

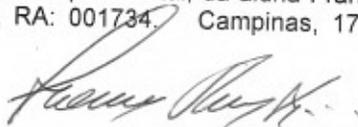
FRANCES LILIAN LANHELLAS GONÇALVES

C1
R-381

AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DAS ALÇAS INTESTINAIS
FETAIS UTILIZANDO HIDROGEL (BIOMATERIAL) NO
MODELO EXPERIMENTAL DE GASTROSQUISE

**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DAS ALÇAS INTESTINAIS
FETAIS UTILIZANDO HIDROGEL (BIOMATERIAL) NO
MODELO EXPERIMENTAL DE GASTROSQUISE**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da FCM/UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia, área de Pesquisa Experimental, da aluna Frances Lilian Lanhellas Gonçalves, RA: 001734, Campinas, 17 de dezembro de 2008.



Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto
Orientador

CAMPINAS

Unicamp

2008

FRANCES LILIAN LANHELLAS GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA PROTEÇÃO DAS ALÇAS INTESTINAIS
FETAIS UTILIZANDO HIDROGEL (BIOMATERIAL) NO
MODELO EXPERIMENTAL DE GASTROSQUISE**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do título de Mestre em
Cirurgia, área de concentração em Pesquisa Experimental

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

G856a Gonçalves, Frances Lilian Lanhellas
 Avaliação da proteção das alças intestinais fetais utilizando hidrogel
(biomaterial) no modelo experimental de gastrosquise / Frances Lilian
Lanhellas Gonçalves. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Lourenço Sbragia Neto
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gastrosquise. 2. Feto - cirurgia. 3. Abdômen - Doenças . 4.
Intestino – Doenças –Diagnóstico. 5. Embriologia. 6. Inflamação.
7. Biocompatibilidade. 8. Anomalias congênicas. 9. Rato como
animal de laboratório – Gravidez. I. Sbragia Neto, Lourenço II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

**Título em inglês : Assessment of the protection of the bowel using hydrogel
(biomaterial) in the experimental model of gastroschisis**

Keywords: • Gastroschisis
• Fetus - Surgery
• Abdomen – Diseases
• Bowel – Diseases – Diagnosis
• Embriology
• Inflammation
▪ Biocompatibility
• Congenital abnormalities
• Rat, laboratory animal, pregnancy

Titulação: Mestre em Cirurgia

Área de concentração: Pesquisa Experimental

Banca examinadora:

Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Prof. Dr. Gabriel Hessel

Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho

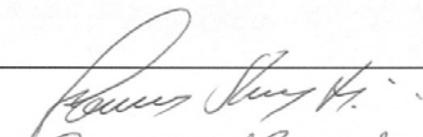
Data da defesa: 17 - 12 - 2008

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado
Frances Lilian Lanhellas Gonçalves

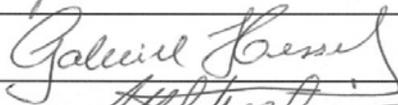
Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Membros:

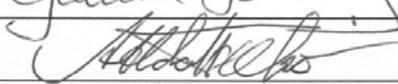
1. Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto -



2. Prof. Dr. Gabriel Hessel -



3. Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho -



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

Data: 17/12/2008

DEDICATÓRIA

*A dois sentimentos que sempre me acompanharam
durante os anos que se passaram:
Perseverança e Esperança.*

À minha fé

À Deus

Que mesmo escrevendo a vida por linhas tortas, trouxe-me até o final certo e feliz, sempre me fazendo acreditar no futuro. Obrigada, Pai!

À minha família

Aos meus pais e minha irmã

Meu pai Pedro, minha mãe Aldineia e minha irmã Vivane que mesmo diante de tantas dificuldades e momentos difíceis sempre me apoiaram, me amaram, me fortaleceram e acreditaram em mim.

À Simone

Meu amor, minha eterna companheira, pela paciência, amor e carinho em todos os meus dias. Que nosso casamento continue sendo exemplo para todos de superação, respeito, amor e felicidade.

A todos que ajudaram no meu mestrado

Ao orientador, Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Pela confiança depositada em mim ao me deixar realizar tantos experimentos novos e desafiadores em nosso laboratório promovendo a interdisciplinaridade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveria

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

À Dra. Regiane da Silva

Que com sua parceria incansável e importante sempre me forneceu o hidrogel para todas as cirurgias realizadas e me ajudou na realização de várias partes deste projeto no Instituto de Química.

A Profa. Dra. Sônia Maria Alves Bueno e ao Mestre Igor

Por cederem o equipamento, o laboratório na Faculdade de Engenharia Química e ajuda para a realização da eletroforese de IEF.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Violin Pereira

Por permitir o uso de seu laboratório para a realização da histologia e pelas orientações para as medidas histométricas.

À Adriana do Departamento de Microscopia Eletrônica

Pela ajuda e apoio constante para a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Pós-graduação e ao Departamento de Cirurgia

Pela atenção prestada e oportunidade para a realização deste trabalho.

À Fapesp e a Capes

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

À ex-secretária da Pós-graduação Vera e a atual, Paula

Pela ajuda, interesse e atenção em me ajudar em todos os momentos para a realização do Mestrado e confecção da Tese.

Aos meus amigos

À Dona Raquel

Pela sua amizade e zelo, além de sua ajuda para conseguirmos vidros em imensas quantidades para a fixação dos materiais.

Aos meus amigos do laboratório

Azize e Augusto pela amizade e constantes boas terapias em grupo. À Jéssica, Aline, Carol, Fábio, Bruno e Maidane pela amizade e parceria.

À Dra. Márcia Bueno

Pelas várias madrugadas em que me ajudou no laboratório para as cirurgias, mesmo que para isso atrasasse seu trabalho.

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

Poeta Eduardo Barreto

*“Os verdadeiros vencedores na vida são pessoas que olham para cada situação com a
esperança de poder resolvê-la ou melhorá-la.”*

Barbara Pletcher

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

Fernando Pessoa

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxv</i>
ABSTRACT	<i>xxxix</i>
1- INTRODUÇÃO	43
2- OBJETIVOS	51
2.1- Geral	53
2.2- Específico	53
3- MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1- Avaliação da Comissão de na Experimentação Animal	57
3.2- Preparação do Selante de Fibrina	57
3.3- Preparação do Hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc)	57
3.4- Animais	58
3.5- Constituição dos grupos	58
3.6- Esquema de estudo do experimento	59
3.7- Cirurgia	59
3.8- Coleta de Dados	64
3.9- Avaliação Morfométrica	65
3.10- Avaliação Histológica	65
3.11- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
3.12- Coleta de LA nas Idades Gestacionais da Rata	67
3.13- Determinação do Grau de Intumescimento dos Hidrogéis (Q)	67
3.14- Quantificação de Proteínas pelo Método de Bradford (1976)	68
3.15- Determinação da Carga Líquida do LA através de Isoeletrofocalização (IEF)	69

4- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
5- RESULTADOS.....	75
5.1- Análise Morfométrica.....	79
5.2- Análise Histológica.....	82
5.3- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	97
5.4- Determinação do Grau de Intumescimento do Hidrogel (Q).....	97
5.5- Quantificação de proteínas do LA pelo método de Bradford (1976)...	98
5.6- Eletroforese de Isoeletrofocalização (IEF).....	99
6- DISCUSSÃO.....	101
7- CONCLUSÃO.....	109
7.1- Geral.....	111
7.2- Específico.....	111
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
9- ANEXOS.....	123
10- APÊNDICES.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS

AAc	Ácido acrílico
BSA	Albumina de soro bovino
C	Controle
Ca ²⁺	Cálcio
Cl ⁻	Cloro
co	Copolímero
D-I, D-II, D-III e D-IV	Medida dos diâmetros intestinais I, II, III e IV
G	Gastrosquise
GA	Gastrosquise + Adesivo de Fibrina
GAH	Gastrosquise + Adesivo de Fibrina + Hidrogel
H/E	Hematoxilina de Erlich/Eosina
IEF	Isoeletrofocalização
K ⁺	Potássio
LA	Líquido amniótico
m	Massa
MBAAm	N,N-Metileno-bisacrilamida
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N ₂	Gás nitrogênio
Na ⁺	Sódio
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato)
PC	Peso corporal fetal
PI	Peso intestinal
pI	Ponto Isoelétrico
(Q)	Grau de Intumescimento
TEMED	N,N,N-Tetrametilenodiamina

LISTA DE NOTAÇÕES

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
°C	Grau Celcius
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
cm	Centímetro
Da	Dalton (g/mol)
G	(Gauge) Calibre de agulha
g	Gramma
Kg	Quilograma
Kv	Quilovolt
mA	MiliAmpère
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mmol L ⁻¹	Milimoles por litro
mol	Quantidade de matéria
mOsm	Miliosmol
n	Número de amostras
nm	Nanômetros
n°	Número
pH	Potência de Hidrogênio
pKa	- Log na base 10 da constante de acidez

LISTA DE FÓRMULAS

	PÁG.
Equação 1.....	67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	PÁG.
Esquema de Estudo do Experimento.....	59

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Diluição da curva de calibração com BSA para análise da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976).....	68
Tabela 2- Etapas de revelação do gel por nitrato de prata.....	69
Tabela 3- Resultados das medidas morfométricas de fetos de ratas dos 4 grupos estudados.....	81
Tabela 4- Representa as variáveis das medidas histológicas de intestinos de fetos de ratas dos 4 grupos estudados.....	96
Tabela 5- Absorbância e concentração de proteínas das amostras de LA nas diferentes idades gestacionais de ratas.....	98
Tabela 6- Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g) e Relação Peso Intestinal/Peso Corporal para os 4 grupos estudados.....	129
Tabela 7- Resultado das aferições dos diâmetros externos e internos.....	131
Tabela 8- Resultado das aferições da medida da altura dos vilos (μm) para os 4 grupos estudados.....	133
Tabela 9- Resultado das aferições das camadas serosa, muscular longitudinal, muscular circular, submucosa e mucosa e parede total intestinal em μm para os 4 grupos estudados.....	144

	PÁG.
Figura 1- Rata grávida <i>Sprague-Dawley</i> anestesiada (A) e corno uterino direito mostrando a seqüência de classificação fetal realizada (B).....	62
Figura 2- Modelo Experimental de Gastrosquise com aplicação do adesivo de fibrina (Beriplast®) e do hidrogel.....	63
Figura 3- Dissecção do intestino (A) e balança analítica (B).....	64
Figura 4- Esquema das medidas em cortes histológicos transversais de intestino para a análise estatística.....	66
Figura 5- Intestinos de fetos de ratas retirados do útero materno com 21,5 dias de gestação.....	78
Figura 6- Fetos de ratas após a cesárea com 21,5 dias de gestação.....	79
Figura 7- Fotomicrografia dos diâmetros dos intestinos dos fetos dos grupos.....	86
Figura 8- Fotomicrografia das vilosidades dos intestinos dos fetos dos grupos.....	87
Figura 9- Fotomicrografia das camadas intestinais nos grupos.....	89
Figura 10- Fotomicrografia da vilosidade intestinal e da camada serosa na gastrosquise.....	90
Figura 11- Microscopia eletrônica de varredura do intestino aderido ao hidrogel e ao adesivo de fibrina.....	97
Figura 12- IEF do LA dos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5...	99

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Gráfico 1- Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos.....	79
Gráfico 2- Comparação entre as medidas do peso intestinal dos fetos.....	80
Gráfico 3- Comparação entre a relação PI/PC dos fetos.....	81
Gráfico 4- D-I dos intestinos.....	82
Gráfico 5- D-II dos intestinos.....	83
Gráfico 6- D-III dos intestinos.....	84
Gráfico 7- D-IV dos intestinos.....	85
Gráfico 8- Altura das vilosidades dos intestinos.....	88
Gráfico 9- Espessura da parede intestinal.....	91
Gráfico 10- Espessura das camadas submucosa e mucosa dos intestinos.....	92
Gráfico 11- Espessura da camada muscular circular dos intestinos.....	93
Gráfico 12- Espessura da camada muscular longitudinal dos intestinos.....	94
Gráfico 13- Espessura da camada serosa dos intestinos.....	95
Gráfico 14- Grau de intumescimento dos hidrogéis em LA de diferentes dias gestacionais.....	98

RESUMO

Gastrosquise é um defeito congênito da parede abdominal anterior no qual as alças intestinais ficam herniadas e em contato com o líquido amniótico (LA). Assim, a exposição ao LA resulta em várias disfunções intestinais pós-natal. Para reduzir o tempo de exposição ao LA em modelo animal, usou-se um hidrogel de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) copolimerizado com ácido acrílico (Aac), que rapidamente intumescer na presença de LA. O hidrogel foi usado para cobrir as alças expostas até o fim da gestação. A gastrosquise foi induzida em fetos de ratas fêmeas da raça *Sprague-Dawley* através de um corte paramediano à direita do cordão umbilical para exposição parcial das alças com 18,5 dias de gestação. Os fetos foram separados em quatro grupos: controle (C), apenas gastrosquise (G), gastrosquise + cobertura das alças com adesivo de fibrina - Beriplast[®] (GA) e gastrosquise + cobertura das alças com adesivo de fibrina e aderido um pedaço de hidrogel seco (GAH). Os animais foram colhidos por cesárea com 21,5 dias de gravidez e o hidrogel foi cuidadosamente removido. Os fetos e as alças intestinais foram pesados e análise morfométrica foi realizada. Resultados mostraram que o hidrogel após intumescimento pesou 34X que seu peso seco; ele possui carga elétrica assim como a maioria das proteínas presentes no LA e sua retirada não provocou lesão à camada serosa do intestino exposto como visto na MEV. A comparação dos grupos C e GAH com os grupos G ou GA mostrou que o peso, o diâmetro, a espessura das camadas e da parede intestinais foi significativamente menor nos grupos C e GAH quando comparados aos grupos G e GA indicando processo inflamatório. Sendo assim, a aplicação do hidrogel aderido pelo adesivo de fibrina mostrou servir como uma efetiva proteção das alças herniadas, com uma redução significativa da inflamação na gastrosquise.

ABSTRACT

Gastroschisis is a congenital defect of the anterior abdominal wall which leads the fetal bowel to herniate into the amniotic cavity. There, exposition to amniotic fluid (AF), results in severe postnatal intestinal dysfunction. In order to reduce exposition time to AF in an animal model, has used a hydrogel of N-isopropylacrylamide (NIPAAm) copolymerized with acrylic acid (Aac), which undergoes rapid swelling in the amniotic fluid. The hydrogel was used to coat the bowel hernia until pregnancy is completed. Gastroschisis was induced in the fetuses of female *Sprague-Dawley* rats by partial evisceration of the bowel through a right paramedian opening of the abdominal wall in day 18,5 of pregnancy. The fetuses were separated in four groups: control (C), gastroschisis alone (G), gastroschisis + coating of the bowel hernia with fibrin adhesive -Beriplast[®] (GA) and gastroschisis + coating of the bowel hernia with fibrin adhesive topped by a piece of adhered dry hydrogel (GAH). Animals were harvested by cesarean section at day 21.5 of pregnancy and the hydrogel was carefully removed. Fetuses and intestinal tract were weighed and morphometric analysis was performed. Results showed that the hydrogel weight was 34X heavier than its dry weight; its electric charge and also the AF charge were negative and there was no damage to serosa layer of the intestine exposed. Comparison of the C and GAH groups with G and GA showed that the bowel weight, diameter, the layers and wall thickness was significantly reduced in C and GAH compared to G and GA. Thus, application of the hydrogel bound onto the fibrin adhesive was shown to provide an effective protection of the herniated bowel, with a significant reduction of inflammation in gastroschisis.

1- INTRODUÇÃO

A gastrosquise é um defeito congênito da parede abdominal caracterizado por um pequeno orifício, geralmente localizado à direita do umbigo, que permite a herniação e exposição permanente das alças intestinais ao líquido amniótico (LA) e seus componentes durante a gestação (Ambrose, 1972; Aoki et al., 1980).

A exposição permanente das alças ao LA e seus componentes causa alterações da morfologia e da histologia da parede intestinal que leva à hipomotilidade intestinal e deficiência na absorção dos nutrientes (Srinathan et al., 1995; Dilsiz et al., 1999; Santos et al., 2003). A hipomotilidade e a deficiência absorptiva intestinal, por sua vez, obrigam a utilização de nutrição parenteral prolongada e elevam a possibilidade de ocorrer complicações pós-operatórias, o que aumenta a morbidade, a mortalidade e o custo do tratamento médico-hospitalar (Morrison et al., 1998; Sydorak et al., 2002).

A gastrosquise acontece devido a uma falha no retorno das alças intestinais ainda embrionárias para dentro da cavidade abdominal quando esta inicia seu fechamento. No embrião, o intestino médio sofre um alongamento rápido por volta da 5ª semana de gestação, principalmente da porção cefálica (duodeno), resultando na formação da alça intestinal primária que penetra no celoma extra-embriônico durante a 6ª semana de gestação, comunicando-se com o saco vitelino através do ducto vitelino. Ao mesmo tempo em que a alça se alonga, ela gira no sentido anti-horário em torno do eixo da artéria mesentérica superior, dando origem aos cólons com o ceco que irá se posicionar à direita no abdome. Por fatores ainda desconhecidos, as alças intestinais herniadas começam a voltar para a cavidade abdominal por volta da 10ª semana, mas podem escapar por meio de uma fraqueza na parede localizada à direita do umbigo devido à falha da migração das células musculares provenientes de miótomos dorsais nesta região. Quando ocorre falha no retorno das alças intestinais para a cavidade abdominal, a rotação anti-horária é incompleta e as alças permanecem exteriorizadas em contato direto com o LA o que define embriologicamente o defeito que é a gastrosquise (Ambrose, 1972).

Apesar da etiologia da gastrosquise ser ainda desconhecida (Saxena et al., 2002; Singh et al., 2003; Davis et al., 2005), alguns autores como Hoyme et al., 1981, sugerem que ela ocorreria por uma regressão ou lesão precoce de uma das artérias

onfalomesentéricas na fase embrionária, quando estas artérias ? ligam o saco vitelínico à aorta dorsal.

Outras malformações vasculares, como: involução da veia umbilical direita, interrupção do ramo terminal da artéria mesentérica superior e/ou ruptura do cordão umbilical intra-útero também são apontadas como causas da gastrosquise. Alterações genéticas (grupos familiares com padrão de herança autossômica, de expressão variável), teratogênicas (radiação na fase de implantação), e drogas como o ácido acetilsalicílico, a pseudoefedrina, o acetaminofen e o tabagismo, estariam também envolvidas na sua etiologia (Wilson e Johnson, 2004; Kunz et al., 2005).

A gastrosquise ocorre em 1:5.000 a 1:10.000 nascidos vivos, acomete mais meninos que meninas numa proporção aproximada de 2:1 (Morrison et al., 1998; How et al., 2000; Saxena et al., 2002; Kunz et al., 2005) e incide mais em fetos de mães com idade abaixo dos 20 anos de baixa condição sócio-econômica, baixa escolaridade, associada à história obstétrica de aborto e curto intervalo de tempo entre a menarca e primeira gravidez (Tibboel et al., 1986; Wilson e Johnson, 2004).

A taxa de mortalidade da gastrosquise varia de 4 a 22 % mas pode chegar a 28 % quando associada à atresia intestinal ou perfuração e a 100 % quando ocorre volvo do intestino médio (Fitzsimmons et al., 1988; Stringer et al., 1991; Dilorenzo e Hyman, 1996; Wilson e Johnson, 2004). Em geral, nos países desenvolvidos onde há uma grande quantidade de unidades de terapia intensiva pediátrica e neonatal e boa assistência pré-natal, a mortalidade vem diminuindo com taxas de 5 a 10 %, já no Brasil a mortalidade é de 52 %, taxa considerada muito alta e explicada pelas baixas condições de atendimento perinatal (Hoyme et al., 1981; Vilela et al., 2001; Schalatter et al., 2003).

A gastrosquise raramente está associada a alterações cromossômicas, mas associada a alterações anatômicas, especialmente às atresias intestinais e malformações cardíacas, que vem aumentando em incidência (Kunz et al., 2005). Outras associações menos frequentes são ainda a criptorquidia, a hipospádia e as deformidades dos membros inferiores (Saxena et al., 2002).

Gastrosquise pode ser diagnosticada no período pré-natal por meio da ultra-sonografia, sendo possível visualizar as alças intestinais na cavidade amniótica por volta da 18ª semana (Fitzsimmons et al., 1988; Langer et al., 1990; Vergunta et al., 2005) e tendo como possíveis diagnósticos diferenciais a onfalocele, a extrofia vesical ou cloacal (Wilson e Johnson, 2004).

A fisiopatologia dos mecanismos de lesão da parede intestinal na gastrosquise fetal ainda não está completamente esclarecida, sabe-se que o tempo de exposição das alças intestinais ao LA é um dos fatores frequentemente considerados na origem do dano causado às alças intestinais fetais (Sherman et al., 1973; Tibboel et al., 1986; Langer et al., 1990).

Inicialmente, a lesão da parede intestinal da doença era atribuída exclusivamente à presença de urina no LA, pois uma série dos componentes urinários como glicose, proteínas, eletrólitos (Na^+ , Cl^- e K^+), uréia, creatinina, além de fosfatase alcalina e lactase poderiam ter uma ação tóxica direta sobre as alças (Potier et al., 1976; Kluck et al., 1983; Aktug et al., 1995; Albert et al., 2003). No entanto, outros autores comprovaram que a lesão das alças intestinais é consequência do contato das alças com o mecônio no LA e não da urina (Olguner et al., 2000; Api et al., 2001; Kanmaz et al., 2001).

O contato do intestino com o LA e seus componentes leva à formação de uma fina camada de fibrina (*fibrous peel ou fibrous coating*) sobre a camada serosa das alças intestinais (Nichol et al., 2004; Fasching et al., 2005) e espessamento das outras camadas da parede que acaba causando encurtamento e edemaciando o intestino (Langer et al., 1989; Dilsiz et al., 1999; Albert et al., 2003; Santos et al., 2003). Estas alterações da estrutura de crescimento do órgão comprometem a organização, a distribuição e o grau de maturidade dos gânglios e plexos mioentéricos (Vanucchi et al., 2003, 2004) com consequente hipomotilidade intestinal prolongada. Devido a isso, tem sido proposto por alguns autores, a antecipação do parto, em detrimento dos riscos da prematuridade, a fim de minimizar o dano causado às alças intestinais, apesar de não ser frequente (Dunn et al., 1999).

