

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DEFEITOS DA PAREDE ABDOMINAL**

**MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO
DA GASTROSQUISE EM EMBRIÕES
DE GALINHA**

Carlos André Tarrío Gandara

Porto Alegre
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DEFEITOS DA PAREDE ABDOMINAL

**MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO
DA GASTROQUISE EM EMBRIÕES
DE GALINHA**

Carlos André Tarrío Gandara

*Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção do título de Mestre em Medi-
cina.*

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Índio Carvalho da Motta

Porto Alegre

2002

Ficha Catalográfica

G195m Gandara, Carlos André Tarrio

Modelo experimental para o estudo da gastrosquise em embriões de galinha / Carlos André Tarrio Gandara ; orient. Ubirajara Índio Carvalho da Motta. – Porto Alegre, 2002.
153 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia.

1. Gastrosquise. 2. Modelos animais de doenças. 3. Embrião de galinha. I. Motta, Ubirajara Índio Carvalho da. II. Título.

NLM: W1950

Pegue vinte ou mais ovos e deixe-os para serem chocados por duas ou mais galinhas. Então a cada dia, a partir do segundo dia de incubação, retire um ovo, quebre-o e examine-o.

Você encontrará exatamente as situações que eu informo, pois a natureza da ave assemelha-se à do homem.

Hipócrates (460-377 a.C.)

*À minha amada esposa **Mariângela**, minha maior incentivadora, por ter proporcionado a tranqüilidade necessária para realizar este sonho.*

*À nossa filha **Maria Eduarda**, que nasceu em meio à dissertação e encheu de alegria nossas vidas.*

*Aos meus **pais**, pelo exemplo.*

*“Soñar lo imposible soñar
Vencer al invicto rival
Sufrir el dolor insufrible
Morir por un noble ideal...
...Con fe una estrella alcanzar
Luchar por un mundo mejor
Perseguir lo mejor que hay en ti
Llegar donde nadie há llegado
Y soñar lo imposible soñar”*

Don Quijote y Aldonza
Letra de Joe Darion
Do musical “El hombre de La Mancha”

Ao Dr. Ubirajara Índio Carvalho da Motta,
exemplo de Médico e Amigo,
a quem tantos outros cirurgiões pediátricos, como eu, devemos aquilo que temos de mais
precioso na medicina, nossa formação e nosso amor pelos pacientes.
Obrigado.

————— Agradecimentos —————

- Ao colega **Eduardo Spadari Araújo**, amigo e colaborador, que com seu espírito científico contribuiu diretamente para esta dissertação.
- Ao **Dr. Tanju Aktug**, da *Dokuz Eylul University*, Izmir, Turquia, que pacientemente respondeu a todas as minhas dúvidas, forneceu preciosas sugestões e prestou significativa colaboração para o desenvolvimento deste estudo.
- Aos mestres **Elinês Oliva Maciel**, **João Vicente Bassols** e **João Carlos Ketzer** de Souza, pelo exemplo, estímulo e amizade.
- Ao médico veterinário **Aírton Cogo**, exímio especialista na criação de aves, que, com sua experiência, auxiliou no aprendizado do desenvolvimento e criação dos embriões, e à sua empresa, a Sulave S.A, que gentilmente cedeu os animais para a pesquisa.
- Ao **Dr. Celso Piccoli Coelho**, diretor do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade de Caxias do Sul (UCS), pelo apoio à execução do experimento nos laboratórios da UCS.
- Aos colegas médicos patologistas **Alessandra Godoy**, **Vinícius Silveira** e **Ana Maria Geiger**, pela competência na preparação e análise do material anatomopatológico.

