rats with gastroschisis. J Pediatr Surg; 38:1032-5, 2003.

YU, J.; GONZALEZ-REYES, S.; DIEZ-PARDO, J.A. Local dexamethasone improves the intestinal lesions of gastroschisis in chick embryos. Pediatr Surg Int; 19:780-4, 2004.