Vários modelos de experimentação animais vêm sendo descritos para avaliar as alterações histológicas e fisiopatológicas do intestino fetal na gastrosquise: ovelhas (Haller et al., 1974; Langer et al., 1989), coelhas (Bealer et al., 1996), ratos (Correia-Pinto et al., 2001), e embriões de aves (Dilsiz et al., 1999; Sencan et al., 2002). O

modelo em ratos tem várias vantagens, pois o rato apresenta curto período gestacional (termo=22 dias), oferece maior número de fetos por gestação além de ser de baixo custo na aquisição e manutenção (Correia-Pinto et al., 2001).

A utilização de hidrogéis (biomaterial) como proteção das alças intestinais fetais contra o LA poderia diminuir a inflamação do intestino e, conseqüentemente, a morbi-mortalidade neonatal.

A adequação das propriedades físicas e mecânicas dos hidrogéis para a viabilização destas aplicações depende fortemente da sua flexibilidade quando hidratado e da sua resistência à compressão. Estas propriedades, por sua vez, estão associadas ao grau de intumescimento do hidrogel e dependem diretamente do grau de reticulação da sua rede polimérica devido à presença de grupamentos químicos como os de ácidos carboxílicos, amidas, hidroxilas, entre outros na sua estrutura (Peppas et al., 2000; Hoffman, 2002; Berger, 2005).

Um polímero termo-sensível bastante estudado é o poli(N-isopropilacrilamida) (P(NIPAAm)). Em solução aquosa, este polímero apresenta separação de fases quando a solução é aquecida acima de 32 °C (temperatura consoluta inferior, LCST) (Schild, 1992). A adição de grupos ácidos como, por exemplo, o ácido acrílico, aumenta a temperatura de transição de fase com o aumento do pH da solução.

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

Os hidrogéis podem ser quimicamente estáveis ou degradáveis e eventualmente desintegrados e dissolvidos (Peppas et al., 2000; Hoffman, 2002). São muito utilizados no controle da liberação de drogas ingeridas via oral ao longo do trato digestivo, pois não só interagem com a mucosa gastrointestinal, mas também interagem com cólon, vagina e cartilagem nasal, pois são leves e ricos em água (Gutowska et al., 1997).

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

a capacidade de ser reversível, pois, dependendo da temperatura em que ele se encontra, pode ficar sólido ou aquoso (Peppas et al., 2000; Zhang et al., 2002).

Os hidrogéis em uso terapêutico são atóxicos e bons candidatos a sistemas de entrega de drogas, além de servir como uma cobertura para ferimentos e proteção contra micróbios. Para servir como cobertura é necessário que o hidrogel se mantenha aderido à serosa quando aplicado sobre a alça intestinal, para isso, utilizam-se adesivos naturais a base de fibrina ou fibrinogênio (Shishido et al., 2003).

A utilização de substâncias contendo fibrina ou fibrinogênio para homeostasia em cirurgias iniciou em 1915 e vários métodos vêm sendo desenvolvidos utilizando altas concentrações de fibrinogênio combinadas com fator XIII (Eberhard et al., 2006).

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

Para evitar uma fibrinólise excessivamente rápida, a aprotinina, derivada de tecido pulmonar bovino, é adicionada ao Beriplast[®] e o composto é metabolizado da mesma maneira que a fibrina endógena, por fibrinólise e fagocitose. Resultados clínicos mostraram que o Beriplast[®] P tem tido bom desempenho em procedimentos como cirurgia gastrointestinal, hepática, pancreática, biliar, plástica e neurocirúrgica (Mouritzen et al., 1993; Eberhard et al., 2006).

O uso de um filme de adesivo estéril já foi utilizado para tratamento de onfalocele (Ozbey, 2005), mas na literatura não há relato sobre o uso de materiais biossintéticos como protetores da superfície de um tecido para auxiliar na proteção da serosa e proteger as alças intestinais da gastrosquise quando em contato com o LA.

Portanto, a utilização do hidrogel aplicado ao modelo de gastrosquise experimental em ratas poderia trazer subsídios para a possível aplicação do tratamento pré-natal na gastrosquise em humanos e contribuir para diminuir a morbi-mortalidade e o custo da doença.

2- OBJETIVOS

2.1- Geral

Avaliar a eficácia da utilização do hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) como protetor das alças intestinais contra o LA no modelo experimental de gastrosquise em fetos de rato.

2.2- Específico

Avaliar no mesmo modelo:

- a) O grau de proteção das alças intestinas pelas medidas morfológicas e histométricas intestinais.
- b) O comportamento físico-químico do hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) por meio do teste de intumescimento (Q), da isoeletrofocalização (IEF) e da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Avaliação da Comissão de Ética em Experimentação Animal

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

3.2- Preparação do Selante de Fibrina

O Beriplast[®] P foi preparado pela junção de dois conjuntos: a) fibrinogênio humano e fator XIII humano de coagulação diluídos em solução de aprotinina bovina e b) trombina humana diluída em solução de cloreto de cálcio, cujo íon Ca^{2+} é ativador dessa proteína plasmática. A dose de 15 μL de cada conjunto foi aplicada com auxílio de pipetas analíticas Gilson[®], porém misturadas somente no momento da aplicação na alça intestinal.

3.3- Preparação do Hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc)

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

Os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) foram sintetizados em solução aquosa contendo 80 mol % dos monômeros totais de N-isopropilacrilamida (NIPAAm) previamente purificada com hexano, 20 mol % dos monômeros totais de Ácido acrílico (AAc) purificado por destilação, 5 mol % dos monômeros totais de N,N-Metileno-bisacrilamida (MBAAm) que é agente reticulante, todos na presença de persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (43 mmol L^{-1}) e N,N,N-Tetrametilenodiamina (TEMED) ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) que foram mantidos sob agitação constante em presença de N_2 gasoso por 1 hora a temperatura ambiente e depois somente sob agitação por 24 horas.

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

Os hidrogéis foram intumescidos em solução de persulfato de sódio e liofilizados para secagem. As membranas foram sintetizadas com tamanho de 10 x 15 cm e 0,4 cm de espessura, porém as películas de hidrogel para inserção na cavidade abdominal dos fetos foram recortadas com tamanho de 1 x 1 cm e 5 mg de massa.

3.4- Animais

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

3.5- Constituição dos Grupos

Para as análises morfométrica e histológica foram operadas 23 ratas, para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) seis e para a coleta do LA cinco, perfazendo um total de 34 ratas grávidas. Foram estudados quatro grupos no total, cada um contendo 12 fetos para análise morfométrica e histológica denominados:

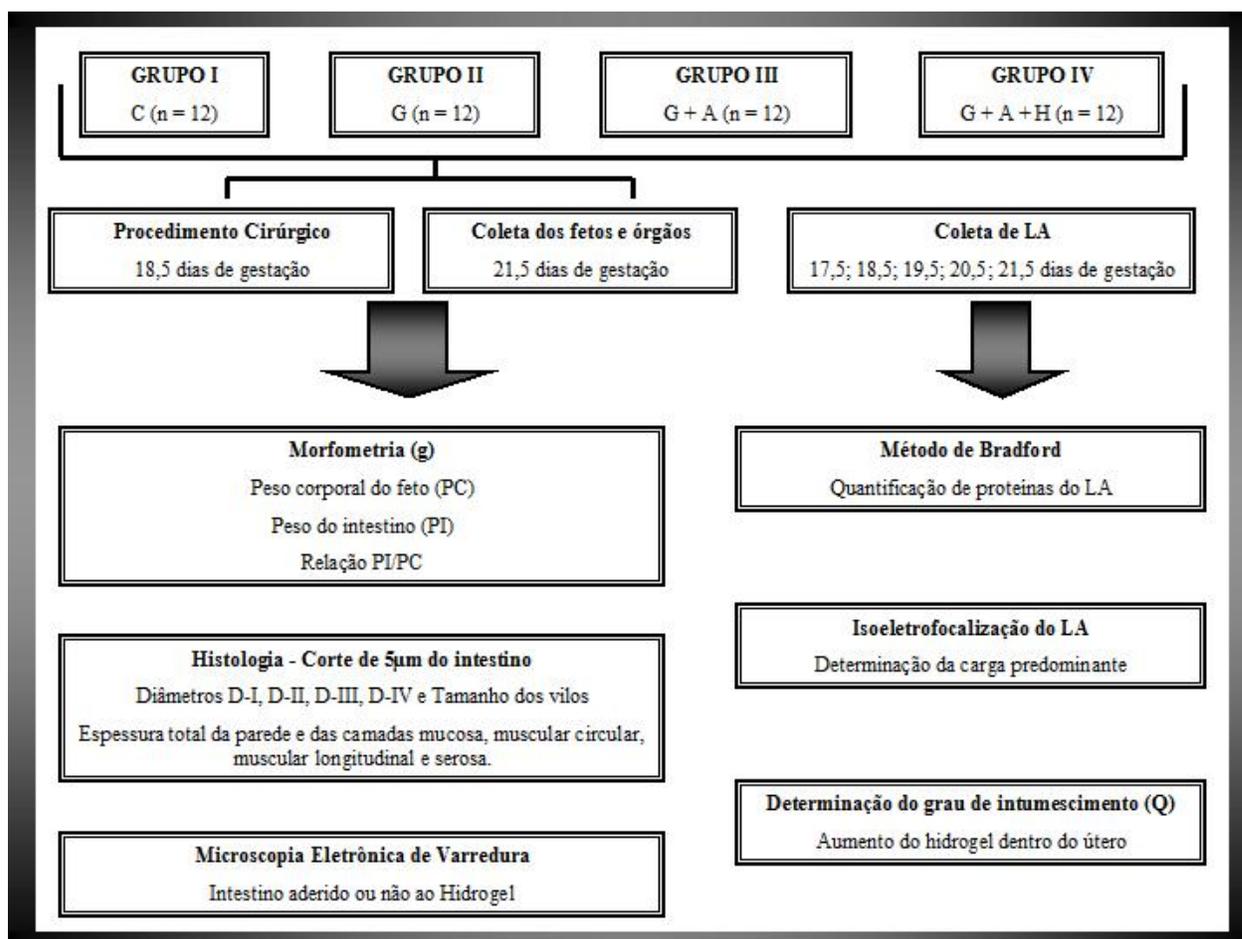
Grupo I (C) - Feto controle (sem a realização de procedimento cirúrgico)

Grupo II (G) - Feto operado com gastrosquise.

Grupo III (GA) - Feto operado com gastrosquise e cobertura com adesivo de fibrina (Beriplast[®]).

Grupo IV (GAH) - Feto operado com gastrosquise e cobertura com adesivo de fibrina (Beriplast[®]) mais hidrogel.

3.6- Esquema de estudo do experimento



3.7- Cirurgia

Os procedimentos cirúrgicos ocorreram pela manhã, com idade gestacional de 18,5 dias de gestação. Após aclimação no laboratório, as ratas grávidas foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de ketamina base – 50 mg/mL (Ketamina[®] - Pfizer do Brasil) associada com xilazina 10 mg/mL (Rompum[®] - Bayer do Brasil Ltda) na dose de 0,6 mL por animal via intra-muscular aplicado na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha de calibre 20G. Esta composição anestésica (180 mg/kg de ketamina e 1,25 mg/kg de xilazina) mantém o animal sob anestesia profunda durante um período de três horas e o pós-operatório transcorre de maneira indolor durante o período compreendido entre 6 e 12 horas.

O abdome foi submetido à raspagem dos pêlos com tosquadeira elétrica *Sunbeam*[®] com cuidado para não ferir os mamilos. Os animais foram colocados sobre placa aquecida por resistência elétrica, marca *Harvard Apparatus*[®], e previamente regulada na temperatura de 38 °C. Após assepsia com clorohexidina (*Chlorohex*[®]) solução aquosa e colocação de campos estéreis, o animal foi submetido à laparotomia mediana em dois planos (pele e aponeurose/peritônio). Em seguida, o útero bicornio foi delicadamente exposto e protegido com gaze estéril embebida em solução salina fisiológica aquecida a 38 °C (Figura 1). 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, seguido de gastrosquise com aplicação de adesivo com ou sem hidrogel. A numeração e a decisão cirúrgica seguiram continuamente em: feto IV - controle; feto V - gastrosquise; feto VI - controle; feto VII – gastrosquise + adesivo de fibrina ou gastrosquise + adesivo de fibrina + hidrogel e assim sucessivamente, pois este cuidado prévio na decisão da numeração dos fetos permite que não haja viés na decisão do feto a ser operado. Esta seqüência foi sucessivamente repetida, para o corno direito e para o corno esquerdo. As ratas utilizadas para a aplicação do hidrogel com adesivo de fibrina não foram as mesmas onde apenas o selante foi aplicado para que se pudesse avaliar a ação do adesivo separado e depois do conjunto. Em geral, ratas *Sprague-Dawley* concebem de 8 a 10 filhotes por gestação. O número de fetos submetidos à realização da gastrosquise foi de 3 a 4 fetos por rata grávida, sendo divididos em tratados (aplicação do biomaterial) e não-tratados (apenas gastrosquise).

A confecção da gastrosquise foi realizada de acordo com Correia-Pinto et al. (2001). Sob microscopia óptica estereoscópica (microscópio JF-Vasconcellos[®] - 4,5 X), uma sutura em bolsa com fio de Prolene[®] calibre 6-0 foi realizada na parede uterina. Em seguida, o útero foi aberto em suas duas camadas, muscular e membrana amniótica. O feto foi exposto pela incisão uterina até a altura da inserção do cordão umbilical e mantido com o abdome superior e o tórax no interior do útero materno. Em seguida, foi realizada a

retirada parcial do membro inferior direito e do membro inferior esquerdo, para facilitar a exposição da região abdominal a ser incisada. Esta manobra técnica diminui o risco de lesão dos vasos umbilicais durante o procedimento da gastrosquise.

Por meio de uma incisão de laparotomia para-umbilical direita, com extensão aproximada de 3 mm, abriu-se a cavidade abdominal fetal, com o cuidado de não lesar os vasos umbilicais e o fígado. As alças intestinais foram expostas com facilidade pela compressão delicada do abdome fetal com hastes flexíveis de algodão esterilizadas (cotonetes[®] Johnson & Johnson do Brasil). Após a realização da gastrosquise, o feto foi cuidadosamente recolocado na cavidade uterina e o útero foi fechado pela sutura em bolsa previamente realizada. O feto seguinte, denominado controle, não foi submetido à cirurgia e nem retirado do útero. O feto que recebeu apenas o adesivo de fibrina foi submetido ao mesmo procedimento de gastrosquise, mas sobre o intestino exposto foram aplicados 30 µL, sendo 15 µL do conjunto I e 15 µL do conjunto II. O feto que recebeu o adesivo de fibrina e o hidrogel também foi submetido ao mesmo procedimento de gastrosquise, mas sobre o intestino exposto foram aplicados 15 µL do conjunto II e no biomaterial foram aplicados 15 µL do conjunto I, de modo que a mistura dos dois conjuntos se deu imediatamente após a cobertura das alças pelo hidrogel (Figura 2). Antes de retornar o feto na cavidade uterina, o hidrogel foi mantido por aproximadamente 1 minuto na área de aplicação para permitir a reação de polimerização da fibrina e o intumescimento parcial do biomaterial. Para todos os casos, o adesivo foi aplicado com auxílio de pipetas analíticas Gilson[®].

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

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

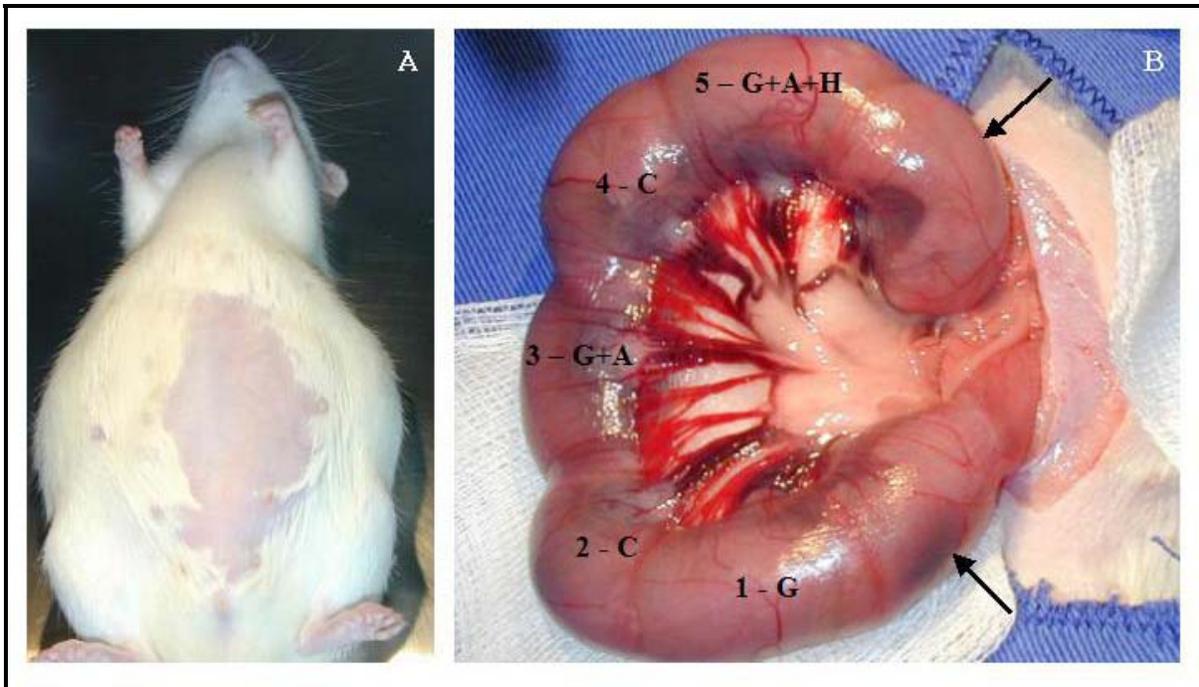


Figura 1- Em **A**, fotografia da rata grávida *Sprague-Dawley* já anestesiada e com o abdome raspado para início do procedimento cirúrgico. Em **B**, fotografia do corno uterino direito mostrando a seqüência de classificação fetal realizada em todas as cirurgias, porém ressaltando que os grupos GA e GAH foram feitos em ratas diferentes. As setas representam os fetos das extremidades que não são operados.

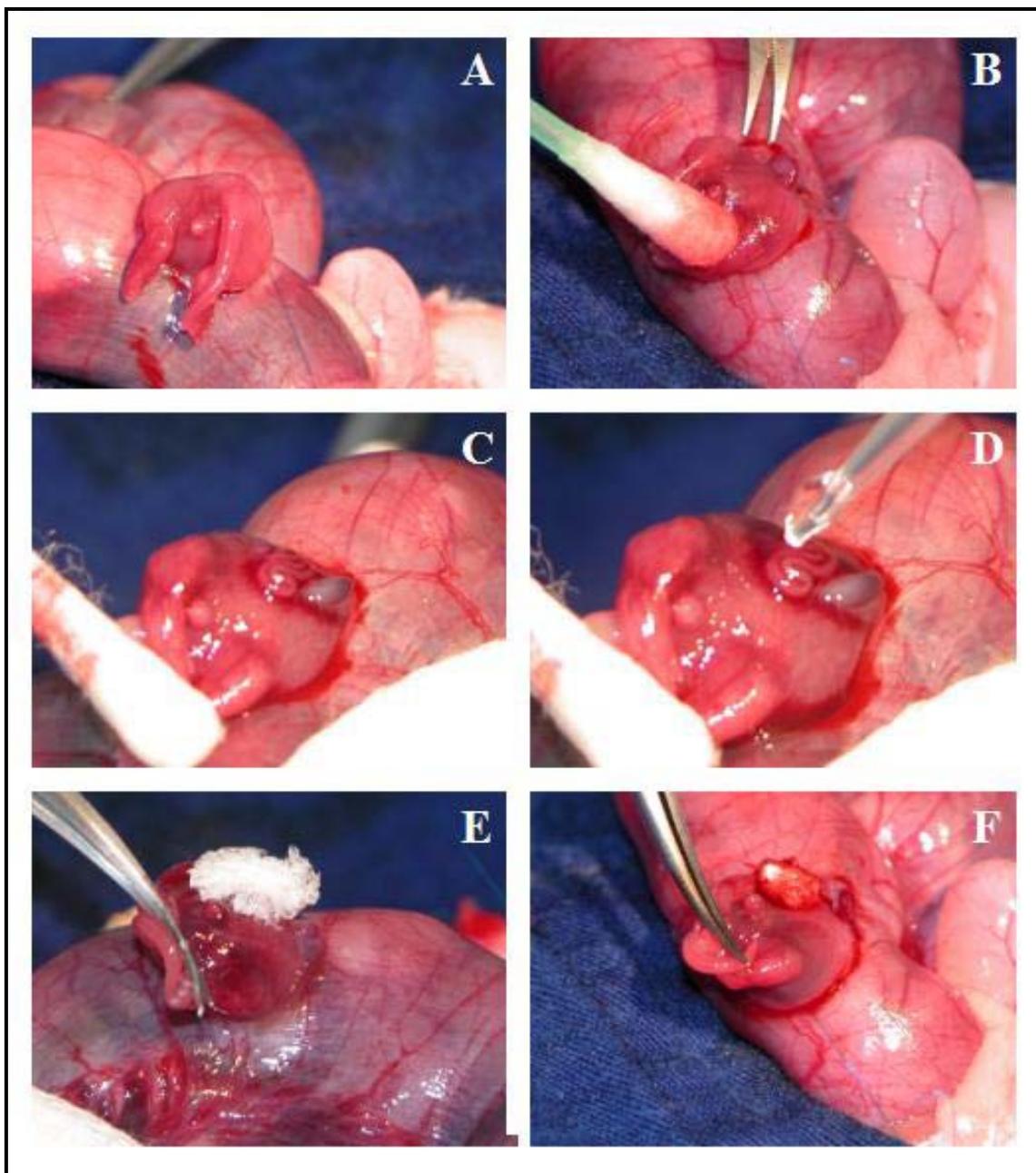


Figura 2- Procedimento cirúrgico realizado com 18,5 dias de gestação. (A) Exposição do feto após abertura da cavidade uterina, (B) incisão à direita do cordão umbilical, (C) exposição das alças intestinais como na gastrosquise (Grupo G), (D) aplicação do adesivo de fibrina Beriplast® (Grupo GA e GAH), (E) aplicação do hidrogel seco (Grupo GAH) e (F) adesão e intumescimento do hidrogel.