- Ao amigo e colega de mestrado **Clândio de Freitas Dutra**, pelas inúmeras vezes em que trocamos idéias sobre nossas dissertações nestes dois anos de convivência.
- Ao **Dr. Mário Wagner**, que, com sua competência e objetividade, iluminou os caminhos da estatística e da epidemiologia.
- À **Dra. Maria do Horto Motta**, pelo requinte e competência na revisão de linguagem de todo o trabalho.
- Aos **funcionários** do Biotério da UCS, em especial à **Sra. Maria Ilani da Silveira**, pela paciência e carinho que dedicou no cuidado diário dos embriões e pintos.
- Aos **professores** e **funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3 - MATERIAL E MÉTODO	49
3.1 - Delineamento da Pesquisa	49
3.2 - Local da Pesquisa	49
3.3 - Estudo Piloto	49
3.4 - Amostra	53
3.4.1 - <i>Critérios de Inclusão</i>	53
3.4.2 - <i>Critérios de Exclusão</i>	53
3.4.3 - <i>Grupos</i>	54
3.5 - Método	55
3.6 - Variáveis em Estudo	67
3.7 - Ética em Estudos Experimentais	68
3.8 - Análise Estatística	70
4 - RESULTADOS	72
4.1 - Sobrevida	72
4.2 - Acidentes no Procedimento	75
4.3 - Peso, Comprimento e Largura dos Ovos e Peso dos Embriões	76
4.4 - Análise Macroscópica das Vísceras Expostas	78
4.5 - Análise Microscópica das Alças Intestinais	82
4.6 - Número de Plexos Nervosos	90
4.7 - Espessura Intestinal	92
5 - DISCUSSÃO	96
6 - CONCLUSÕES	108
7 - PERSPECTIVAS	110
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
ANEXOS	

————— Lista de Tabelas —————

Tabela 1	Comparação entre os estudos no Brasil e Inglaterra	4
Tabela 2	Gastrosquise <i>versus</i> Onfalocele.....	9
Tabela 3	Fatores de risco para gastrosquise	17
Tabela 4	O embrião de galinha como modelo experimental para outras patologias que não a gastrosquise	40
Tabela 5	Avaliação histológica do intestino dos embriões de galinha.....	69
Tabela 6	Acidentes no procedimento para criar uma gastrosquise.....	75
Tabela 7	Medidas de peso, comprimento e largura dos ovos, peso dos embriões e relação peso do embrião peso do ovo (média \pm desvio padrão)	76
Tabela 8	Análise histológica das alças de intestino delgado dos 3 grupos, baseado no escore padronizado da tabela 5 (média \pm desvio padrão).....	89
Tabela 9	Número de plexos nervosos por corte de intestino (média \pm desvio padrão)	91
Tabela 10	Medidas de espessura intestinal em micrômetros.....	93
Tabela 11	Sobrevida dos modelos experimentais de gastrosquise.....	100

————— Lista de Figuras —————

Figura 1	Gastrosquise.....	7
Figura 2	Gastrosquise – detalhe.....	7
Figura 3	Onfalocele – Observar o saco recobrimdo, as alças intestinais.....	8
Figura 4	O embrião de galinha e suas relações com as membranas extra-embriônicas. (1) Embrião, (2) Cavidade amniótica – âmnio, (3) Gema – saco da gema, (4) Albumina, (5) Cavidade alantóide – membrana alantóide, (6) Câmara de ar, (7) Membrana amnioalantóide, (8) Membrana corioalantóide, (9) Casca do ovo – membrana do ovo.....	36
Figura 5	Embrião de 13 dias de desenvolvimento.....	50
Figura 6	Transiluminação evidenciando o ovo fecundado (a) e não fecundado (b).....	51
Figura 7	Gancho manufaturado a partir de um estilete cirúrgico, utilizado para identificar e trazer para fora o cordão umbilical, diminuindo o risco de lesão do embrião.....	52
Figura 8	Incubadora.....	55
Figura 9	Incubadora aberta.....	56
Figura 10	Antissepsia com álcool 70%, na extremidade mais alargada do ovo.....	58
Figura 11	Abertura do orifício na extremidade mais alargada do ovo, com o uso da pinça tipo “mosquito”.....	59
Figura 12	Orifício de 0,7 a 1 cm de diâmetro aberto sobre a câmara de ar para abordagem cirúrgica.....	59
Figura 13	Orifício sobre a câmara de ar com visão da membrana do ovo.....	60