3.8- Coleta de Dados

No dia 21,5 de gestação, as ratas foram novamente anestesiadas (mesma dose previamente descrita) e submetidas à operação cesariana, por laparotomia mediana. Os fetos previamente operados e seus controles foram removidos do útero, sacrificados através de injeção letal do mesmo anestésico já descrito e punção occipital, sendo então, pesados em balança de precisão, modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) e obtidos os pesos corporais (PC) em mg. O abdome fetal foi aberto por incisão mediana e dissecado sob foco de luz e com auxílio de lupa, expondo as alças. As alças intestinais foram removidas desde o piloro até a região do reto superior, na reflexão peritoneal. O hidrogel que recobria as alças intestinais do grupo GAH foi retirado com auxílio de hastes flexíveis de algodão embebidas com soro fisiológico gelado, sendo que alguns órgãos continuaram com o biomaterial para estudos posteriores. O intestino de todos os grupos foi removido e pesado (g) para análise do peso intestinal (PI) e da relação peso intestinal / peso corporal (PI/PC) e em seguida foi fixado para estudo microscópico (Figura 3).



Figura 3- Em A, fotografia da dissecção do intestino desde o piloro ao reto. Em B, fotografia da balança analítica, onde foram medidos todos os pesos corporais em gramas (PC) de todos os fetos estudados, e também a pesagem sobre papel alumínio do intestino dissecado (PI).

3.9- Avaliação Morfométrica

A obtenção do PC e do PI permitiu o estudo estatístico dessas variáveis nos quatro grupos. A relação PI/PC foi criada entre estes dois parâmetros com o objetivo de se excluir a variável do PC sobre a avaliação do PI (Bittencourt et al., 2006).

3.10- Avaliação Histológica

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

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

Os cortes histológicos intestinais transversais foram fotografados utilizando o fotomicroscópio Nikon Eclipse E800, com ampliação de 20 vezes para a avaliação do diâmetro intestinal D-I (medida externa vertical desde a serosa), D-II (medida interna vertical desde a mucosa), D-III (medida externa horizontal desde a serosa) e D-IV

(medida interna horizontal desde a mucosa), 100 vezes para a medida da altura dos vilos e 200 vezes para a medida das camadas da parede intestinal. As imagens foram digitalizadas, possibilitando a medida dos diâmetros intestinais, altura dos vilos desde o topo até a junção da cripta, espessura total da parede, camadas mucosa e submucosa, muscular circular, muscular longitudinal e serosa por meio do programa Image Pro Plus® (Ribeiro et al., 2004 e França et al., 2008). As medidas, em μm , foram realizadas em orientação radial, nos quatro quadrantes de cinco cortes seqüenciais, de cada variável para cada feto (Figura 4).

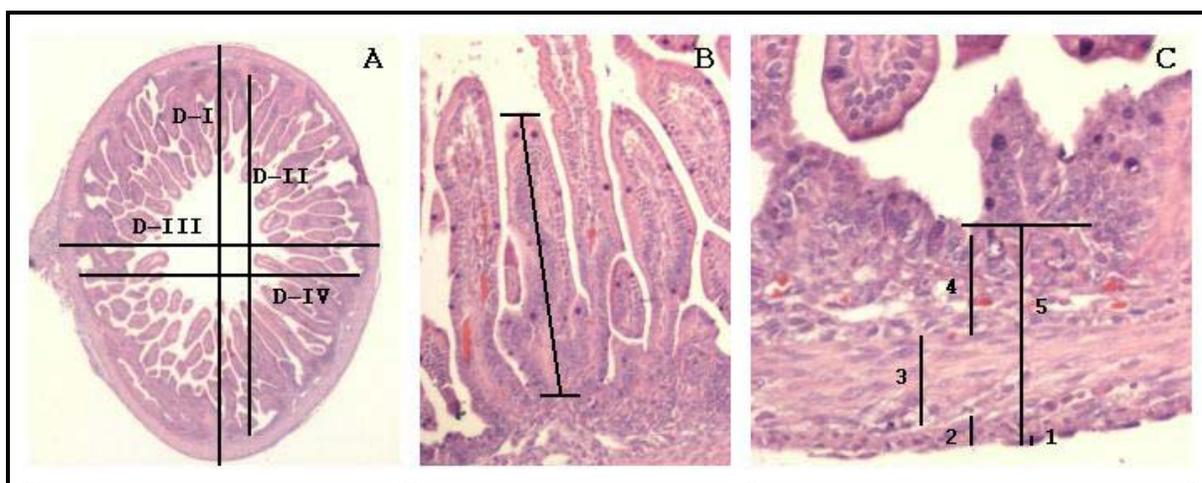


Figura 4- Esquema das medidas em cortes histológicos transversais de intestino para a análise estatística. Em A, aumento de 20x para medida dos diâmetros, observando que no D-I e D-III é desde a serosa e em D-II e D-IV é desde a mucosa. Em B, aumento de 100x para medida dos vilos desde o topo até a junção da cripta. Em C, aumento de 200x para medida das camadas, sendo 1- Serosa, 2 – Muscular Longitudinal, 3 – Muscular Circular, 4 – Submucosa e mucosa e 5 – Espessura total da parede.

3.11- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi realizada para verificar a preservação das alças intestinais quando em contato com o hidrogel e após a retirada do mesmo. O material foi fixado em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), contendo paraformaldeído 2 % e glutaraldeído 2,5 % durante 48 horas a 4 °C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão 0,1M (pH 7,4) com várias

trocas de 30 em 30 minutos. Em seguida, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. A lavagem do material foi feita novamente com o mesmo tampão por 30 minutos. Depois de fixadas e lavadas, as amostras foram desidratadas em álcool 30 %, 50 %, 70 % e 90 % por 10 minutos e depois por 20 minutos em álcool 100 %. Em seguida, foram levadas a Câmara de Ponto Crítico usando dióxido de carbono para total secagem.

Após secagem, elas foram montadas em suportes metálicos de 12 mm (*stubs*) e metalizadas com ouro metálico através de sistema de evaporação conhecido como *Sputtering*. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5800 LV com uma voltagem de aceleração de 10kv e as imagens gravadas para posterior análise.

3.12- Coleta de LA nas Idades Gestacionais da Rata

O LA foi coletado em todas as idades, sendo 17,5; 18,5; 19,5; 20,5 e 21,5 dias de gestação. Para a coleta, as ratas foram novamente anestesiadas (mesma dose previamente descrita) e submetidas à operação cesariana, por laparotomia mediana. O LA foi colhido com seringa de 5 mL e agulha de calibre 20 G e estocado a – 80 °C para análise protéica.

3.13- Determinação do Grau de Intumescimento dos Hidrogéis (Q)

O grau de intumescimento do hidrogel em LA foi determinado através da imersão de uma massa (m) conhecida do hidrogel seco (liofilizado) em LA até total imersão. Foi utilizado LA dos dias 17,5, 18,5, 19,5, 20,5, e 21,5 de gestação. Q foi definido como a relação entre a massa do gel intumescido no equilíbrio pela massa do gel seco (da Silva, 2007).

$$Q = m(\text{gel intumescido})/m(\text{gel seco}) \qquad \text{Eq. (01)}$$

3.14- Quantificação de Proteínas pelo Método de Bradford (1976)

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

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

Tabela 1- Diluição da curva de calibração com BSA para análise da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976).

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

Após a confecção da curva de calibração, as amostras de LA nas 5 idades gestacionais (17,5; 18,5; 19,5; 20,5 e 21,5 dias) foram medidas em triplicata, transferindo 20 µL de cada amostra para microtubos e adicionando 1000 µL do reagente de Bradford. Em seguida, esperou-se 10 minutos para a reação ocorrer. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Hewlett-Packard, model 8453, Palo Alto, CA, USA) em comprimento de onda de 595 nm com cubetas de plástico.

3.15- Determinação da Carga Líquida do LA através de Isoeletrofocalização (IEF)

Para a realização da corrida de IEF foram utilizados o sistema PhastSystem e o gel homogêneo de poliacrilamida PhastGel IEF 3-9 (Amersham Biosciences®) que possui um gradiente de pH 3-9 formado por anfólitos (Pharmalyte®) estáveis carregados isoeletricamente. A IEF consistiu de três passos: pré-focalização (formação do gradiente de pH) que já estava pronta, aplicação das amostras e focalização.

O kit de calibração de ponto isoeletrico (pI) (de 2,80 a 10,25) foi aplicado no primeiro e último poços e nos outros seguintes foram aplicados 20 µL de LA, sendo as amostras nas idades gestacionais respectivas (17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5 dias).

A corrida foi realizada a 15 °C, 2,5 mA e por aproximadamente 30 minutos. As proteínas migraram em condições previamente programadas e sem a necessidade de tampão até o pH correspondente ao seu pI e precipitaram. O gel foi revelado por nitrato de prata, seguindo os passos na Tabela 2 que, após a corrida e plastificação, teve sua imagem analisada.

Tabela 2- Etapas de revelação do gel por nitrato de prata

Etapa	Solução	Tempo (minuto)	Temperatura (°C)
1	Ácido tricloroacético 20 %	0,5	20
2	Etanol 50 % + Ácido acético 10 %	2	50
3	Etanol 10 % + Ácido acético 5%	2	50
4	Etanol 10 % + Ácido acético 5%	4	50
5	Glutaraldeído 8,3 %	6	50
6	Etanol 10 % + Ácido acético 5 %	3	50
7	Etanol 10 % + Ácido acético 5 %	0,5	50
8	Água Milli-Q®	2	50
9	Água Milli-Q®	2	50
10	Nitrato de prata 0,5 %	10	40
11	Água Milli-Q®	0,5	30
12	Água Milli-Q®	0,5	30
13	Revelador	0,5	30
14	Revelador	4	30
15	Ácido acético 5 %	5	50

4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

5- RESULTADOS

Das 34 ratas utilizadas três (8 %) apresentaram o útero muito hemorrágico com 18,5 dias de gestação e sendo assim no dia da coleta, todos os fetos estavam mortos. As 31 ratas que gestaram até o fim da gravidez sem problemas, forneceram 67 fetos, dos quais 11 morreram e foram excluídos (15 %), sendo quatro fetos do grupo G, quatro fetos do grupo GA e três fetos do grupo GAH. Dos 56 fetos vivos, 14 foram estudados em cada grupo, sendo dois destinados a MEV separadamente.

Durante a coleta, no dia do sacrifício, observou-se que, macroscopicamente, os intestinos dos fetos dos grupos G e GA eram edemaciados, avermelhados, aderidos e recobertos por uma película esbranquiçada, muito similar ao defeito observado em humanos. Já os fetos do grupo GAH quando retirados do útero materno apresentaram o hidrogel intumescido, com aspecto gelatinoso diferente da consistência original recobrimdo quase ou totalmente as alças intestinais que estavam parecidas com as do grupo C, sendo em poucos casos, um pouco mais edemaciadas e avermelhadas (Figuras 5 e 6).



Figura 5- Fotografias dos intestinos de fetos de rato retirados do útero materno com 21,5 dias de gestação. A – Grupo G; B – Grupo GA; C – Grupo C; D – Grupo GAH. Nota-se inflamação mais intensa nos grupos G e GA; o grupo GAH permanece parecido com o controle.



Figura 6- Fotografia dos fetos de rato após a cesárea com 21,5 dias de gestação. **A** - Hidrogel totalmente aderido às alças intestinais. **B** – Feto G com intestino totalmente inflamado. **C** – Feto GAH após a retirada do hidrogel. **D** – Feto C.

5.1- Análise Morfométrica

As médias de PC, em gramas, para os fetos dos quatro grupos foram: C = $4,32 \pm 0,79$, variando de 3,37 a 5,47; G = $4,62 \pm 0,68$, variando de 3,63 a 5,57; GA = $4,41 \pm 0,64$, variando de 3,03 a 5,26; GAH = $4,28 \pm 0,38$, variando de 3,78 a 4,98. Não há diferença estatística entre nenhum dos grupos (Gráfico 1).

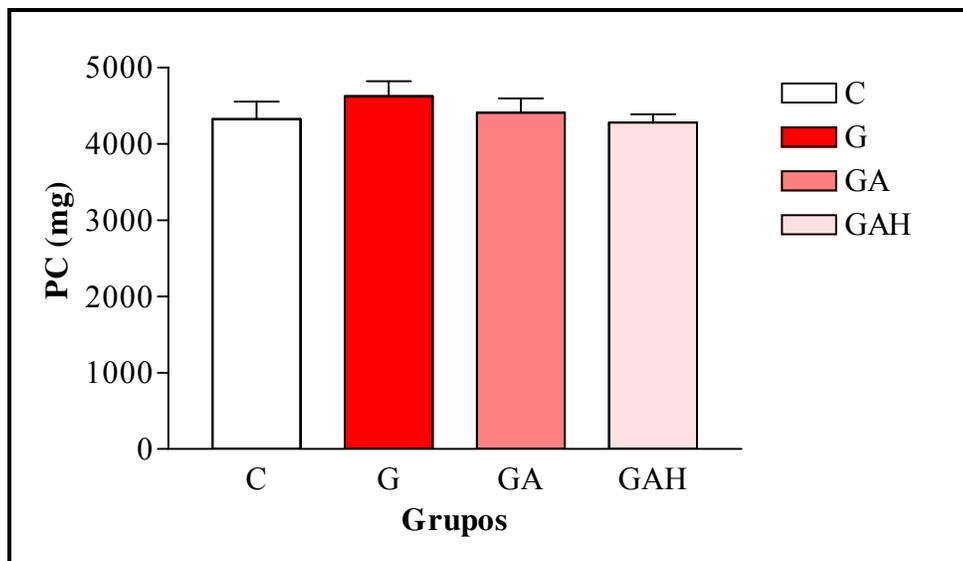


Gráfico 1- Comparação entre as medidas do peso corporal dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e sem diferença estatística ($p > 0,05$).

As médias de PI, em miligramas, dos fetos dos quatro grupos foram: C = $0,174 \pm 0,021$, variando de 0,147 a 0,207; G = $0,240 \pm 0,061$, variando de 0,163 a 0,394; GA = $0,231 \pm 0,062$, variando de 0,179 a 0,401; GAH = $0,193 \pm 0,041$, variando de 0,138 a 0,256. Existe diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). O PI do grupo C foi menor que dos grupos G ($p < 0,01$) e GA ($p < 0,05$). Entretanto, o PI do grupo GAH foi semelhante ao do grupo C e ao dos grupos G e GA (Gráfico 2).

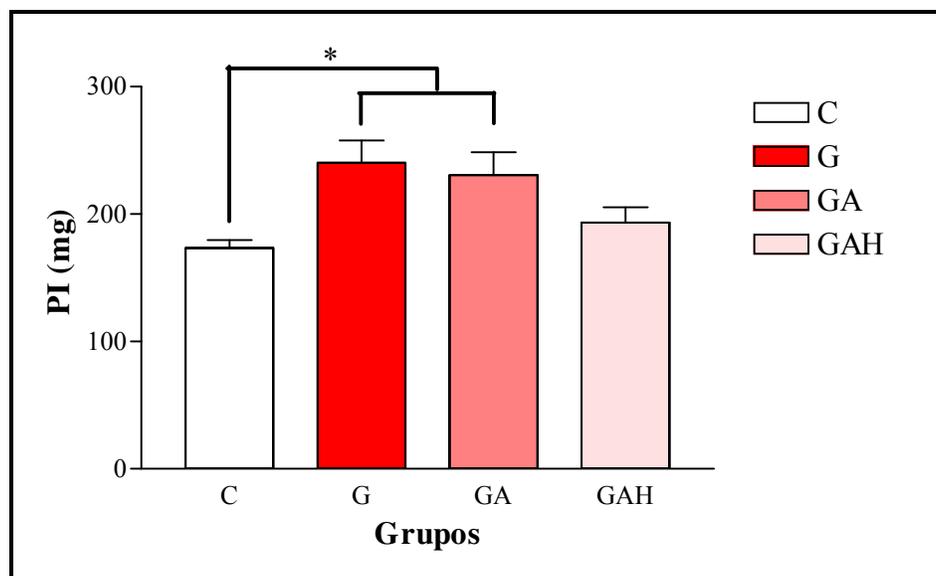


Gráfico 2- Comparação entre as medidas do peso intestinal dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. * ($p < 0,05$).

As médias das relações PI/PC, em porcentagem, para os fetos dos quatro grupos foram: C = $4,08 \pm 0,57$, variando de 3,33 a 4,92; G = $5,21 \pm 1,04$, variando de 4,03 a 7,67; GA = $5,32 \pm 1,51$, variando de 3,73 a 9,10; GAH = $4,50 \pm 0,76$, variando de 3,26 a 5,93. Ao se ajustar o valor de PI em relação ao PC dos fetos, observou-se um aumento mais intenso no PI dos fetos G. Existe diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). A relação PI/PC do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,05$, em relação a ambos). Entretanto, a relação PI/PC do grupo GAH foi semelhante ao do grupo C e ao dos grupos G e GA (Gráfico 3).

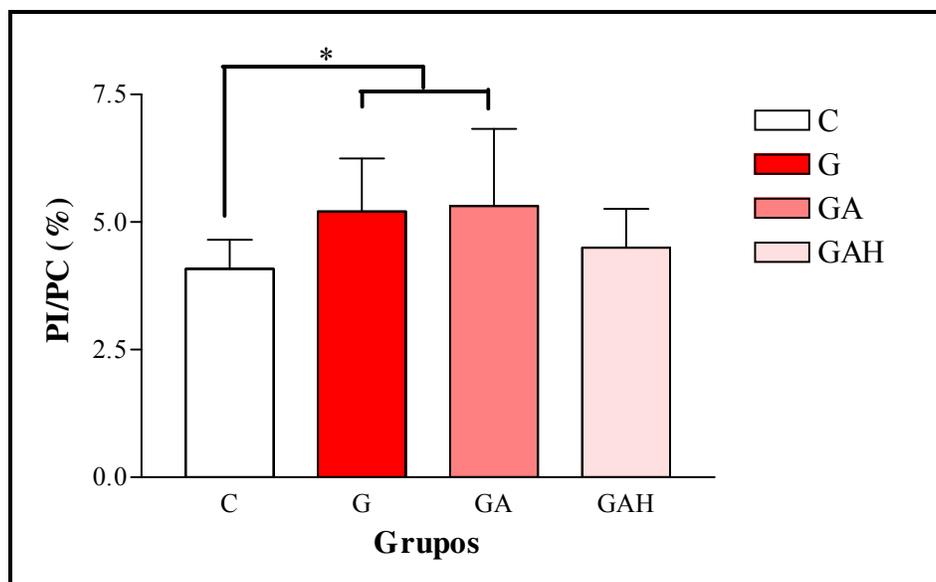


Gráfico 3- Comparação entre a relação PI/PC dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. * ($p < 0,05$).

A tabela 3 representa os resultados morfométricos para os pesos obtidos em gramas dos quatro grupos estudados. O método utilizado foi ANOVA seguido de pós-teste de Tukey-Kramer e o nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Tabela 3- Resultados das medidas morfométricas de fetos de ratas dos quatro grupos estudados.

Grupos	C (n=12)	G (n=12)	GA (n=12)	GAH (n=12)	P
PC (g)	4,32 ± 0,79	4,62 ± 0,68	4,41 ± 0,64	4,28 ± 0,38	NS
PI (g)	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,19 ± 0,04	<0,05 ^{§,¥}
PI/PC (%)	4,08 ± 0,57	5,21 ± 1,04	5,32 ± 1,51	4,50 ± 0,76	<0,05 ^{§,¥}

Valores expressos em média ± desvio-padrão. LEGENDA: C = Controle; G = Gastrosquise; GA = Gastrosquise + Adesivo; GAH = Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel; PC = Peso corporal; PI = Peso intestinal; PI/PC = Peso intestinal/Peso Corporal. Grupos de comparação: § = C x G, ¥ = C x GA.

5.2- Análise Histológica

As medidas em micrômetros (μm) obtidas para os diâmetros D-I, D-II, D-III e D-IV nos fetos dos quatro grupos estudados foram: D-I: C = $1101,77 \pm 87,69$ variando de 988,52 a 1193,88; G = $1866,88 \pm 345,79$ variando de 1454,70 a 2291,39; GA = $1443,41 \pm 183,18$ variando de 1221,14 a 1742,01 e GAH = $1270,04 \pm 85,96$ variando de 1170,29 a 1484,77. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$). O diâmetro D-I do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos). Entretanto, o diâmetro D-I do grupo GAH foi semelhante tanto ao do grupo C quanto ao do grupo GA (Gráfico 4).

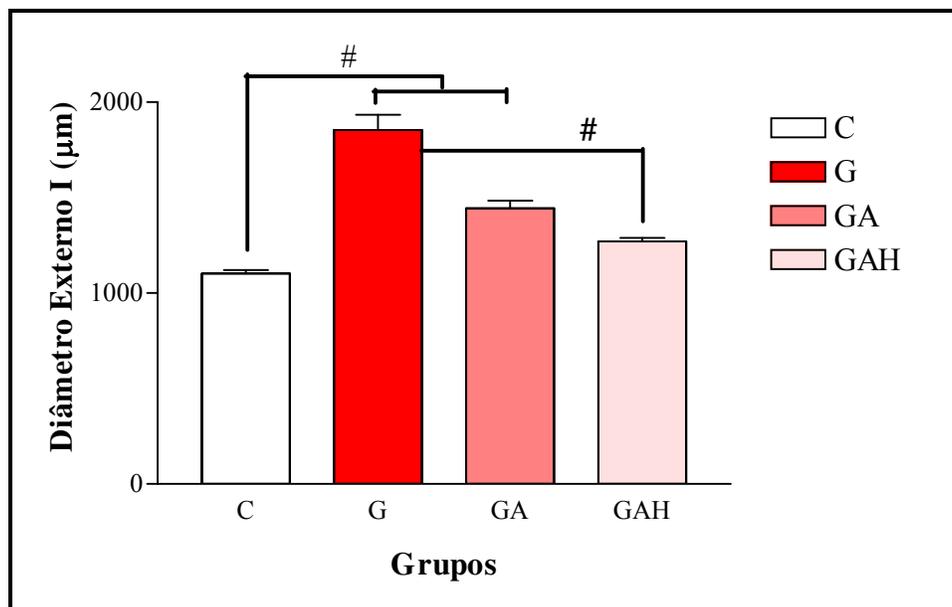


Gráfico 4- Diâmetro externo I, em μm , em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$).

Os valores de D-II foram: C = $983,49 \pm 100,89$ variando de 843,45 a 1127,20; G = $1583,27 \pm 309,41$ variando de 1210,70 a 2036,63; GA = $1278,12 \pm 183,23$ variando de 1040,84 a 1621,99 e GAH = $1085,70 \pm 62,76$ variando de 1010,25 a 1218,98. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$). O diâmetro D-II do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos). Entretanto, o diâmetro D-II do grupo GAH foi semelhante ao do grupo C ($p > 0,05$) e diferente aos dos grupos G ($p < 0,001$) e GA ($p < 0,05$) (Gráfico 5).

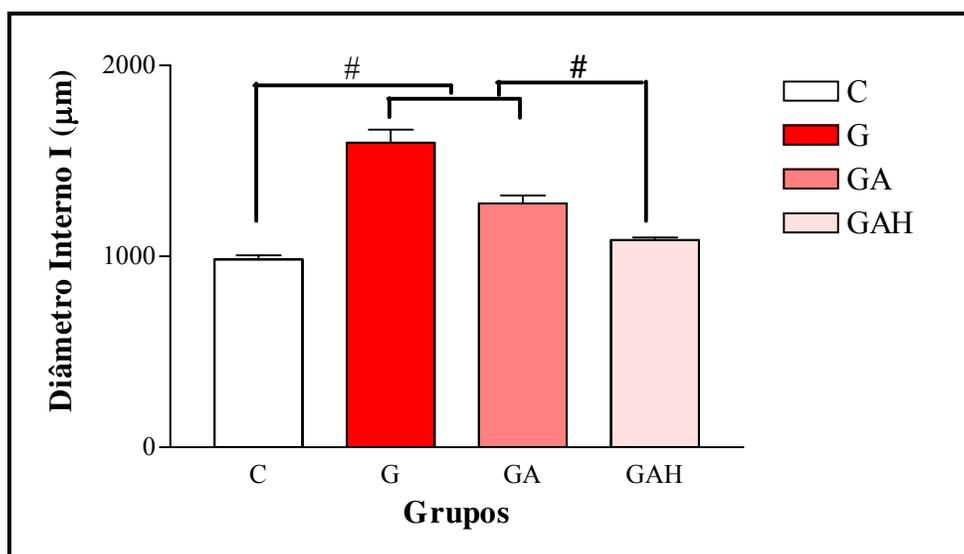


Gráfico 5- Diâmetro interno I, em µm, em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$).

Os valores de D-III foram: C = $915,21 \pm 49,07$ variando de 845,66 a 1008,82; G = $1547,71 \pm 341,39$ variando de 1011,24 a 1965,29; GA = $1281,41 \pm 149,25$ variando de 1125,36 a 1590,08 e GAH = $1051,07 \pm 132,55$ variando de 802,74 a 1208,82. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$). O diâmetro D-III do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos). Entretanto, o diâmetro D-III do grupo GAH foi semelhante ao do grupo C e diferente dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos) (Gráfico 6).

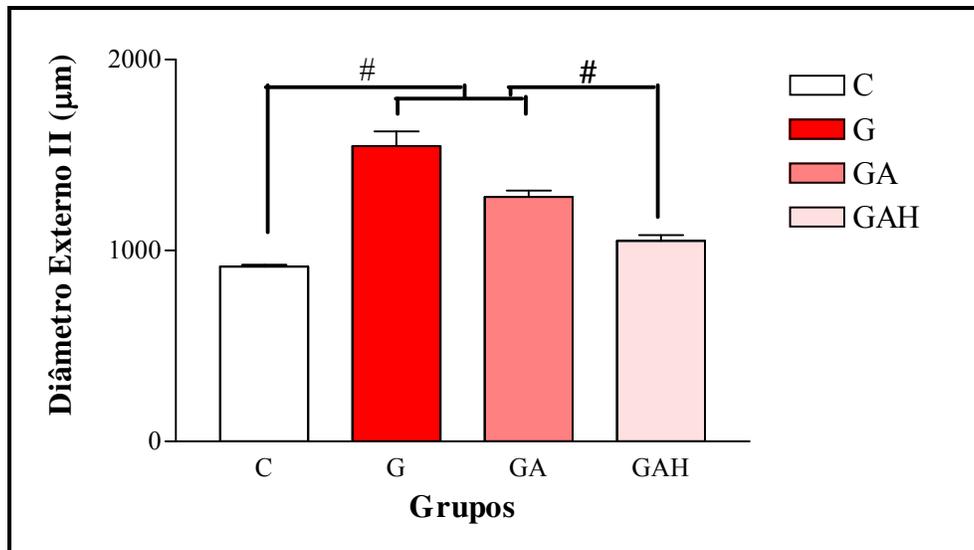


Gráfico 6- Diâmetro externo III, em µm, em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$).

Os valores de D-IV foram: C = $806,71 \pm 58,84$ variando de 719,99 a 891,80; G = $1357,31 \pm 339,98$ variando de 790,91 a 1713,23; GA = $1145,33 \pm 159,12$ variando de 984,10 a 1508,63 e GAH = $886,57 \pm 154,29$ variando de 701,24 a 1120,38. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$). O diâmetro D-IV do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos). Entretanto, o diâmetro D-IV do grupo GAH foi semelhante ao do grupo C e diferente dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos) (Gráfico 7).

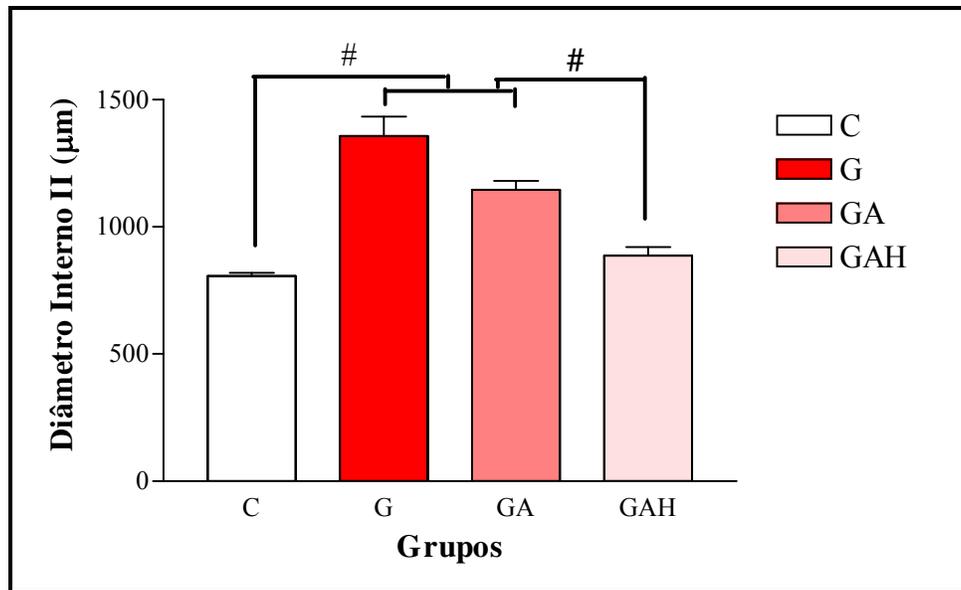


Gráfico 7- Diâmetro interno IV, em μm , em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$).

A figura 7 mostra os diâmetros dos cortes histológicos dos quatro grupos.

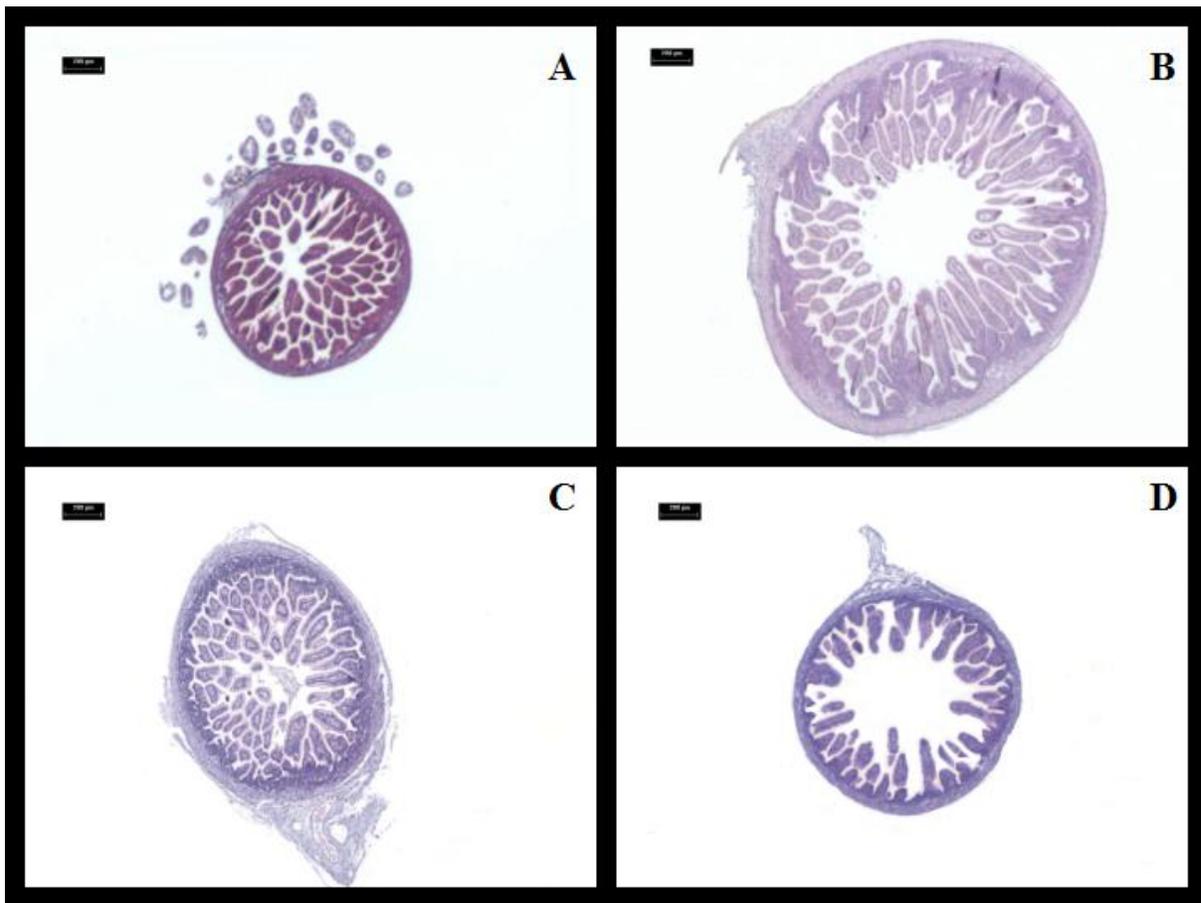


Figura 7- Fotomicrografia dos diâmetros dos intestinos dos fetos dos quatro grupos. A - C; B – G; C – GA; D - GAH. Nota-se que o intestino com G é maior que o C, enquanto o intestino com GAH tem diâmetro parecido com o C. Barra de 200 µm.

As medidas em µm obtidas para a altura das vilosidades foram: C = $161,29 \pm 77,11$ variando de 50,26 a 383,46; G = $173,04 \pm 87,43$ variando de 49,89 a 442,01; GA = $175,27 \pm 74,61$ variando de 41,90 a 350,12 GAH = $164,21 \pm 78,13$ variando de 36,81 a 358,72 (Gráfico 8 e Figura 8). Não há diferença estatística entre os grupos.

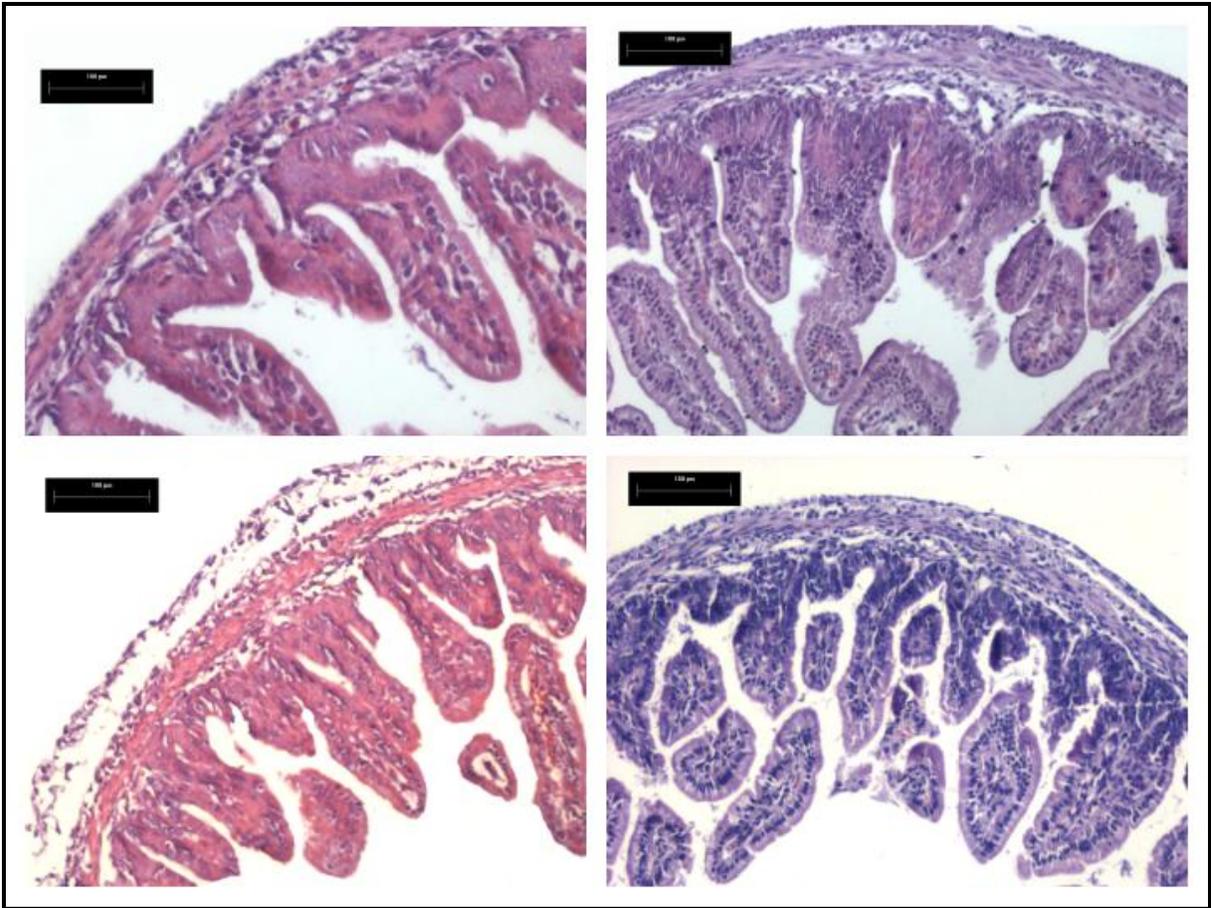


Figura 8- Fotomicrografia das vilosidades dos intestinos dos fetos dos quatro grupos. A - C; B – G; C – GA; D - GAH. Nota-se que as vilosidades não se alteram quanto à altura nem espessura nos grupos estudados. Barra de 100 µm.

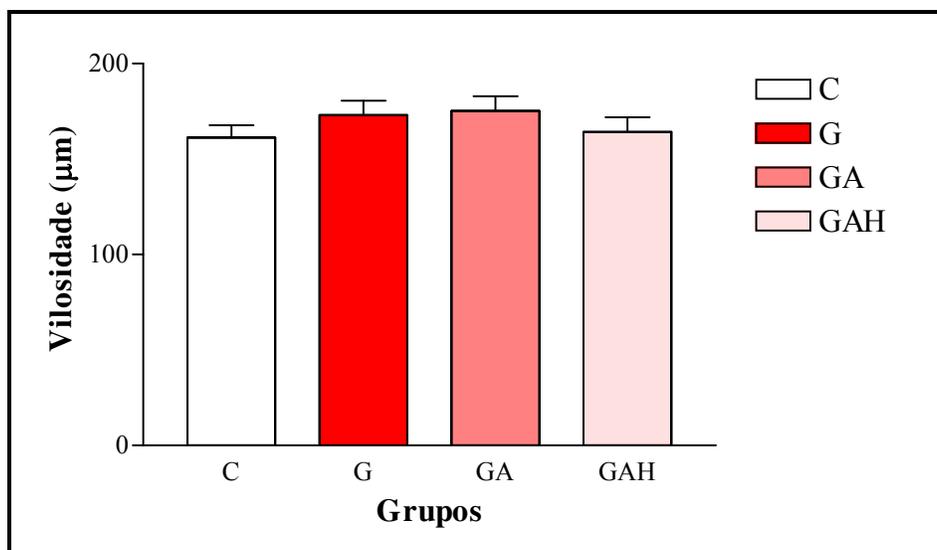


Gráfico 8- Altura, em µm, das vilosidades em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e sem diferença estatística.

As medidas em µm obtidas para a espessura total da parede intestinal foram: C = $65,84 \pm 21,19$ variando de 39,70 a 126,80; G = $98,93 \pm 75,33$ variando de 46,57 a 169,18; GA = $95,42 \pm 26,08$ variando de 59,70 a 162,76 e GAH = $67,25 \pm 25,12$ variando de 32,28 a 133,77 (Gráfico 9). Houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$). A espessura total da parede do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos). Entretanto, o grupo GAH foi semelhante ao grupo C e diferente dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos) Todas as camadas na G tiveram aumento na espessura, começando pela serosa, uma vez que a inflamação começa de fora para dentro ($p < 0,005$) (Figuras 9 e 10).

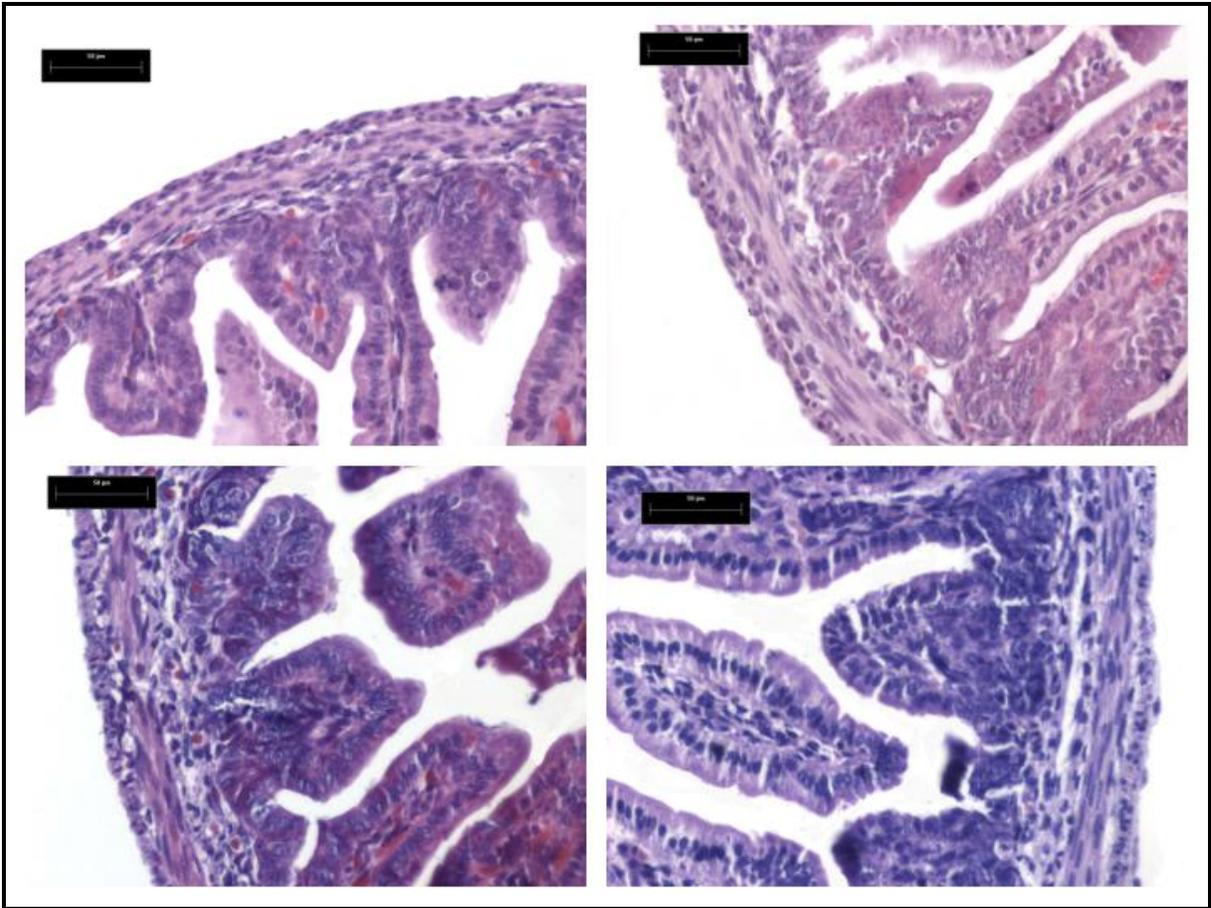


Figura 9- Fotomicrografia das camadas intestinais nos quatro grupos. A – C; B – G; C – GA; D - GAH. Nota-se que o grupo G apresenta espessamento das camadas ao contrário do grupo C e do grupo GAH. Barra de 50 µm.