Figura 14	Abordagem da cavidade alantóide e amniótica com o gancho, para abrir as membranas e localizar o cordão umbilical.....	60
Figura 15	Gancho trazendo o cordão umbilical.....	61
Figura 16	Gancho trazendo o coto umbilical com as alças intestinais visíveis mas cobertas pela membrana do cordão.....	61
Figura 17	Tesoura de Iris abrindo o cordão umbilical, tomando-se o cuidado de não lesar a artéria e veia umbilical.....	62
Figura 18	Cordão umbilical aberto e as alças intestinais parcialmente expostas.....	62
Figura 19	Alças intestinais fora do cordão umbilical, liberadas das membranas que recobrem.....	63
Figura 20	Cordão umbilical devolvido para dentro do ovo e o orifício sendo coberto por um curativo plástico adesivo.....	63
Figura 21	Fechamento do orifício com curativo plástico.....	64
Figura 22	Final do procedimento, ovos devolvidos à incubadora para controle de temperatura, umidade e viragem até o 19º dia.....	64
Figura 23	No 19º dia de desenvolvimento o ovo é aberto e a vitalidade do embrião é avaliada pelos movimentos espontâneos ou pelo sangramento das membranas da casca.....	65
Figura 24	Embrião no 19º dia, no momento da abertura do ovo.....	65
Figura 25	Detalhe do abdômen do embrião com o saco da gema, o cordão umbilical e as alças intestinais com aspecto espessado protuídas para fora do abdômen.....	66
Figura 26	Embriões mortos do grupo gastrosquise.....	72
Figura 27	Embrião do grupo gastrosquise morto.....	73
Figura 28	Embrião do grupo gastrosquise, que no 19º dia apresentava cicatrização completa do coto umbilical, sem exteriorização das alças.....	74

Figura 29	Distribuição dos ovos e embriões na amostra.....	75
Figura 30	Gráficos de média e barra de erro (\pm desvio padrão) representando a comparação de diversas variáveis entre os grupos em estudo (G: gastrosquise; M: mistura; C: controle).....	77
Figura 31	Embrião vivo do grupo gastrosquise	78
Figura 32	Embrião vivo do grupo gastrosquise	79
Figura 33	Embrião vivo do grupo gastrosquise. Alças intestinais expostas, aderidas e com parede espessada, ainda é possível identificar o saco da gema	79
Figura 34	Embrião vivo do grupo gastrosquise. Alças intestinais expostas, lateralmente ao cordão umbilical e ao saco a gema.....	80
Figura 35	Embrião do grupo mistura.....	80
Figura 36	Embrião do grupo controle.....	81
Figura 37	Detalhe do coto umbilical aberto do embrião do grupo controle	81
Figura 38	Corte histológico do intestino de embrião do grupo C, (100x.....	82
Figura 39	Corte histológico do intestino de embrião do grupo C, (100x). Enterite leve	83
Figura 40	Corte histológico do intestino de embrião do grupo C, (400x.....	83
Figura 41	Corte histológico do intestino de embrião do grupo M, (100x)	84
Figura 42	Corte histológico do intestino de embrião do grupo M, (400x). Enterite leve	84
Figura 43	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (40x).....	85
Figura 44	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (100x).....	85

Figura 45	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (100x).....	86
Figura 46	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (100x).....	86
Figura 47	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x). Serosite severa.....	87
Figura 48	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x).....	87
Figura 49	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (100x).....	88
Figura 50	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x).....	88
Figura 51	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x).....	89
Figura 52	Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x).....	90
Figura 53	Corte histológico do intestino de embrião do grupo M, (400x).....	91
Figura 54	Corte histológico do intestino de embrião do grupo C, (40x). Demonstração das camadas intestinais medidas pela morfometria digital.....	92
Figura 55	Gráficos de média e barra de erro (\pm desvio padrão) representando a comparação de medidas de espessuras intestinais. (G: gastrosquise; M: mistura; C: controle).....	94