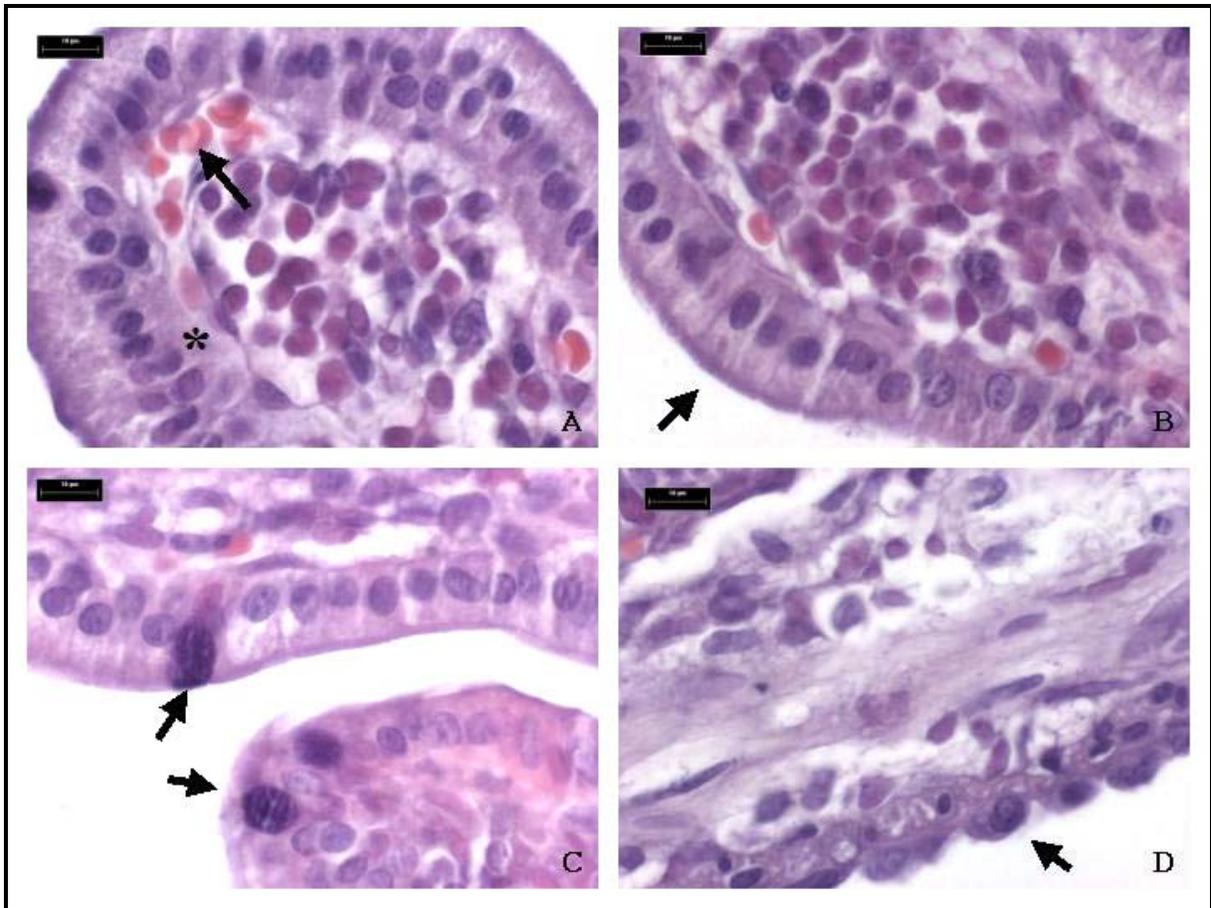


Figura 10- Fotomicrografia da vilosidade intestinal e da camada serosa na G. A – Vilosidade intestinal evidenciando o epitélio prismático (*) e o tecido conjuntivo com hemáceas (seta). B – Epitélio de revestimento possui as células com bordas estriadas, constituídas por microvilos para aumentar a absorção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

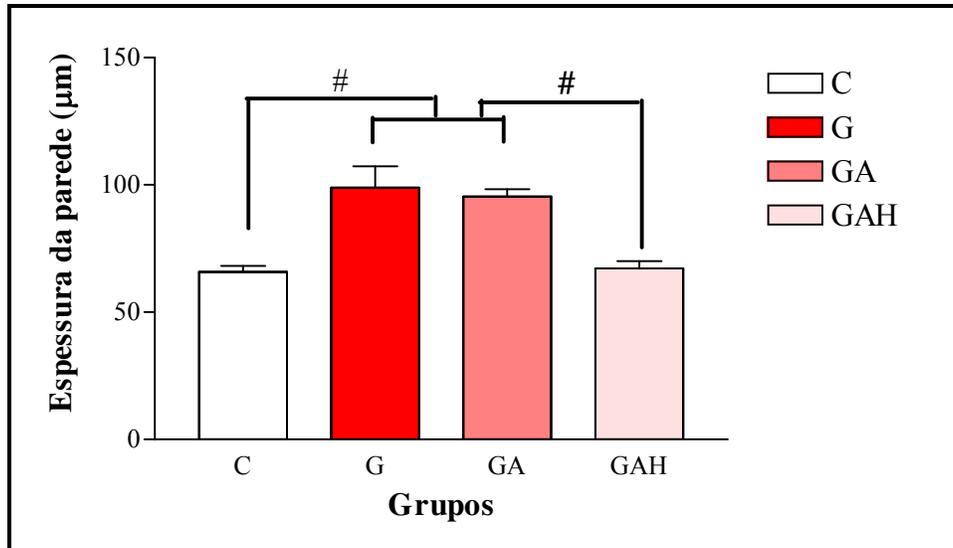


Gráfico 9- Espessura, em μm , da parede intestinal em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$).

As medidas em μm obtidas para a espessura da submucosa e mucosa foram: C = $39,60 \pm 17,32$ variando de 18,08 a 94,34; G = $50,73 \pm 41,47$ variando de 19,70 a 102,97; GA = $50,47 \pm 22,01$ variando de 16,75 a 113,87 e GAH = $34,83 \pm 12,65$ variando de 14,38 a 67,93. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$). A espessura da mucosa e submucosa do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,05$, em relação a ambos). Entretanto, o grupo GAH foi semelhante ao grupo C e diferente dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos) (Gráfico 10).

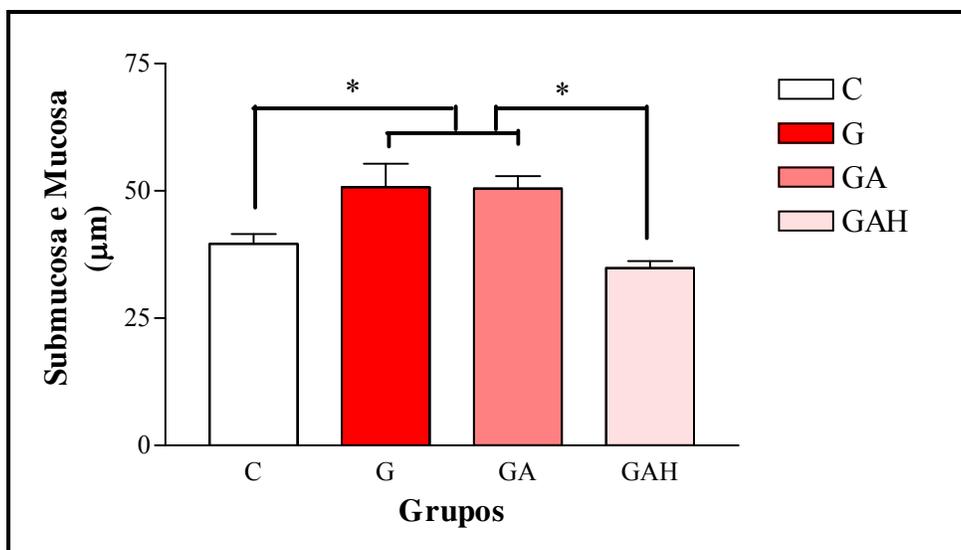


Gráfico 10- Espessura, em μm , das camadas submucosa e mucosa juntas em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. * ($p < 0,05$).

As medidas em μm obtidas para a espessura da muscular circular foram: C = $15,40 \pm 5,21$ variando de 8,86 a 34,06; G = $30,86 \pm 25,97$ variando de 9,06 a 60,52; GA = $23,97 \pm 5,96$ variando de 11,91 a 38,44 e GAH = $17,40 \pm 7,64$ variando de 6,75 a 43,53. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$). A espessura da camada circular do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos). Entretanto, o grupo GAH foi semelhante ao grupo C e diferente dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos). (Gráfico 11).

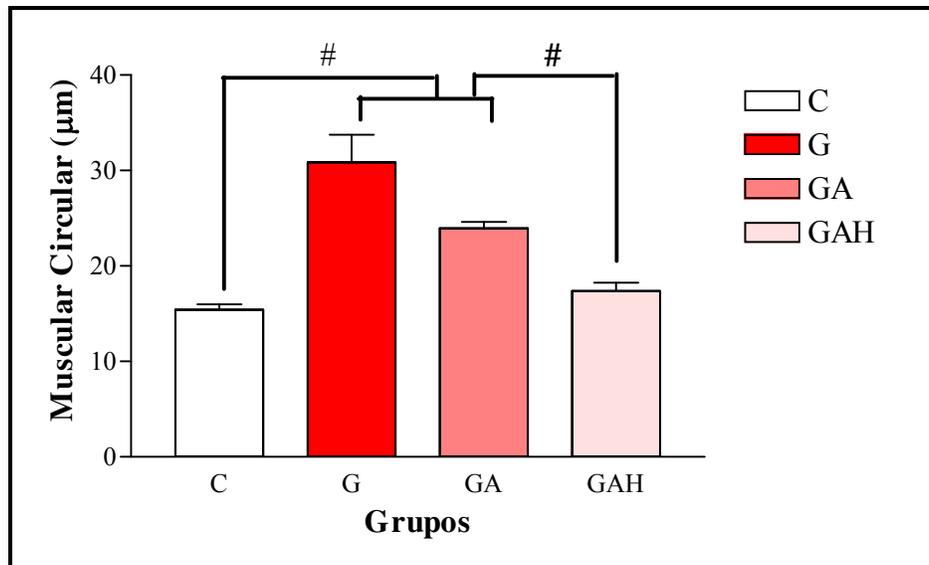


Gráfico 11- Espessura, em μm , da camada muscular circular em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$).

As medidas em μm obtidas para a espessura da muscular longitudinal foram: C = $8,82 \pm 2,34$ variando de 5,10 a 13,69; G = $11,04 \pm 6,64$ variando de 4,22 a 18,99; GA = $13,88 \pm 2,27$ variando de 9,68 a 21,48 e GAH = $9,81 \pm 3,30$ variando de 4,00 a 16,88. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$). A espessura da camada longitudinal do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos). Entretanto, o grupo GAH foi semelhante ao grupo C e diferente dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos) (Gráfico 12).

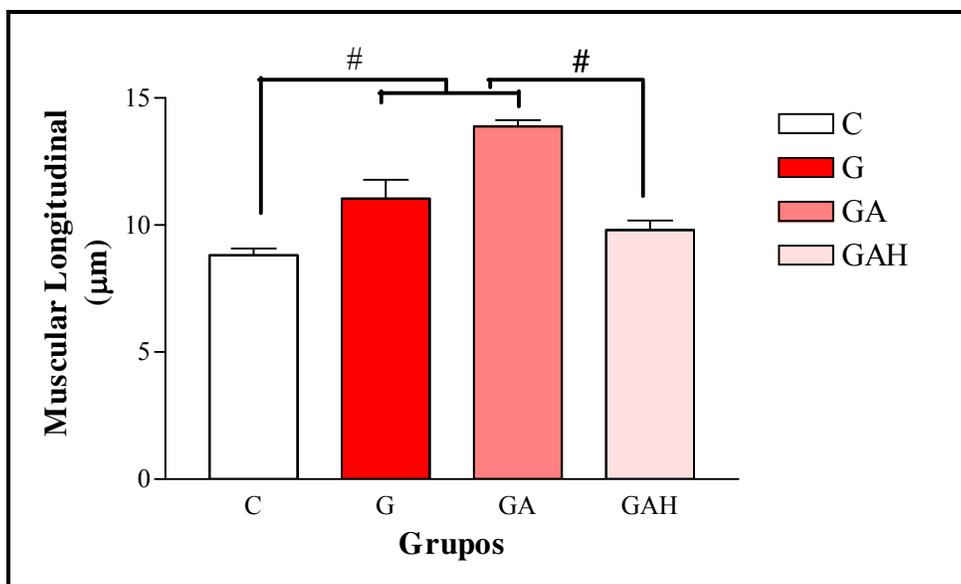


Gráfico 12- Espessura, em μm , da camada muscular longitudinal em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$).

As medidas em μm obtidas para a espessura da serosa foram: C = $3,20 \pm 0,83$ variando de 1,42 a 5,21; G = $5,37 \pm 2,71$ variando de 1,70 a 9,92; GA = $5,40 \pm 1,01$ variando de 3,40 a 8,96 e GAH = $3,66 \pm 1,07$ variando de 2,11 a 5,52. Há diferença estatística entre os grupos ($p < 0,0001$). A espessura da serosa do grupo C foi menor que dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos). Entretanto, o grupo GAH foi semelhante ao grupo C e diferente dos grupos G e GA ($p < 0,001$, em relação a ambos) (Gráfico 13).

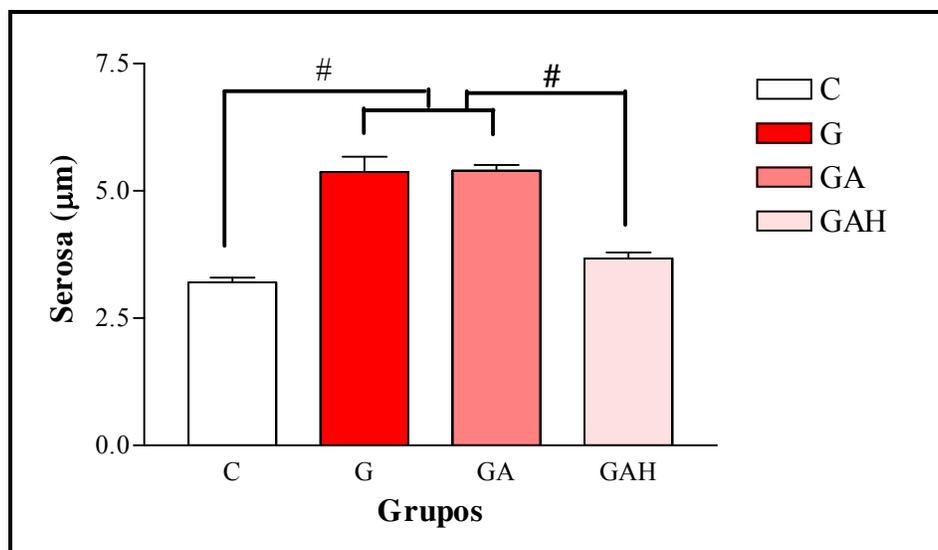


Gráfico 13- Espessura, em μm , da camada serosa em corte transversal dos intestinos dos fetos dos grupos C, G, GA e GAH, com desvio padrão e diferença estatística. # ($p < 0,001$).

A tabela 4 apresenta todos os resultados morfométricos dos diâmetros, das vilosidades e das camadas dos grupos estudados. O método utilizado foi ANOVA seguido de pós-teste de Tukey-Kramer e o nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Tabela 4- Representa as variáveis das medidas histológicas de intestinos de fetos de ratas dos quatro grupos estudados

	C	G	GA	GAH	p
DI-I	1101,77 ± 87,69	1866,88 ± 345,71	1443,41 ± 183,18	1270,04 ± 85,96	<0,001 ^{§,¥,□}
DI-II	983,49 ± 100,89	1583,27 ± 309,41	1278,12 ± 183,23	1085,70 ± 62,76	<0,001 ^{§,¥,□,£}
DI-III	915,21 ± 49,07	1547,71 ± 341,39	1281,41 ± 149,25	1051,07 ± 132,55	<0,001 ^{§,¥,□,£}
DI-IV	806,71 ± 58,84	1357,31 ± 339,98	1145,33 ± 159,12	886,57 ± 154,29	<0,001 ^{§,¥,□,£}
Altura dos vilos	161,29 ± 77,11	173,04 ± 87,43	175,27 ± 74,61	164,21 ± 78,13	NS
Espessura	65,84 ± 21,19	98,93 ± 75,33	95,42 ± 26,08	67,25 ± 25,12	<0,001 ^{§,¥,□,£}
Mucosa e Submucosa	39,60 ± 17,32	50,73 ± 41,47	50,47 ± 22,01	34,83 ± 12,65	<0,001 ^{§,¥,□,£}
Muscular Circular	15,40 ± 5,21	30,86 ± 25,97	23,97 ± 5,96	17,40 ± 7,64	<0,001 ^{§,¥,□,£}
Muscular Longitudinal	8,82 ± 2,34	11,04 ± 6,64	13,88 ± 2,27	9,81 ± 3,29	<0,001 ^{§,¥,□,£}
Serosa	3,20 ± 0,83	5,37 ± 2,71	5,40 ± 1,01	3,67 ± 1,07	<0,001 ^{§,¥,□,£}

Valores expressos em média ± desvio-padrão. LEGENDA: C = Controle; G = Gastrosquise; GA = Gastrosquise + Adesivo; GAH = Gastrosquise + Adesivo + Hidrogel; DI-I = Diâmetro externo 1; DI-II = Diâmetro interno 1; DI-III = Diâmetro externo 2; DI-IV = Diâmetro interno 2. Grupos de comparação: § = C x G, ¥ = C x GA, □ = GAH x G e £ = GAH x GA.

5.3- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Podemos observar através das micrografias de MEV (Figura 11) da junção entre os biomateriais (adesivo e hidrogel) e intestino que houve preservação do hidrogel e do órgão. A superfície do hidrogel que ficou em contato com o intestino não sofreu alterações e nem rompimento (Figura 11B). O hidrogel manteve sua rede tridimensional, porém não tão regular como anteriormente (Figura 11A e 11C) e entre os poros houve acúmulo de células vermelhas, porém em pouca quantidade (Figura 11D). O hidrogel aderiu bem ao intestino através do adesivo de fibrina (Figura 11E) e recobriu completamente as alças expostas (Figura 11F). Não houve danos à parede do intestino (Figura 11G) e suas camadas da serosa às vilosidades (Figura 11B e 11H) mesmo após a retirada do hidrogel.

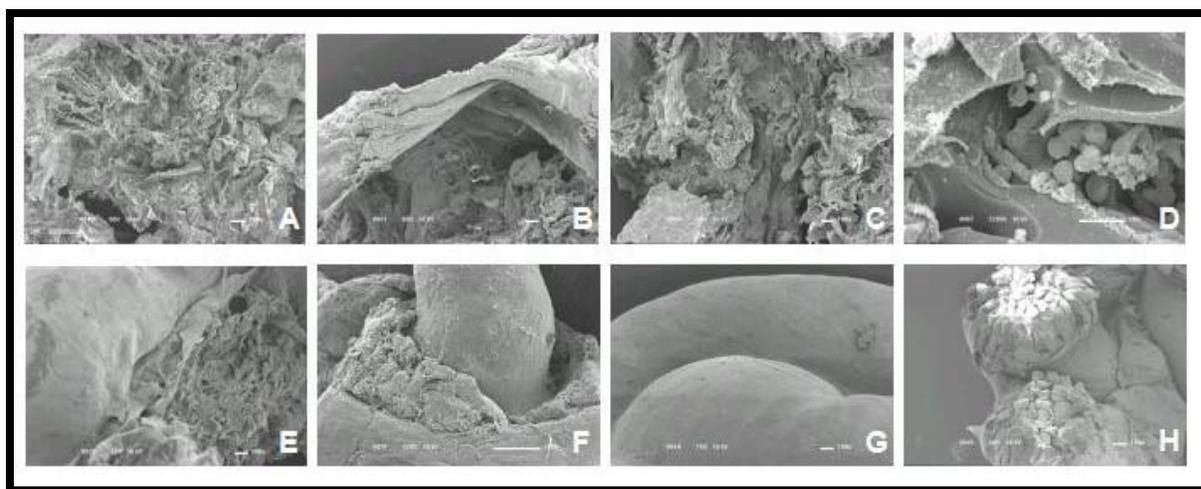


Figura 11- Microscopia eletrônica de varredura do exterior (A) e interior (B, C, D) do hidrogel, de sua ligação com o órgão e o selante de fibrina (E, F), da preservação da parede intestinal (G) e dos vilos (H).

5.4- Determinação do Grau de Intumescimento do Hidrogel (Q)

Grau de intumescimento (Q) do hidrogel ficou praticamente constante em torno de 34 vezes a massa seca, durante todos os dias gestacionais (17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5 dias) (Gráfico 14).

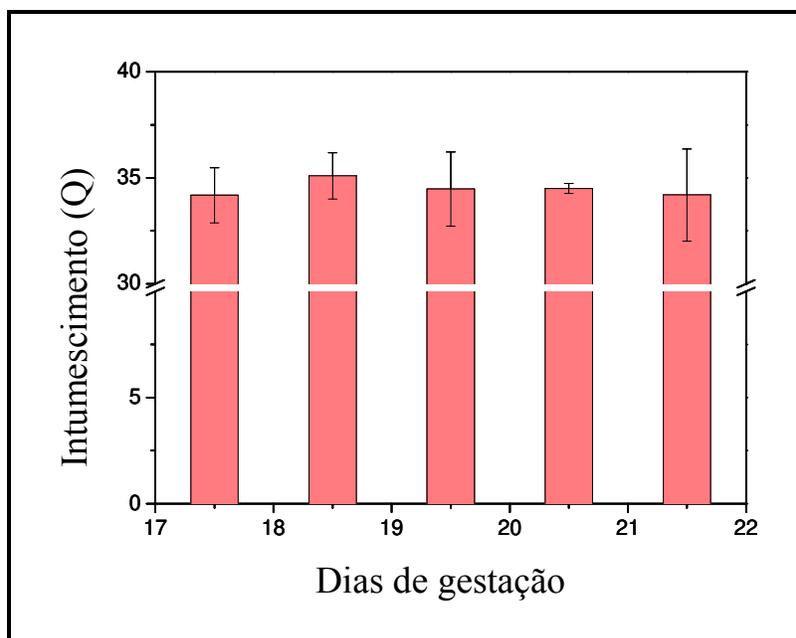


Gráfico 14- Grau de intumescimento dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) em LA de diferentes dias gestacionais.