———— **RESUMO** ————

RESUMO

A gastrosquise passou, nos últimos 50 anos, da condição de uma patologia fatal para índices de sobrevivência ao redor de 90%, graças aos avanços na neonatologia e cirurgia neonatal modernas. Porém uma significativa morbidade permanece, relacionada principalmente com o atraso no início do funcionamento intestinal normal. Este tema é objeto de estudo em vários centros visando determinar a origem do problema e promover soluções. Os modelos experimentais em animais são parte importante desses estudos. O objetivo deste trabalho foi o de reproduzir o modelo experimental da gastrosquise em embriões de galinha e comprovar que as alterações histopatológicas apresentadas são comparáveis às da gastrosquise em humanos. Foram utilizados 278 ovos galinha da raça Leghorn (*Gallus domesticus*). Os embriões foram divididos em três grupos: grupo gastrosquise, no qual, através de um orifício na casca do ovo, o cordão umbilical foi aberto e as alças intestinais expostas a uma mistura de líquidos amniótico e alantóide; grupo mistura, no qual se promovia apenas a mistura de líquidos amniótico e alantóide, sem a manipulação do coto umbilical e sem a exposição de alças intestinais; e o grupo controle, que consistia de embriões normais e nos quais nenhum procedimento foi realizado. Os procedimentos foram feitos no 13^o dia do desenvolvimento embrionário, e o estudo encerrado no 19^o, quando as alças

intestinais dos embriões foram removidas e encaminhadas para análise histológica convencional e análise morfométrica digital. Ao final do experimento, foram obtidos 23 embriões vivos do grupo gastrosquise (11,1% de sobrevivência), 18 dos quais apresentavam alças intestinais expostas (8,7% de sucesso). No grupo mistura, 12 (70,5%) de 17 embriões sobreviveram ao procedimento. Como controle foram utilizados 10 embriões normais. Os embriões do grupo gastrosquise apresentaram um peso menor que os dos outros grupos. Este grupo também desenvolveu alterações intestinais consistindo em infiltrado inflamatório da serosa e mucosa, alterações isquêmicas da parede intestinal e formação de uma camada de fibrina sobre as alças. Tais achados são característicos da gastrosquise humana e não foram observados nos demais grupos. Os embriões do grupo gastrosquise mostraram também espessamento da parede intestinal, principalmente da serosa, quando em comparação com os outros grupos. Desta forma, o modelo experimental em embriões de galinha mostrou ser capaz de reproduzir as alterações intestinais da gastrosquise humana.

———— **SUMMARY** ————

SUMMARY

In the last 50 years gastroschisis has gone from a fatal condition to a disease with survival rates of around 90%. This is due to advances achieved in modern neonatology and neonatal surgery. However, there is still significant morbidity, related mainly to the delay in beginning normal intestinal function observed in these patients. This topic has been studied at several centers with a view to determining the source of this problem and achieving solutions. Experimental animal models are a major part of these studies. The purpose of this study was to reproduce the experimental model of gastroschisis in chicken embryos and to prove that the histopathological changes that occur in this model can be compared to those in human gastroschisis. A total of 278 Leghorn hen (*Gallus domesticus*) eggs were used. The embryos were divided into three groups: the gastroschisis group, in which the umbilical cord was opened through an orifice made in the eggshell, and the intestinal loops were exposed to a mixture of amniotic liquid and allantoid; the mixture group, in which the amniotic liquid and allantoid were simply mixed without manipulating the umbilical stump and without exposing intestinal loops; and the control group which consisted of normal embryos in which no procedure was performed. The procedures were performed on the 13th day of embryo development and the study was ended on the 19th day, when the intestinal

loops of the embryos were removed and sent for conventional histological study and digital morphometric analysis. At the end of the experiment, 23 live embryos were obtained in the gastroschisis group (11.1% survival), and 18 of these presented exposed intestinal loops (8.7% success). In the mixture group, 12 (70.5%) of 17 embryos survived the procedure. And 10 normal embryos were used as control. The embryos of the gastroschisis group weighed less than those of the other two groups. The gastroschisis group also developed intestinal changes consisting of an inflammatory infiltrate of the serosa and mucosa, ischaemic changes in the intestinal wall and formation of a fibrin layer over the loops. These findings are characteristic of human gastroschisis and were not observed in the two other groups studied. The embryos of the gastroschisis group also presented a thickening of the intestinal wall, particularly the serosa, as compared with the other groups. Thus, the experimental model in chicken embryos proved able reproduce the intestinal changes of human gastroschisis.

———— 1 - INTRODUÇÃO ————

1 - INTRODUÇÃO

O prognóstico dos recém-nascidos portadores de anomalias congênitas vem se modificando nos últimos anos. Cinquenta anos atrás a gastrosquise era uma malformação fatal, e hoje em dia mais de 90% das crianças sobrevivem e têm um excelente prognóstico a longo tempo¹.

Mas a que fatores se atribui esta importante melhora?

A partir de 1943, quando ocorreu o relato do primeiro paciente portador de gastrosquise que sobreviveu ao tratamento cirúrgico, muita coisa mudou². Desde então foram criadas e aprimoradas as unidades de terapia intensiva neonatal, centros terciários complexos que compreendem, além de equipamentos sofisticados, profissionais altamente capacitados. Outro aspecto importante foi o desenvolvimento da nutrição parenteral, que veio para atenuar o problema das crianças que permaneciam por longos períodos em jejum após a cirurgia. Desenvolveram-se também os métodos de diagnóstico pré-natal, incluindo aí principalmente a ecografia, assim como houve o aprimoramento dos cuidados obstétricos em gestações de alto risco. A qualificação técnica das equipes cirúrgicas e o aprimoramento dos materiais utilizados para correção desses defeitos, como as bolsas de silicone, acrescentaram também sua parcela ao sucesso alcançado. Esses benefícios se estenderam para todas as patologias neonatais, além da gastrosquise, como a atresia de esôfago, a hérnia diafragmática e a enterocolite necrosante^{3, 4}.

Desta forma, diante, hoje, de uma patologia com um índice de cura de 90% dos casos, o que resta por estudar nesses pacientes?

A verdade é que, em gastrosquise, problemas fundamentais ainda não foram solucionados, permanecendo como objeto de estudo por muitos pesquisadores:

- a) a sua etiologia e sua relação com as onfaloceles;
- b) a ação deletéria e inconstante do líquido amniótico sobre as alças intestinais expostas;
- c) a razão para a diminuição da atividade peristáltica dessas alças;
- d) o manejo correto das atresias intestinais associadas;
- e) as indicações dos tratamentos estagiados (silos);
- f) o manejo da síndrome do intestino curto resultante de ressecções intestinais por múltiplas atresias, ou decorrente da diminuição de comprimento do intestino.

Muitas perguntas ainda pendentes a respeito da gastrosquise não podem ser respondidas sem a utilização de modelos experimentais da doença. Os pacientes portadores dessa patologia raramente fornecem material para estudo histológico, ou seja, não faz parte do tratamento a ressecção de porções do intestino que serviriam como fonte de informação histológica. E, quando tais ressecções se fazem necessárias, são devidas a atresias intestinais ou volvo de intestino médio com necrose, material que não representa propriamente a doença. Reside aí a importância de trabalhos que buscam desenvolver estudos em modelos animais dessa malformação congênita,

mesmo em países em desenvolvimento, onde a dedicação à pesquisa básica é menos intensa, como no Brasil.

Em tempos em que expressões como terapia gênica, clonagem e ética saíram do vocabulário científico e passaram a ser usados pela população e pelos meios de comunicação, estudos experimentais de cirurgia fetal são cada vez mais bem-vindos, desenvolvendo, em animais, futuros conceitos e terapias para serem utilizadas em seres humanos.

Em 2001, Vilela *et al.*⁵ publicaram, no *Journal of Pediatric Surgery*, a primeira casuística brasileira de crianças portadoras de gastrosquise na literatura mundial. Nessa mesma revista, seis meses antes, Driver *et al.*⁶ haviam apresentado dados semelhantes a respeito de pacientes de Manchester, Inglaterra. A tabela 1 traz um resumo desses dois estudos.