5.5- Quantificação de proteínas do LA pelo método de Bradford (1976).

O resultado das concentrações de proteínas do LA encontra-se na tabela 5.

Tabela 5- Absorbância e concentração de proteínas das amostras de LA nas diferentes idades gestacionais de ratas.

LA (dias de gestação)	Absorbância (nm)	Concentração (mg/mL)
17,5	0,5661	0,9820
18,5	0,6661	1,1556
19,5	0,8971	1,5563
20,5	0,8705	1,5102
21,5	0,7158	1,2418

A concentração de proteínas aumenta conforme os dias gestacionais tendo menor valor aos 17,5 dias (0,9820 mg/mL) e alcança seu valor máximo aos 19,5 e 20,5 dias com ligeiro declínio próximo ao nascimento (21,5 dias).

5.6- Eletroforese de Isoeletrofocalização (IEF)

Quase a totalidade das proteínas migrou para o pólo positivo, representando que a maioria das proteínas do LA era de carga negativa (Figura 12).

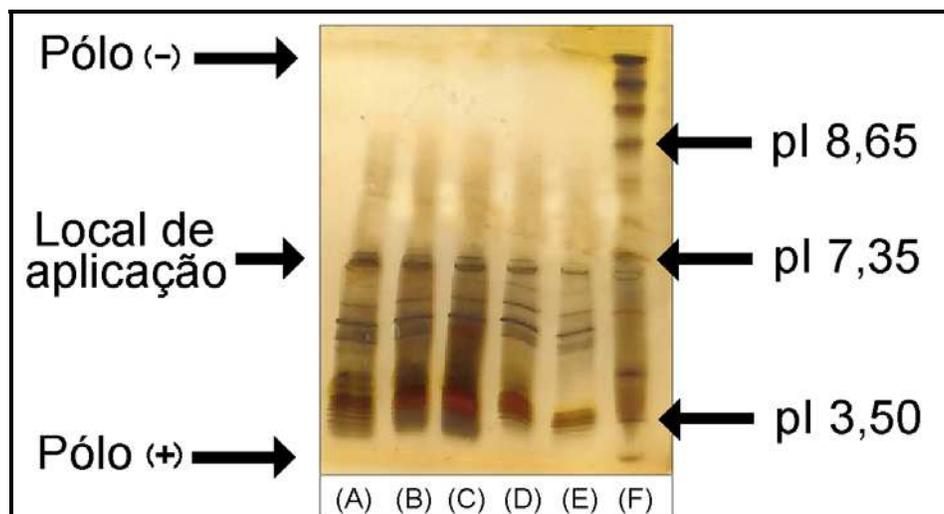


Figura 12- IEF do LA dos dias gestacionais 17,5, 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5 respectivamente nas colunas A,B,C, D, E e F (onde F representa o padrão de ponto isoelétrico, pI).

6- DISCUSSÃO

Gastrosquise é uma doença congênita rara e de etiologia não esclarecida na qual as alças intestinais expostas ao LA levam a alterações funcionais no período neonatal causando hipomotilidade e distúrbios da capacidade de absorção de nutrientes (Guo et al., 1995; Santos et al., 2003).

O dano intestinal é responsável pela elevada morbidade e eventualmente pela mortalidade destes neonatos. Os fatores que contribuem para a morbi-mortalidade da doença são conseqüências diretas ou indiretas do processo inflamatório iniciado intra-útero, decorrente da prolongada exposição das alças intestinais ao LA (Snyder, 1999; Driver et al., 2000; Santos et al., 2003).

Acredita-se que a inflamação intestinal é conseqüência do contato com componentes do LA e não uma lesão primariamente isquêmica pela compressão das alças na saída do óstio na parede abdominal (Albert et al., 1993, 2001; Guo et al., 1995; Correia-Pinto et al., 2001; Yu et al., 2003, 2004).

Na gastrosquise ocorre encurtamento, dilatação e espessamento intestinal principalmente no último trimestre da gestação. Neste período o LA sofre modificações na sua composição relacionada à função renal fetal, com isso os níveis de uréia, creatinina e mecônio no LA se elevam, enquanto que a osmolaridade e o sódio diminuem (Tibboel et al., 1986; Langer et al., 1989; Shaw et al., 1994).

Tais alterações na composição do LA desempenham papel importante na gênese do processo inflamatório intestinal da gastrosquise (Kluck et al., 1983; Tibboel et al., 1986). Estudos experimentais comprovam que a presença de mecônio no LA está relacionada ao dano intestinal, o mesmo não ocorrendo em relação à presença de urina (Correia-Pinto et al., 2001; 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. Vários autores já demonstraram que as alças intestinais apresentam-se inflamadas, com conseqüentes alterações funcionais, como perda da contratilidade, diminuição da atividade enzimática das vilosidades e alterações da

síntese de colágeno da região submucosa (O'Neil e Grosfeld, 1974; Stringel e Filler, 1979; Tibboel et al., 1986).

Sendo assim, uma forma de evitar tais alterações e diminuir as complicações pós-operatórias seria impedir que as alças intestinais entrassem em contato com o LA, desta forma, utilizando um biomaterial como os hidrogéis, pode-se proteger o intestino da ação lesiva do LA.

Os hidrogéis são redes poliméricas capazes de absorver grande quantidade de água sem se dissolver. Devido ao seu alto caráter hidrofílico os hidrogéis apresentam consistência macia semelhante aos tecidos biológicos e biocompatibilidade.

Outros tipos de hidrogéis já foram utilizados como biomaterial para acelerar a cicatrização em pele (Amadeu et al., 2007). Especificamente, hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) já foi utilizado experimentalmente em coelhos para formação óssea servindo como matriz de apoio para a diferenciação celular (Na et al., 2007).

Neste estudo, ao verificarmos a relação PI/PC dos quatro grupos, notamos que o peso intestinal dos fetos GAH foi estatisticamente igual ao dos fetos C, G e GA ($p > 0,05$).

O intestino inflamado dos fetos G é mais curto e mais pesado do que o controle, pois ocorrem dois efeitos: constrição do intestino pelo óstio da parede abdominal que ocasiona dilatação e espessamento da mucosa e ação tóxica direta do LA que ocasiona formação de uma camada fibrosa com edema e espessamento da camada serosa. Albert et al. (2001) acreditam, que ambos os efeitos são independentes.

Pudemos verificar na análise histológica que os diâmetros intestinais (D-I e D-III) dos fetos GAH ficaram iguais ao C, diferente dos grupos G e GA ($p < 0,001$). Ao medirmos o diâmetro interno, verificamos que a luz intestinal dos fetos G também aumenta, assim como dos fetos GA ($p < 0,001$), não havendo qualquer modificação nos fetos GAH e C.

Em todas as medidas da parede: espessura total, mucosa e submucosa, camada muscular longitudinal, circular e serosa os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos, com exceção da altura das vilosidades que não sofreu influência nos fetos que tiveram gastrosquise com ou sem proteção, ou seja, todas as camadas aumentaram sua

espessura nos fetos G e GA ($p < 0,05$), e mantiveram semelhantes nos fetos GAH e C ($p > 0,05$). Achados semelhantes para os fetos G foram encontrados nos modelos de coelhos e embriões de galinhas, reforçando o efeito nocivo do LA na evolução da gestação sobre as alças intestinais (Albert et al., 2003; Yu et al., 2004).

Esses resultados evidenciam que o biomaterial (fetos GAH) ofereceu uma proteção mecânica com fácil remoção do hidrogel da parede do intestino sem causar lesão à serosa conforme demonstramos na MEV, ao passo que o adesivo de fibrina (fetos GA) não proporcionou uma proteção adequada sendo absorvido pelo organismo. É importante ressaltar que o hidrogel não aderiu por si só as alças do intestino sendo necessário o uso de um adesivo cirúrgico. O adesivo de fibrina utilizado da marca Beriplast[®] P teve como função colar o hidrogel à parede intestinal mantendo um contato íntimo com o órgão.

Ainda encontramos na MEV que o intestino teve sua morfologia preservada quando o hidrogel foi retirado. O biomaterial não teve rompimento de sua estrutura e manteve sua rede tridimensional, mas mudou sua forma devido à capacidade que tem de intumescer. A ausência de células inflamatórias reforça a ação protetora do biomaterial que sobre as alças não provocou reação imunológica e a pequena quantidade de células vermelhas encontradas junto ao hidrogel pode ser imputada ao ato de confecção da gastrosquise.

A correção do defeito da parede abdominal assim como o estudo da proteção das alças intestinais contra o LA durante a gestação em modelos animais já foi realizado e mostrou-se capaz de diminuir os efeitos tóxicos sobre as alças intestinas (Langer et al, 1990, Roelofs et al., 2008).

Devido à presença de grupamentos ácidos na sua estrutura química, os hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) apresentam alto grau de intumescimento, pois seus grupamentos AAc, de alto pKa (= 4,25), causam repulsão de carga entre os grupos carboxilatos (da Silva R, 2007). Os resultados demonstram que o grau de intumescimento dos hidrogéis de P(NIPAAm-co-AAc) no LA (pH= 9,0) permaneceu constante, próximo de 34 vezes da sua massa seca, durante as diferentes idades gestacionais.

O valor do grau de intumescimento (Q) do hidrogel no LA é de fundamental importância para determinar o espaço ocupado pelo biomaterial junto com o feto dentro do útero. Com o valor de Q obtido pudemos calcular que a massa adquirida pelo hidrogel dentro do útero foi de aproximadamente 170 mg (massa do hidrogel seco utilizado = 5mg), ficando 34 vezes maior. Embora pareça um grande aumento de volume do biomaterial intumescido, na verdade esse aumento não é.

Tomando-se como base a média do peso corporal fetal ao nascimento (4400 mg), o hidrogel intumescido ficou aproximadamente 26 vezes menor, demonstrando que o aumento proporcional do biomaterial foi pequeno. Este Q foi ainda suficiente para conferir um recobrimento fixo, suave e macio às alças do intestino sem impedir os movimentos fetais e sem que houvesse desprendimento do hidrogel e possível risco de embolia pulmonar.

O LA é isotônico e, com o avançar da gestação, o feto passa a contribuir cada vez mais com a sua produção pela liberação de fluidos orgânicos, predominantemente urina, mecônio e descamação epitelial. O feto humano a termo pode deglutir até 500 mL de LA ao dia e conforme progride a gestação a sua osmolaridade vai diminuindo (de 260 mOsm/Kg para 80 mOsm/Kg) devido a hipotonicidade da urina fetal (Seeds, 1980; Mathias et al., 1985).

A composição química do LA em humanos é dinâmica com 98 – 99 % de água e 1 – 2 % de solutos que podem ser orgânicos (uréia e creatinina fetais) e inorgânicos (sódio, cloro e potássio), com baixas concentrações de proteínas provenientes principalmente da mãe e frações específicas fetais (α -feto proteína, IgA, IgG). A contribuição materna na composição do LA é maior no início da gestação e a do feto vai aumentando progressivamente quando passa a ser quase exclusivamente urina fetal (Gitlin et al., 1972).

A concentração de aminoácidos encontrada no LA está mais elevada no início da gestação e durante a evolução da gestação apresenta queda progressiva, exceção à serina e à taurina que parecem aumentar de concentração quando próximo ao termo. Outras

substâncias que também fazem parte do LA são: renina, angiotensina, fontes energéticas (glicose, pivorato e lactato), prostaglandinas, além de hormônios (Bloomfield et al., 2002).

Foi verificado no LA de ratas que a concentração de proteínas aumenta conforme os dias gestacionais tendo menor valor aos 17,5 dias (0,98 mg/mL) e alcança seu valor máximo aos 19,5 e 20,5 dias (1,56 e 1,51 mg/mL) com ligeiro declínio próximo ao nascimento (21,5 dias = 1,24 mg/mL).

A eletroforese com IEF demonstrou que o LA é composto basicamente de proteínas com carga líquida negativa. Este predomínio de cargas negativas do LA é de mesma carga que o hidrogel que repele as proteínas, além disso, os poros do hidrogel são de pequena dimensão ($38 \pm 6\mu\text{m}$) o que impede a difusão de proteínas de alto peso molecular (170.000 Da) como a maioria das encontradas no LA (Seeds, 1980).

Desta forma, o hidrogel pode absorver água e outros compostos, porém as proteínas ficam retidas fora dele, não entrando em contato com o intestino fetal. Por apresentar estas características físico-químicas, o hidrogel demonstrou ser uma boa opção de matriz para recobrir as alças, pois aderiu suavemente ao órgão sem causar dano e funcionou como uma barreira que impediu o contato direto dos componentes do LA com intestino exposto da gastrosquise.

Finalmente concluímos que o hidrogel P(NIPAAm-co-AAc) pode ser utilizado como matriz para a redução da espessura da alça intestinal apresentado-se como uma massa de aspecto gelatinoso e de fácil remoção à temperatura ambiente ao nascimento no modelo experimental de gastrosquise em fetos de ratos. A utilização deste biomaterial no mesmo modelo da doença em animais de grande porte poderá aumentar a validação e a aplicação do hidrogel na prática clínica.

7- CONCLUSÃO

7.1- Geral

No modelo experimental de gastrosquise em fetos de rato, o hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) mostrou-se uma boa opção de matriz para recobrir as alças intestinais, pois aderiu suavemente ao órgão sem causar dano e funcionou como barreira física que impediu o contato do intestino exposto ao LA.

7.2- Específico

- a) O grau de proteção das alças intestinas pelas medidas morfológicas e histométricas intestinais foi eficaz, com as medidas da relação PI/PC e espessura de todas as camadas da parede intestinal similares especialmente entre os fetos C e GAH e diferentes dos fetos G e GA.
- b) O intumescimento (Q) após a colocação do hidrogel de P(NIPAAm-co-AAc) foi 34 vezes maior, de 5 mg de peso seco no feto para 170 mg ao nascimento, aumento considerado pequeno, ou seja, 26 vezes menor que a média do peso corporal fetal de 4400 mg conferindo ao biomaterial a propriedade de absorver água. A isoeletrofocalização (IEF) revelou que a maioria das proteínas do LA em diferentes dias gestacionais é de carga negativa e coincide com a carga negativa do hidrogel conferindo a propriedade de repelir proteínas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou que não houve lesão da serosa e das demais camadas da parede intestinal.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aktug T, Erdag G, Kargi A, Akgur FM, Tibboel D. Amnio-allantoic fluid exchange for the prevention of intestinal damage in gastroschisis: An experimental study on chick embryos. *J Pediatr Surg* 1995; 30(3):384-87.

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

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

Albert A, Margarit J, Julia V, Sancho MA, Galan X, Lopez D, Morales L. Morphology and mucosal biochemistry of gastroschisis intestine in urine-free amniotic fluid. *J Pediatr Surg* 2003; 38 (8):1217-20.

Amadeu TP, Seabra AB, de Oliveira MG, Costa AMA. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. *JEADV.* 2007; 21:629-37.

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

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

Api A, Olguner M, Hakgüder G, Ates O, Özer E, Akgür FM. Intestinal damage in gastroschisis correlates with the concentration of amniotic meconium *J Pediatr Surg* 2001; 36(12): 1811-15.

Bealer JF, Graf J, Bruch SW, Adzick NS, Harrison MR. Gastroschisis increases small bowel nitric oxide synthase activity. *J Pediatr Surg* 1996; 31:1043-45; discussion 1045-46.

Berger J, Reist M, Chenite A, Felt-Baeyens O, Mayer JM, Gurny R. Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application. *Int Jour Pharm* 2005; 288(1):17-25.

Bittencourt DG, Barreto MWG, França WMG, Gonçalves A, Pereira, LAV, Sbragia L. Impact of corticosteroid on intestinal injury in a gastroschisis rat model: morphometric analysis. *J Pediatr Surg* 2006; 41:547–53.

Bloomfield FH, Breier BH, Harding JE. Fate of (125)I-IGF-I administered into the amniotic fluid of late gestation fetal sheep. *Pediatr Res.* 51(3):361-69, 2002.

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

Correia-Pinto J, Tavares ML, Baptista MJ, Estevao-Costa J, Flake AW, Leite-Moreira AF. A new fetal rat model of gastroschisis: development and early characterization. *J Pediatr Surg* 2001; 36(1):213-16.

da Silva R, de Oliveira MG. Effect of the cross-linking degree on the morphology of poly(NIPAAm-co-AAc) hydrogels. *Polymer* 2007; 48:4114-22.

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

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

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

Driver CP, Bruce J, Bianchi A, Doig CM, Dickson AP, Bowen J. The contemporary outcome of gastroschisis. *J Pediatr Surg* 2000; 35:1719-23.

Dunn JCY, Fonkalsrud EW, Atkinson JB. The influence of gestacional age and mode of delivery on infants with gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1999; 34(9): 1393-95.

Eberhard U, Broder M, Witzke G. Stability of Beriplast[®] P fibrin sealant: Storage and reconstitution. *Int Jour Pharm* 2006; 313:1-4.

Fasching G, Haeusler M, Mayr J, Schimpl G, Haas J, Puerstner P. Can levels of interleukins and matrix metalloproteinases in the amniotic fluid predict postnatal bowel function in the fetuses with gastroschisis ? J Pediatr Surg 2005; 40(12):1887-91.

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

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

Gitlin D, Kumate J, Morales C, Noriega L, Arévalo N. The turnover of amniotic fluid protein in the human conceptus. Am J Obstet Gynecol. 1972; 113(5):632-45.

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

Gutowska A, Bark JS, Kwon C, Bai YH, Cha Y, Kim SW. Squeezing hydrogels for controlled oral drug delivery. J Controlled Oral Drug Deliv 1997; 48:141-48.

Haller JA, Kehrer BH, Shaker IJ, Shermeta DW, Wyllie RG. Studies of the Pathophysiology of gastroschisis in fetal sheep. J Pediatr Surg 1974; 9(5): 627-32.

Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. Advanced Drug Deliv Reviews 2002; 43: 3-12.

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

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

Kanmaz T, Yagmurlu A, Aktug T, Gökçora H. The effect of amnio-allantoic fluid pH on the intestines: An experimental study in the chick embryo gastroschisis model. J Pediatr Surg 2001; 36(9): 1341-45.

Kluck P, Tibboel D, van der Kamp AWM. The effect of fetal urine on the development of the bowel in gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1983; 18(1): 47-50.

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

Langer JC, Bell JG, Castillo RO. Etiology of intestinal damage in gastroschisis, II. Timing and reversibility of histological changes, mucosal function, and contractility. *J Pediatr Surg*, 1990; 25:1122-26.

Langer JC, Longaker MT, Crombleholme TM. Etiology of intestinal damage in gastroschisis. I. Effects of amniotic fluid exposure and bowel constriction in a fetal lamb model. *J Pediatr Surg* 1989; 24:992-97.

Mathias L, Nobile L, Hofstetter MM. Análise da maturidade fetal através do líquido amniótico. *AMB Ver Assoc Med Bras* 1985; 31(5-6):76-80.

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

Mouritzen C, Drömer M, Keinecke HO. The effect of fibrin glueing to seal bronchial and alveolar leakages after pulmonary resections and decortications. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 7(2):75-80.

Na K, Kim SW, Sun BK, Woo DG, Yang HN, Chung HM, Park KH. Osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells in thermo-reversible hydrogel constructs containing hydroxyapatite and bone morphogenic protein-2 (BMP-2). *Biomaterials*. 2007; 28(16):2631-37.

Nichol PF, Hayman A, Pryde PG, Go LL, Lund DP. Meconium staining of amniotic fluid correlates with intestinal peel formation in gastroschisis. *Pediatr Surg Int* 2004; 20(3): 211-14.

O'Neil AJR, Grosfeld JL. Intestinal malfunction after antenatal exposure of viscera. *Am J Surg* 1974; 127:128-32.

Olguner M, Akgür FM, Api A, Özer E, Aktung T. The Effects of Intraamniotic Human Neonatal Urine and Meconium on the Intestines of the Chick Embryo With Gastroschisis J Pediatr Surg 2000; 35(3): 458-61.

Özbey H. Use of Sterile Adhesive Film and Polypropylene Mesh in the Construction of a Temporary Silo in the Treatment of Omphalocele. Surg Today 2005; 35(8):700-2.

Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. Eur Jour Pharm and Biopharm 2000; 50:27-46.

Potier M, Melancon SB, Dallaire I. Fetal intestinal disaccharidases in human amniotic fluid. Biomedicine 1976; 25: 167-9.

Ribeiro SR, Engler P JR, Miranda AC, Bromberg SH, Lopasso FP, Irya K. Original research weight loss and morphometric study of intestinal mucosa in rats after massive intestinal resection. Influence of a glutamine-enriched diet. Rev Hosp Clin Pac Med S Paulo 2004; 59(6):349-56.

Roelofs LA, Eggink AJ, Hulsbergen-van de Kaa CA, van den Berg PP, van Kuppevelt TH, van Moerkerk HT, Crevels AJ, Lotgering FK, Feitz WF, Wijnen RM. Fetal Abdominal Wall Repair with a Collagen Biomatrix in an Experimental Sheep Model for Gastroschisis. Tissue Eng Part A. 2008; 14(12) (no prelo).

Santos MM, Tannuri U, Maksoud JG. Alterations of Enteric Nerve Plexus in Experimental Gastroschisis: Is there a delay in the Maturation ? J Pediatr Surg 2003; 38(10): 1506-1511.

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

Schalatter M, Norris K, Uitvlugt N, Decou J, Connors R. Improved outcomes in the treatment of gastroschisis using a preformed silo and delayed repair approach. J Pediatr Surg 2003; 38(3): 459-64.

Schild, HG. Poly(n-isopropylacrylamide) - experiment, theory and application. Prog Polymer Sci 1992; 17:163-249.

Seeds AE. Current concepts of amniotic fluid dynamics. *Am J Obstet Gynecol.* 1980; 138(5):575-86.

Sencan A, Gümüstekin M, Gelal A, Arslan O, Özer E, Manisa EM. Effects of amnio-allantoic fluid exchange on bowel contractility in chick embryos with gastroschisis. *J Pediatr Surg* 2002; 37(11): 1589-93.

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

Sherman NJ, Aschi MJ, Isaacs HJR, Rosenkrantz JG. Experimental gastroschisis in the fetal rabbit. *J Pediatr Surg* 1973; 8(2):165-9.

Shishido SM, Seabra AB, Loh W, Oliveira MG. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release. *Biomaterials* 2003; 24:3543-3553.

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

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

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

Stringel G, Filler RM. Prognostic factors in omphalocele and gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1979; 14:515-9.

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

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

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

Vannucchi MG, Midrio P, Flake AW, Fausone-Pellegrini MS. Neuronal differentiation and myenteric plexus organization are delayed in gastroschisis: an immunohistochemical study in a rat model. *Neurosci Lett* 2003; 339:77-81.

Vannucchi MG, Midrio P, Zardo C, Fausone-Pellegrini MS. Neurofilament formation and synaptic activity are delayed in the myenteric neurons of the rat fetus with gastroschisis. *Neurosci Lett* 2004; 364(2):81-5.

Vergunta RK, Wallace LJ, Leonardi MR, Gross TL, Renfro Y. Perinatal management of gastroschisis: analysis of a newly established clinical pathway. *J Pediatr Surg* 2005; 40:528-34.

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

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

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

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

Zhang XZ, Yang YY, Wang FJ, Chung TS. Thermosensitive Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) Hydrogels with Expanded Network Structures and Improved Oscillating Swelling-Deswelling Properties. *Langmuir* 2002; 18:2013-8.

9- ANEXOS



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

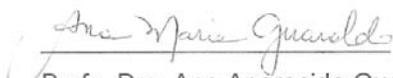
CERTIFICADO

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

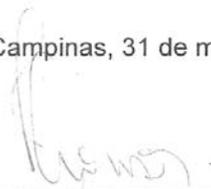
CERTIFICATE

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

Campinas, 31 de março de 2008.



Prof. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas SP – Brasil

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

10- APÊNDICES

Tabela 6- Resultado das aferições do Peso Corporal (PC) (g), Peso Intestinal (PI) (g) e Relação Peso Intestinal/Peso Corporal para os 4 grupos estudados.

Feto	Grupo	PC	PI	PI/PC
1	C	4,3077	0,1467	0,0341
2	C	4,0180	0,1977	0,0492
3	C	5,2987	0,1767	0,0333
4	C	4,1803	0,1785	0,0427
5	C	5,4239	0,1928	0,0355
6	C	4,3158	0,1962	0,0455
7	C	3,5131	0,1609	0,0458
8	C	3,3705	0,1601	0,0475
9	C	4,9487	0,1685	0,0340
10	C	3,6195	0,1484	0,0410
11	C	3,3908	0,1475	0,0435
12	C	5,4706	0,2074	0,0379
13	G	5,0834	0,2564	0,0504
14	G	5,2185	0,2334	0,0447
15	G	4,8079	0,2165	0,0450
16	G	4,6123	0,1861	0,0403
17	G	4,9888	0,2325	0,0466
18	G	3,6330	0,2146	0,0590
19	G	4,9371	0,2136	0,0433
20	G	5,1293	0,3935	0,0767
21	G	4,1963	0,2515	0,0599
22	G	3,6327	0,2143	0,0590
23	G	3,6722	0,1632	0,0444
24	G	5,5697	0,3100	0,0557
25	GA	5,2649	0,2665	0,0506
26	GA	5,0169	0,2027	0,0404
27	GA	3,0309	0,1952	0,0644
28	GA	4,4069	0,4011	0,0910
29	GA	4,4479	0,1793	0,0403
30	GA	3,5344	0,2052	0,0581
31	GA	4,2452	0,1870	0,0440
32	GA	4,2568	0,2563	0,0602
33	GA	5,1123	0,2051	0,0401
34	GA	4,8472	0,1810	0,0373
35	GA	4,4285	0,2635	0,0595
36	GA	4,3074	0,2252	0,0523
37	GAH	3,7848	0,1384	0,0366
38	GAH	4,3272	0,2375	0,0549
39	GAH	4,9836	0,2433	0,0489

40	GAH	4,3226	0,2563	0,0593
41	GAH	4,1998	0,2012	0,0479
42	GAH	4,2357	0,1756	0,0415
43	GAH	3,8790	0,1874	0,0483
44	GAH	3,8784	0,1263	0,0326
45	GAH	4,5212	0,1754	0,0388
46	GAH	4,5222	0,2035	0,0450
47	GAH	4,7662	0,2202	0,0462
48	GAH	3,9148	0,1562	0,0399
	C	G	GA	GAH
MÉDIA	4,32	4,62	4,41	4,28
SD	0,79	0,68	0,64	0,38
MÍNIMO	3,37	3,63	3,03	3,78
MÁXIMO	5,47	5,57	5,26	4,98

Tabela 7- Resultado das aferições do Diâmetro externo I (DI-I) (μm), Diâmetro interno I (DI-II) (μm), Diâmetro externo II (DI-III) (μm), Diâmetro interno II (DI-IV) (μm) para os 4 grupos estudados.

FETO	GRUPO	DI-I	DI-II	DI-III	DI-IV
1	C	1015,135	890,1833	895,8964	737,6035
2	C	1036,226	913,4048	903,9721	747,6342
3	C	972,4551	848,8755	911,3295	743,8485
4	C	1021,193	915,8964	899,3069	757,2477
5	C	997,423	846,6286	877,0182	789,7874
6	C	994,8849	895,466	863,8888	762,2767
7	C	988,5168	843,4488	862,4176	741,8797
8	C	998,1843	874,1695	821,6183	719,9931
9	C	1176,576	1079,609	917,5043	840,7965
10	C	1180,386	1097,224	943,5904	863,8888
11	C	1182,65	1092,595	939,0616	865,174
12	C	1205,891	1127,204	845,6639	739,5684
13	C	1140,573	945,0312	998,4682	891,7994
14	C	1112,473	980,5478	970,3308	869,1487
15	C	1119,2	980,8252	976,4808	878,8392
16	C	1122,861	1000,975	1008,816	883,8434
17	C	1193,881	1089,894	922,6797	831,1673
18	C	1182,372	1090,819	916,1811	840,4998
19	C	1182,113	1049,922	932,0205	832,1352
20	C	1212,417	1107,028	897,8937	797,004
21	G	2243,681	1744,528	1856,343	1674,729
22	G	2289,917	1924,187	1821,24	1590,861
23	G	2263,754	1912,514	1882,085	1629,775
24	G	2219,783	1962,373	1895,316	1678,745
25	G	2273,424	1907,052	1928,336	1713,227
26	G	2287,901	2036,626	1934,834	1700,667
27	G	2291,387	1858,729	1965,288	1712,201
28	G	2276,674	1893,377	1937,487	1717,801
29	G	1729,332	1671,401	1601,431	1542,864
30	G	1650,431	1404,399	1489,076	1403,672
31	G	1753,067	1666,51	1500,355	1403,914
32	G	1667,544	1560,314	1485,722	1436,202
33	G	1473,7	1231,162	1024,418	813,7146
34	G	1483,736	1047,987	1036,303	846,5483
35	G	1467,2	1225,809	1054,576	809,8739
36	G	1454,698	1210,704	1011,241	790,9064
37	G	1630,693	1340,364	1352,959	1151,653
38	G	1619,783	1334,846	1418,736	1164,566
39	G	1623,837	1327,077	1395,246	1172,203

40	G	1637,105	1405,537	1363,219	1192,161
41	GA	1259,774	1214,286	1178,571	1216,667
42	GA	1725,742	1617,618	1577,83	1490,324
43	GA	1717,622	1621,986	1554,928	1467,3
44	GA	1698,672	1618,627	1590,084	1508,63
45	GA	1560,816	1370,701	1179,425	1040,724
46	GA	1552,68	1388,689	1158,631	1024,197
47	GA	1543,988	1377,977	1175,535	1017,979
48	GA	1537,041	1332,015	1150,471	1002,548
49	GA	1416,088	1287,107	1297,486	1099,866
50	GA	1742,005	1278,755	1389,865	1157,691
51	GA	1422,336	1308,077	1425,656	1164,838
52	GA	1397,146	1240,958	1345,531	1149,396
53	GA	1259,233	1065,05	1173,411	1062,684
54	GA	1249,562	1178,126	1199,414	1089,478
55	GA	1227,288	1040,844	1209,674	1104,854
56	GA	1221,138	1059,243	1125,362	984,1027
57	GA	1297,765	1239,313	1217,456	1078,684
58	GA	1486,889	1103,982	1232,313	1081,12
59	GA	1276,137	1104,536	1260,745	1117,953
60	GA	1276,199	1114,449	1185,753	1047,619
61	GAH	1207,143	1074,335	1125,624	826,5026
62	GAH	1300,358	1057,486	1100,505	877,3931
63	GAH	1298,499	1070,91	1038,106	805,7194
64	GAH	1250,506	1037,145	1088,02	835,3038
65	GAH	1242,2	1085,349	1092,232	921,893
66	GAH	1245,108	1089,738	1095,331	936,8374
67	GAH	1244,972	1068,578	1099,959	888,7557
68	GAH	1252,2	1096,738	1105,101	940,9071
69	GAH	1331,376	1133,103	1201,699	1120,384
70	GAH	1386,238	1200,236	1188,017	1099,268
71	GAH	1393,71	1183,226	1167,638	1089,186
72	GAH	1368,59	1130,99	1192,997	1118,845
73	GAH	1175,911	1011,779	883,4585	718,1641
74	GAH	1178,684	1017,054	861,3258	707,7959
75	GAH	1195,504	1023,056	802,7447	639,7633
76	GAH	1209,983	1072,655	891,6341	749,5728
77	GAH	1484,768	1118,49	1208,821	1001,88
78	GAH	1279,491	1218,983	1120,351	1034,035
79	GAH	1185,198	1013,852	882,256	718,042
80	GAH	1170,293	1010,246	875,682	701,24

Tabela 8- Resultado das aferições da medida da altura dos vilos (μm) para os 4 grupos estudados.

Nº DE CORTES	GRUPO	VILO
1	C	254,9058
2	C	61,35736
3	C	273,8828
4	C	231,7296
5	C	250,3966
6	C	272,6697
7	C	234,0823
8	C	318,9294
9	C	217,5069
10	C	116,1111
11	C	76,54363
12	C	180,575
13	C	322,9211
14	C	123,3012
15	C	132,5428
16	C	232,6044
17	C	159,82
18	C	326,4965
19	C	87,90399
20	C	253,6019
21	C	225,7242
22	C	81,46303
23	C	182,9244
24	C	156,6017
25	C	323,7375
26	C	237,8114
27	C	84,14226
28	C	178,2039
29	C	307,5945
30	C	217,5357
31	C	123,6254
32	C	121,8759
33	C	141,4346
34	C	65,83582
35	C	74,06274
36	C	289,4689
37	C	230,7902
38	C	247,9936
39	C	151,2346
40	C	232,0875
41	C	122,1596

42	C	214,8915
43	C	68,88775
44	C	300,5246
45	C	94,15255
46	C	237,8991
47	C	115,8414
48	C	211,8446
49	C	291,4272
50	C	108,1334
51	C	83,12509
52	C	124,767
53	C	198,4006
54	C	135,2092
55	C	174,5822
56	C	139,6783
57	C	208,8291
58	C	168,5742
59	C	140,8792
60	C	111,5988
61	C	211,8092
62	C	222,7749
63	C	93,74419
64	C	333,6872
65	C	153,4681
66	C	76,15037
67	C	198,022
68	C	103,1317
69	C	114,5491
70	C	157,6209
71	C	86,75799
72	C	145,478
73	C	162,3106
74	C	101,7353
75	C	102,3646
76	C	137,8269
77	C	160,4034
78	C	127,8669
79	C	122,4051
80	C	117,2263
81	C	72,19812
82	C	61,2349
83	C	62,42863
84	C	116,7879
85	C	164,67
86	C	98,54977
87	C	127,8049
88	C	102,9698

89	C	68,38957
90	C	151,6779
91	C	142,0113
92	C	103,3538
93	C	151,7741
94	C	145,6671
95	C	96,58371
96	C	181,4872
97	C	188,7607
98	C	71,64149
99	C	71,40244
100	C	194,2288
101	C	106,0344
102	C	110,5174
103	C	156,8146
104	C	78,84088
105	C	91,44285
106	C	60,05912
107	C	50,26151
108	C	205,3252
109	C	127,9615
110	C	86,93085
111	C	377,4176
112	C	142,6208
113	C	182,6689
114	C	88,5986
115	C	84,66103
116	C	90,48473
117	C	145,5038
118	C	81,56023
119	C	160,4813
120	C	202,1052
121	C	222,2558
122	C	74,33251
123	C	167,4723
124	C	97,41343
125	C	60,30164
126	C	138,4518
127	C	312,8904
128	C	188,732
129	C	97,17341
130	C	69,96292
131	C	300,483
132	C	281,0205
133	C	249,1829
134	C	115,1265
135	C	182,5982

136	C	194,5227
137	C	71,8159
138	C	383,4583
139	C	225,6004
140	G	204,945
141	G	249,1829
142	G	326,6612
143	G	442,0129
144	G	169,7992
145	G	311,1637
146	G	314,1406
147	G	171,9831
148	G	185,9092
149	G	287,2897
150	G	152,2158
151	G	232,4609
152	G	76,2434
153	G	66,48502
154	G	328,526
155	G	92,45871
156	G	234,3405
157	G	313,258
158	G	222,2858
159	G	146,5889
160	G	106,9468
161	G	283,5245
162	G	158,9408
163	G	132,97
164	G	311,0524
165	G	171,0471
166	G	58,95895
167	G	76,06818
168	G	178,2039
169	G	71,12742
170	G	276,8871
171	G	263,6851
172	G	106,9273
173	G	154,5107
174	G	326,4505
175	G	191,6525
176	G	72,5151
177	G	78,58658
178	G	181,4872
179	G	298,8925
180	G	123,0303
181	G	273,4028
182	G	98,69776

183	G	153,5904
184	G	233,5347
185	G	181,8728
186	G	257,5569
187	G	240,377
188	G	98,48205
189	G	103,7766
190	G	207,0664
191	G	129,5163
192	G	243,7518
193	G	100,9081
194	G	106,6775
195	G	200,123
196	G	109,4558
197	G	165,4582
198	G	129,8635
199	G	145,6728
200	G	57,50525
201	G	193,5427
202	G	373,0904
203	G	198,3271
204	G	75,77708
205	G	381,1054
206	G	199,3505
207	G	72,84214
208	G	70,31963
209	G	184,3415
210	G	227,1844
211	G	95,62477
212	G	158,8857
213	G	250,1183
214	G	105,9125
215	G	248,7189
216	G	175,2782
217	G	148,0495
218	G	116,8165
219	G	112,6661
220	G	50,15354
221	G	61,89868
222	G	136,0761
223	G	203,784
224	G	65,12254
225	G	148,9369
226	G	98,78223
227	G	260,3381
228	G	76,21058
229	G	208,0789

230	G	137,6695
231	G	122,6943
232	G	95,25775
233	G	111,9532
234	G	99,2455
235	G	129,0292
236	G	49,88676
237	G	207,5793
238	G	147,8916
239	G	97,03599
240	G	258,3168
241	G	74,26516
242	G	93,78422
243	G	113,7197
244	G	115,1844
245	G	51,43426
246	G	63,59339
247	G	143,3906
248	G	66,40971
249	G	378,3303
250	G	144,3182
251	G	171,2225
252	G	70,24844
253	G	203,2184
254	G	269,0532
255	G	227,5806
256	G	117,2512
257	G	232,118
258	G	149,3311
259	G	263,9333
260	G	68,54792
261	G	230,1696
262	G	350,9155
263	G	209,7457
264	G	273,5491
265	G	63,80942
266	G	229,2674
267	G	94,75298
268	G	99,05624
269	G	124,2714
270	G	160,7773
271	G	246,9539
272	G	239,9395
273	G	100,7385
274	G	376,9433
275	GA	84,19675

276	GA	89,50238
277	GA	131,5607
278	GA	47,84726
279	GA	95,99907
280	GA	83,82447
281	GA	234,3405
282	GA	205,447
283	GA	336,1339
284	GA	195,9452
285	GA	82,80341
286	GA	336,9913
287	GA	350,1161
288	GA	140,9148
289	GA	278,3591
290	GA	328,1374
291	GA	172,2448
292	GA	290,0604
293	GA	256,7039
294	GA	49,05223
295	GA	176,2581
296	GA	123,9488
297	GA	183,5253
298	GA	144,6559
299	GA	158,694
300	GA	207,6135
301	GA	41,8998
302	GA	250,3499
303	GA	67,512
304	GA	140,167
305	GA	54,62684
306	GA	103,4506
307	GA	235,427
308	GA	258,3168
309	GA	139,3704
310	GA	212,3852
311	GA	167,9199
312	GA	187,3104
313	GA	121,1139
314	GA	139,7529
315	GA	212,4736
316	GA	110,3928
317	GA	103,8529
318	GA	138,6264
319	GA	142,574
320	GA	162,475
321	GA	165,163

322	GA	163,3887
323	GA	123,9219
324	GA	204,7068
325	GA	139,1009
326	GA	194,0075
327	GA	126,1729
328	GA	118,1758
329	GA	177,8385
330	GA	148,3196
331	GA	217,8977
332	GA	98,84131
333	GA	166,6861
334	GA	95,75115
335	GA	102,5315
336	GA	127,5927
337	GA	193,4371
338	GA	262,825
339	GA	157,7479
340	GA	295,896
341	GA	94,06836
342	GA	238,4524
343	GA	250,4299
344	GA	261,876
345	GA	68,49315
346	GA	185,1743
347	GA	300,7271
348	GA	297,8751
349	GA	155,9827
350	GA	235,7598
351	GA	106,1877
352	GA	295,9256
353	GA	66,42227
354	GA	128,2479
355	GA	164,67
356	GA	293,7021
357	GA	138,9209
358	GA	228,2027
359	GA	74,91925
360	GA	194,3833
361	GA	236,0214
362	GA	293,1948
363	GA	106,0069
364	GA	231,4091
365	GA	180,5011
366	GA	216,1434
367	GA	160,1536
368	GA	112,2248

369	GA	168,2994
370	GA	255,9197
371	GA	205,7066
372	GAH	166,626
373	GAH	54,48926
374	GAH	117,0269
375	GAH	86,63774
376	GAH	202,9659
377	GAH	162,3748
378	GAH	173,4318
379	GAH	55,55034
380	GAH	106,3917
381	GAH	79,47305
382	GAH	82,75807
383	GAH	110,5589
384	GAH	166,5709
385	GAH	177,4794
386	GAH	265,3703
387	GAH	75,58423
388	GAH	236,9102
389	GAH	113,7307
390	GAH	134,8942
391	GAH	207,4688
392	GAH	144,7078
393	GAH	165,6698
394	GAH	173,9001
395	GAH	225,7242
396	GAH	245,6265
397	GAH	272,4723
398	GAH	192,367
399	GAH	236,7006
400	GAH	208,0789
401	GAH	258,6942
402	GAH	148,4573
403	GAH	252,5903
404	GAH	50,51805
405	GAH	106,8532
406	GAH	172,0389
407	GAH	102,6941
408	GAH	93,15068
409	GAH	37,17467
410	GAH	44,33694
411	GAH	103,5996
412	GAH	183,109
413	GAH	91,54312
414	GAH	149,1271
415	GAH	65,22492

416	GAH	87,86129
417	GAH	101,4069
418	GAH	94,49297
419	GAH	51,47478
420	GAH	47,94303
421	GAH	230,4502
422	GAH	147,202
423	GAH	117,0411
424	GAH	145,2629
425	GAH	242,3243
426	GAH	114,5964
427	GAH	142,8925
428	GAH	242,3535
429	GAH	114,52
430	GAH	178,662
431	GAH	156,764
432	GAH	182,4954
433	GAH	208,5814
434	GAH	210,2679
435	GAH	187,0274
436	GAH	204,0968
437	GAH	114,2465
438	GAH	193,9882
439	GAH	100,7468
440	GAH	56,02872
441	GAH	314,9679
442	GAH	290,8242
443	GAH	197,8091
444	GAH	203,4399
445	GAH	119,4359
446	GAH	105,122
447	GAH	183,6729
448	GAH	179,4236
449	GAH	270,2363
450	GAH	313,2473
451	GAH	157,4515
452	GAH	281,2978
453	GAH	276,0545
454	GAH	198,9317
455	GAH	185,118
456	GAH	364,538
457	GAH	204,248
458	GAH	98,83709
459	GAH	67,38216
460	GAH	181,4596
461	GAH	166,646
462	GAH	36,81396

463	GAH	195,5362
464	GAH	342,4767
465	GAH	267,1042
466	GAH	49,50075
467	GAH	67,00981
468	GAH	358,7216
469	GAH	257,6476
470	GAH	139,4003
471	GAH	66,15806
472	GAH	308,0605
473	GAH	168,0589
474	GAH	123,7199

Tabela 9- Resultado das aferições das camadas serosa, muscular longitudinal, muscular circular, submucosa e mucosa e parede total intestinal em µm para os 4 grupos estudados.

Nº DE CORTES	GRUPO	SEROSA	MUSCULAR LONGITUDINAL	MUSCULAR CIRCULAR	SUBMUCOSA E MUCOSA	PAREDE
1	C	4,271408	9,995104	29,9816	68,59113	107,7229
2	C	4,03019	6,415788	11,40886	94,34434	126,7982
3	C	2,668327	11,0018	21,12133	52,54725	105,8476
4	C	4,449991	7,620516	16,90891	63,60933	89,18962
5	C	3,164247	7,736424	12,6921	65,93827	90,99006
6	C	3,773585	4,474921	13,73606	68,3946	89,75288
7	C	4,645688	9,492741	20,11227	91,13911	124,8156
8	C	3,434014	10,77704	21,92762	46,70764	79,67371
9	C	4,245283	9,073294	20,08459	46,1638	77,24912
10	C	2,983281	10,89	15,63023	47,30405	82,12561
11	C	3,592346	11,13248	12,74458	92,61874	114,1363
12	C	4,348842	9,551159	11,21214	29,62324	44,76164
13	C	3,020342	11,35999	11,35999	40,16365	58,73731
14	C	3,164247	6,964539	15,70124	39,90521	60,38473
15	C	3,164247	10,38807	17,09214	47,26876	78,02577
16	C	2,869228	9,916885	32,71423	53,17023	98,80584
17	C	1,49164	9,303341	10,76671	43,31668	67,77368
18	C	3,335409	11,32075	16,06546	18,07903	47,59478
19	C	2,668327	6,20422	9,073294	29,702	39,70398
20	C	4,057701	8,974669	13,10608	35,20082	64,95918
21	C	3,020342	9,551159	16,45544	26,38981	59,1036
22	C	4,348842	10,76671	12,45319	43,48842	67,42479
23	C	3,68408	11,40886	12,77074	31,60729	62,75181
24	C	2,830189	12,70086	15,82124	39,27294	68,5668
25	C	3,68408	12,65699	16,26504	38,39344	69,08244
26	C	4,449991	10,09478	12,00747	31,46619	61,14816
27	C	3,802952	12,30038	11,21214	33,41075	66,06805
28	C	2,358491	8,503659	11,79245	37,98561	57,22342
29	C	3,802952	8,358512	16,45544	28,02141	53,13465
30	C	3,773585	13,68738	20,36513	30,01868	61,57603
31	C	2,358491	13,21597	16,02386	33,03571	65,04134
32	C	3,164247	12,45319	14,65304	33,54367	61,40959
33	C	2,983281	7,561896	9,950483	27,67385	48,56429
34	C	4,348842	7,075472	14,15094	37,80948	61,14816
35	C	1,944861	7,561896	11,33058	29,95562	55,70233
36	C	1,944861	7,215594	10,08375	28,12049	42,74532
37	C	3,773585	5,102195	14,9164	26,58721	49,15176
38	C	3,802952	8,018868	13,71174	28,64571	44,00971
39	C	2,358491	6,415788	11,65008	40,46994	68,58465

40	C	2,830189	8,962264	11,47691	26,83295	44,04761
41	C	1,415094	6,132075	13,87306	35,51232	55,07568
42	C	1,415094	10,89	18,60668	23,79622	74,89312
43	C	3,335409	11,83013	17,5101	29,1233	65,18486
44	C	2,001246	6,415788	10,30204	28,96242	49,11327
45	C	1,944861	8,774092	8,862403	42,88045	59,91309
46	C	2,405198	5,660377	12,26415	31,77579	53,36655
47	C	2,540172	8,345192	16,02386	39,49891	77,79445
48	C	2,405198	5,966562	13,34997	23,41923	47,49417
49	C	3,592346	15,05005	34,05713	45,30267	95,25616
50	C	3,802952	11,33058	31,60377	43,87046	88,69054
51	C	4,002491	8,697683	20,01246	32,02688	55,38387
52	C	3,301887	8,503659	14,64545	24,96437	48,52992
53	C	3,802952	10,75637	30,28067	49,14044	85,59729
54	C	3,802952	10,38807	18,77927	38,21919	64,89064
55	C	2,869228	6,753689	12,83158	49,68081	81,79985
56	C	3,802952	11,0018	13,4909	93,51527	118,5127
57	C	3,164247	8,437992	12,88349	30,58772	52,58746
58	C	3,592346	8,032729	16,79669	45,03914	72,41603
59	C	3,68408	9,849346	13,13999	37,59407	61,00973
60	C	2,109498	8,398346	20,34873	34,36929	65,37402
61	C	4,245283	11,35999	16,50943	62,90762	91,58721
62	C	4,245283	9,267398	15,67997	70,42849	92,67398
63	C	2,983281	9,339146	14,69095	65,03621	90,03876
64	C	3,802952	5,378186	14,32286	28,95858	47,9418
65	C	3,434014	5,378186	9,724306	23,83826	40,29638
66	C	2,869228	4,856429	13,3166	28,50946	45,90037
67	C	3,401463	4,740507	12,48887	29,52167	51,94037
68	C	5,210076	9,433962	19,74945	24,75404	49,1676
69	C	1,944861	8,115401	12,88349	31,06769	55,52831
70	C	3,434014	9,01178	13,29151	25,0711	46,14934
71	C	3,335409	5,679997	17,15062	44,34966	62,35878
72	C	1,886792	6,670819	13,42476	25,10657	42,63065
73	C	2,358491	7,36816	12,87485	27,2648	48,92035
74	C	3,401463	7,383243	13,01237	28,25861	47,65085
75	C	3,301887	6,132075	14,46968	18,20779	41,79256
76	C	2,830189	6,132075	11,0119	24,69555	48,11321
77	C	2,540172	7,322724	9,849346	24,5283	41,57638
78	C	2,668327	10,12779	14,02459	26,58302	45,1674
79	C	1,415094	5,521085	12,05371	25,94768	43,48074
80	C	3,401463	8,659226	14,9908	27,50449	45,63542
81	G	2,001246	4,218996	25,14642	23,86625	57,29336
82	G	1,700732	5,01422	24,90638	27,36256	61,14088
83	G	3,301887	5,521085	22,82259	34,66901	60,96595
84	G	2,869228	9,110004	34,39517	28,49385	69,26417
85	G	2,109498	8,345192	20,67416	33,46066	73,54407
86	G	2,001246	6,346049	22,10448	33,1433	67,34058

87	G	3,301887	8,004982	23,70254	19,70434	56,70588
88	G	3,335409	6,150191	25,54148	28,71553	63,28494
89	G	2,830189	4,810396	24,91084	20,15095	58,8584
90	G	2,405198	6,603774	27,50449	29,83281	65,48454
91	G	3,592346	7,322724	28,14421	32,98179	68,22686
92	G	2,109498	4,645688	23,13245	23,96394	52,86387
93	G	2,869228	5,378186	14,80411	31,66005	55,05952
94	G	3,773585	7,075472	24,56909	37,29101	71,24047
95	G	3,020342	8,237853	20,47952	25,53277	56,63914
96	G	4,271408	8,812048	23,41923	30,28067	74,77419
97	G	6,20422	12,81422	54,23708	44,87334	114,3418
98	G	4,245283	9,433962	31,13208	30,71838	69,37972
99	G	4,856429	11,90512	43,45003	86,75399	139,5015
100	G	3,68408	11,6787	26,16118	26,89093	64,24972
101	G	7,075472	14,62264	52,57054	54,49287	126,0246
102	G	5,102195	9,398518	48,09008	80,80369	146,7049
103	G	5,273745	9,492741	59,58352	48,62153	123,3795
104	G	9,05801	9,25141	60,5164	49,63659	91,46683
105	G	7,807993	13,75225	50,77716	51,40427	131,2686
106	G	4,057701	10,4734	52,17118	73,77365	154,6199
107	G	5,080344	9,995104	48,03916	87,12636	157,8181
108	G	7,36816	12,74458	49,80605	102,9664	169,1819
109	G	3,335409	11,90512	55,40395	77,10641	160,4363
110	G	4,716981	10,84906	19,36262	40,95904	86,54214
111	G	4,740507	14,69095	39,72359	55,1907	116,9821
112	G	5,080344	10,54749	35,86147	80,73758	143,9723
113	G	4,245283	7,678689	18,14659	34,59834	62,44435
114	G	4,057701	9,950483	16,00996	21,35704	53,78186
115	G	2,540172	7,807993	11,40886	19,83938	35,46216
116	G	3,802952	9,90566	19,90097	30,66401	63,69497
117	G	3,301887	7,075472	19,81694	42,66457	75,2133
118	G	3,335409	7,54717	14,15094	53,35404	84,51825
119	G	3,773585	4,716981	14,27618	34,55008	61,93811
120	G	3,773585	8,018868	23,34787	22,09441	53,70941
121	G	2,869228	8,607683	19,4829	49,41136	78,48495
122	G	3,802952	10,44148	17,45283	39,69558	67,72113
123	G	4,716981	11,0119	11,35999	30,86651	51,70853
124	G	4,218996	8,115401	9,061025	28,65348	46,57407
125	G	3,335409	8,962264	15,16053	44,96993	72,3238
126	G	4,271408	9,433962	18,89149	45,7936	77,88163
127	G	3,773585	12,30038	13,21597	43,55999	68,99865
128	G	2,830189	9,90566	18,4204	33,96554	59,91309
129	G	6,802927	14,46968	28,55625	58,09743	108,059
130	G	6,132075	18,99134	29,32506	50,0467	114,0934
131	G	8,490566	13,21597	47,65085	58,72026	127,8337
132	G	7,54717	16,03774	21,71861	52,90594	89,30181
133	G	5,966562	11,82072	24,18114	53,40406	92,1503

134	G	9,433962	11,0119	26,15267	48,27479	110,9564
135	G	6,70409	8,032729	26,01619	31,60729	71,62981
136	G	6,150191	15,70124	20,95211	40,71386	76,4049
137	G	6,603774	15,67997	21,64164	35,71225	76,78689
138	G	8,325698	17,17007	28,93936	37,59703	84,1806
139	G	9,916885	13,3166	32,24152	40,08046	82,69663
140	G	8,142772	11,47691	20,26107	52,36062	88,43805
141	G	6,70409	11,05224	23,38595	29,11184	69,37651
142	G	4,856429	11,21214	20,93617	37,98561	68,77255
143	G	7,907101	13,41647	25,0711	41,75794	80,09428
144	G	6,753689	12,53333	26,45297	37,59407	83,31049
145	G	4,245283	8,142772	36,39725	62,56538	116,348
146	G	6,293238	13,96896	22,54796	42,10814	88,09523
147	G	6,346049	13,3583	31,06411	50,84941	110,624
148	G	7,091178	9,433962	34,90885	69,80176	129,8713
149	G	5,273745	15,10171	40,1941	54,81652	112,5294
150	G	7,012297	10,02844	33,70249	107,9323	171,3245
151	G	5,188679	10,42015	27,45996	105,2267	161,4758
152	G	7,54717	14,34614	38,60439	35,35219	95,14047
153	G	7,200159	13,73606	32,14822	31,23553	81,25265
154	G	6,753689	10,75637	33,26392	47,3769	99,76053
155	G	8,398346	7,807993	39,56082	82,08089	141,7058
156	G	7,184692	12,26415	30,66038	65,28206	113,0994
157	G	6,040683	9,073294	15,76488	70,12297	112,381
158	G	7,012297	10,75637	22,24996	48,20792	97,64265
159	G	5,521085	14,9164	34,47271	34,87058	77,73865
160	G	7,200159	10,02844	22,69059	98,7484	155,1055
161	GA	4,810396	14,64545	28,49775	52,65512	101,3899
162	GA	5,660377	14,1902	24,5283	47,46371	90,92157
163	GA	5,738455	14,32286	24,42832	47,62983	94,06801
164	GA	4,03019	10,97142	23,22844	73,83997	124,2609
165	GA	5,500898	11,51562	22,17483	80,07484	132,0889
166	GA	5,080344	13,10608	18,20168	77,7501	125,469
167	GA	5,757809	12,67456	21,01573	93,41528	138,4906
168	GA	5,966562	13,67925	27,83019	75,95658	118,8763
169	GA	4,03019	15,24103	23,57547	78,97669	124,0387
170	GA	5,188679	17,00732	28,49775	70,69966	120,6856
171	GA	6,132075	14,1588	28,30189	56,65289	109,0857
172	GA	4,002491	14,9164	25,3842	23,79622	83,39591
173	GA	5,679997	15,16053	26,88679	74,02054	122,0632
174	GA	6,620599	12,09057	27,50449	29,11184	89,48475
175	GA	5,273745	17,55452	25,85749	52,95849	109,4868
176	GA	4,716981	12,09057	23,47616	40,84208	86,72064
177	GA	6,415788	14,40032	28,91244	40,20517	96,36159
178	GA	5,080344	14,15094	33,35409	41,49335	96,08874
179	GA	5,834583	13,08059	34,8227	35,02021	91,76923
180	GA	5,738455	13,21597	24,62336	75,43779	132,823

181	GA	6,569994	16,83639	37,92406	58,97547	124,9715
182	GA	5,500898	14,36938	22,60709	56,11622	109,1133
183	GA	5,210076	14,9908	32,24497	71,18892	136,4928
184	GA	5,188679	17,93073	36,0008	44,54239	115,0499
185	GA	6,040683	13,11456	32,19318	50,1422	112,8187
186	GA	5,966562	15,67997	36,29318	62,62936	123,9714
187	GA	6,415788	13,71174	33,67938	41,80054	105,2986
188	GA	6,753689	14,53106	26,45297	42,94785	104,5447
189	GA	6,328494	16,03774	34,8195	53,72598	115,9505
190	GA	5,336655	15,67997	29,44621	58,53049	119,8262
191	GA	4,271408	11,35999	14,65304	16,75027	48,26096
192	GA	5,521085	14,1588	38,43978	26,62066	86,96276
193	GA	5,500898	12,38151	22,34973	47,7255	86,11818
194	GA	5,738455	11,94244	27,39506	51,83746	101,4754
195	GA	4,856429	12,83158	18,35385	39,49327	81,27729
196	GA	6,70409	11,35999	27,06824	113,6411	162,7632
197	GA	4,924673	11,83013	21,53342	45,78388	87,13146
198	GA	6,328494	13,71174	22,10951	29,52167	75,92142
199	GA	7,458202	12,38151	23,20927	64,72069	112,4077
200	GA	4,645688	13,50738	20,95211	47,51056	90,10545
201	GA	6,70409	16,13456	17,54818	100,04	144,9764
202	GA	5,500898	18,0544	23,11321	98,91049	148,7533
203	GA	5,188679	21,48169	23,41923	31,24622	72,78533
204	GA	4,716981	14,74387	19,88419	35,4402	69,9005
205	GA	5,69955	17,40176	36,0286	57,7498	111,4526
206	GA	5,500898	20,47952	16,90891	103,8807	130,2715
207	GA	5,273745	15,22643	21,03689	93,21619	130,3202
208	GA	5,521085	16,98768	19,01476	113,8709	151,6801
209	GA	6,603774	14,43119	19,56837	50,68286	90,49353
210	GA	4,449991	9,678436	15,34288	38,37026	65,04818
211	GA	4,245283	11,10245	19,83377	32,19318	65,06186
212	GA	4,474921	10,76671	14,36938	32,84659	67,0409
213	GA	3,68408	15,82124	23,75411	65,23263	106,4001
214	GA	3,401463	9,678436	13,51561	31,52976	59,82203
215	GA	5,01422	11,83013	23,11802	25,9434	57,56457
216	GA	5,336655	12,46212	21,12133	45,5964	86,54728
217	GA	4,245283	11,33058	21,70324	44,96993	78,85404
218	GA	4,348842	11,0018	11,90512	36,50407	64,53996
219	GA	5,188679	14,74387	20,88829	27,84617	62,2713
220	GA	4,856429	12,1731	15,05005	47,88607	87,54417
221	GA	5,273745	17,21537	28,49385	42,36101	78,64921
222	GA	3,773585	12,02599	21,92762	30,66038	64,29645
223	GA	4,716981	14,13521	16,12076	26,43614	64,33969
224	GA	4,348842	13,3166	25,07554	58,28097	98,84636
225	GA	3,301887	10,94096	19,95121	32,63251	59,7029
226	GA	7,678689	12,08137	23,68376	33,38077	70,07218
227	GA	5,91036	14,43119	23,33833	47,24993	84,32321

228	GA	5,102195	13,75225	22,60709	31,85622	74,47604
229	GA	4,716981	10,84906	19,36262	41,06213	76,97934
230	GA	8,962264	14,34614	24,09357	31,14637	70,95569
231	GA	5,966562	13,21597	23,79622	47,89304	85,42816
232	GA	7,012297	15,30659	17,39537	29,03531	67,84915
233	GA	5,69955	11,05224	19,81694	37,50519	71,62981
234	GA	5,378186	11,83013	19,88419	28,69615	66,92131
235	GA	4,716981	16,06546	22,64151	37,7388	80,66038
236	GA	3,802952	12,87485	22,37461	43,36032	81,51511
237	GA	5,273745	13,96896	20,60408	39,23043	78,90905
238	GA	6,150191	12,1731	23,74006	27,2648	64,65018
239	GA	7,138088	14,1902	15,67997	35,12489	68,44175
240	GA	4,348842	14,27618	30,77988	30,45285	85,72197
241	GAH	2,983281	6,964539	9,291375	27,84617	45,36647
242	GAH	4,245283	5,966562	9,110004	24,85719	39,40021
243	GAH	2,668327	4,057701	7,736424	21,44022	34,43719
244	GAH	4,716981	7,215594	12,74458	21,55924	40,09434
245	GAH	3,020342	8,774092	10,85931	22,8372	37,07559
246	GAH	3,802952	5,966562	13,87306	20,06797	39,76838
247	GAH	5,273745	9,110004	16,29237	32,06506	58,43348
248	GAH	3,802952	11,35999	8,697683	14,37712	34,69467
249	GAH	2,405198	7,779445	12,40844	20,50124	38,02952
250	GAH	3,020342	8,251347	9,551159	21,60048	35,59993
251	GAH	2,983281	5,378186	9,724306	25,98196	42,21369
252	GAH	2,358491	5,966562	14,36938	20,30495	35,51545
253	GAH	3,68408	8,697683	10,38807	16,34691	36,39419
254	GAH	3,020342	7,184692	6,415788	22,9732	40,57701
255	GAH	3,401463	7,807993	10,76671	39,08269	58,33249
256	GAH	2,540172	4,645688	8,659226	33,35409	47,05883
257	GAH	3,802952	13,21597	17,4592	37,37147	70,91178
258	GAH	4,810396	13,28314	19,15466	37,65617	76,23435
259	GAH	4,348842	13,41647	17,04652	37,7388	78,46085
260	GAH	4,057701	12,08137	18,0544	30,71476	63,49905
261	GAH	5,102195	10,20439	24,01495	40,66738	79,05694
262	GAH	3,335409	11,0119	26,89093	39,38044	80,50023
263	GAH	2,524124	10,23587	16,52328	23,52897	71,63581
264	GAH	4,348842	11,34039	15,55889	33,06264	74,51188
265	GAH	4,645688	11,35999	19,81132	37,26415	82,54717
266	GAH	5,01422	7,075472	15,76488	29,01998	62,70924
267	GAH	5,273745	11,33058	16,67705	57,6341	97,78269
268	GAH	3,889722	10,12779	21,33098	43,50376	80,41727
269	GAH	5,188679	8,542816	22,16981	58,17015	93,92598
270	GAH	5,521085	18,77927	21,72885	41,66192	86,75784
271	GAH	4,348842	13,01237	17,68082	40,22454	77,06456
272	GAH	4,245283	9,712859	17,66193	38,67349	72,84644
273	GAH	2,983281	7,458202	5,834583	20,15095	35,38993
274	GAH	3,020342	7,337901	13,01237	25,3842	48,36459

275	GAH	2,869228	8,251347	11,51562	20,06797	43,45771
276	GAH	4,218996	6,415788	11,4866	17,73108	32,27601
277	GAH	1,700732	4,002491	8,345192	26,22913	45,90037
278	GAH	2,668327	6,040683	9,061025	23,74006	41,44506
279	GAH	3,335409	8,018868	14,89401	19,70434	38,02074
280	GAH	2,983281	7,678689	10,42015	22,68569	42,71408
281	GAH	2,540172	7,620516	11,66917	33,29066	58,97547
282	GAH	2,109498	6,132075	8,672064	25,84028	44,23412
283	GAH	2,540172	4,218996	9,551159	23,41923	37,83595
284	GAH	2,109498	4,449991	7,850621	23,07467	40,52488
285	GAH	2,830189	4,348842	6,753689	16,40804	30,13704
286	GAH	2,750449	5,273745	8,237853	33,11979	51,05029
287	GAH	3,020342	8,345192	8,004982	19,70434	35,72782
288	GAH	2,405198	7,458202	8,949842	26,77069	48,0762
289	GAH	4,924673	12,02599	21,48169	40,82029	86,36585
290	GAH	3,401463	8,659226	15,62311	29,32506	55,94149
291	GAH	2,983281	6,569994	17,75616	33,75856	64,24279
292	GAH	2,830189	12,77074	20,37059	51,72574	88,93105
293	GAH	2,983281	12,05371	26,30114	61,89139	116,9583
294	GAH	2,405198	9,158721	20,26107	34,43719	71,86085
295	GAH	2,869228	10,89	21,22642	36,333	78,77923
296	GAH	4,245283	14,15094	25,00445	48,64212	94,41506
297	GAH	3,773585	13,68738	24,64143	47,19103	102,428
298	GAH	2,750449	8,115401	17,17007	24,89297	52,31598
299	GAH	2,983281	8,812048	20,73863	35,35219	66,67649
300	GAH	3,802952	13,71174	18,7852	42,55229	82,16217
301	GAH	2,668327	8,899982	17,15062	33,00539	61,08263
302	GAH	3,301887	13,04653	20,33232	50,90189	89,05605
303	GAH	2,830189	12,30038	19,95121	52,4328	105,3102
304	GAH	3,68408	10,37736	23,58962	61,82125	100,4894
305	GAH	4,348842	12,40844	21,64164	26,11436	65,18486
306	GAH	3,301887	13,28314	23,81492	31,82826	72,04639
307	GAH	5,273745	13,87306	25,33594	54,84695	97,67796
308	GAH	6,040683	14,26058	25,66315	67,93108	133,7736
309	GAH	6,415788	14,81162	43,52933	55,50025	118,674
310	GAH	4,218996	10,6001	25,90477	52,20528	102,9999
311	GAH	2,750449	11,0119	32,71423	38,60439	86,36714
312	GAH	2,750449	9,916885	20,06797	50,00222	85,86072
313	GAH	4,245283	13,4909	27,42348	33,41075	81,65284
314	GAH	4,057701	12,30038	32,53007	37,70046	87,65466
315	GAH	6,753689	16,87598	39,67876	52,06872	116,4359
316	GAH	5,500898	13,92908	23,87091	35,75584	85,42816
317	GAH	4,716981	12,53333	28,64571	39,98598	85,32653
318	GAH	4,218996	8,437992	15,45126	42,51829	83,07513
319	GAH	4,449991	16,24451	21,45578	56,32992	100,8342
320	GAH	3,592346	12,55993	21,14239	37,50519	73,83997