Tabela 1 - Comparação entre os estudos no Brasil e Inglaterra

	Vilela, 2001 ⁵	Driver, 2000 ⁶
Local	Recife	Manchester
	Brasil	Inglaterra
Período	1995-99	1991-97
Número de casos	31	91
Idade gestacional	≥ 37 sem 22 (71%)	média 36,7 sem
	< 37 sem 9 (29%)	(31-41 sem)
Peso ao nascer	≥ 2,5 kg 17 (54,8%)	média 2,37 kg
	< 2,5 kg 14 (45,2%)	(1,29 - 3,47 kg)
Diagnóstico pré-natal	10 (32,3%)	89 (98%)
Parto em centro terciário	11 (35,5%)	81 (89%)
Via do parto	V 17 (54,8%)	V 67 (73%)
	C14 (45,2%)	C 24 (27%)
Tipo de cirurgia	FP 13 (41,9%)	FP 72 (80%)
	Silo 18 (58,1%)	Silo 18 (20%)
Mortes	16 (51,6%)	7 (7,7%)

Sem: semanas, V: vaginal, C: cesariana, FP: fechamento primário

Os contrastes entre os dois estudos são evidentes. No de Vilela *et al.*⁵, altas taxas de mortalidade estavam associadas com ausência de diagnóstico pré-natal, prematuridade, baixo peso ao nascer, nascimento fora de um centro de atendimento especializado e atraso no tratamento cirúrgico inicial. O desenvolvido na Inglaterra apresenta mortalidade baixa (7,7%) relacionada com septicemia.

A falta de leitos em unidades de terapia intensiva neonatal, o deficiente treinamento das equipes paramédicas, a escassez de centros terciários capazes de lidar de maneira correta com malformações complexas e a quase inexistência de serviços de transporte de recém-nascidos de risco são problemas comuns no Terceiro Mundo e têm impacto nos resultados.

Altas taxas de mortalidade (51,6%), como a observada no estudo brasileiro, e dificuldades de manejo também são relatados em outros países pobres como a Nigéria⁷. Esses índices contrastam com os de unidades de terapia intensiva neonatal de países desenvolvidos, nas quais a mortalidade por gastrosquise varia de 10% a 0%^{1, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13}.

No momento em que pesquisadores de todo o mundo concentram seus esforços para diminuir a lesão intestinal da gastrosquise e alongar o intestino nas situações da síndrome de intestino curto, as dificuldades brasileiras ainda se situam na área dos cuidados básicos.

Mesmo atribuindo grande parte da morbimortalidade no Brasil à falta de cuidados de atenção básica à saúde, estudos em todos os campos de atenção devem ser incentivados dentro das condições disponíveis em cada local. O desenvolvimento de linhas de pesquisa que envolvam um baixo custo na

sua execução bem como a utilização de modelos experimentais baratos se fazem necessários.

O presente trabalho visa iniciar uma linha de pesquisa tendo como modelo experimental o embrião de galinha, modelo esse que foi apresentado à comunidade científica pelo Dr. Dick Tibboel^{14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26}, do *Sophia Childrens Hospital, Erasmus University*, Rotterdam, Holanda e continuado por Tanju Aktug^{14, 27, 28, 15, 29, 30, 31, 32}, da *Dokuz Eylul University*, Izmir, na Turquia.

1.1 - Definições

No grupo de defeitos congênitos da parede abdominal, a gastrosquise freqüentemente é confundida com a onfalocele.

A **gastrosquise** pode ser definida como um defeito de espessura total da parede abdominal paraumbilical, geralmente pequeno (de poucos centímetros), entre o músculo reto abdominal e o cordão umbilical, na maioria das vezes à direita³³ (figuras 1 e 2), podendo raramente ser à esquerda³⁴. Por esse defeito protuem as vísceras abdominais, mais freqüentemente o intestino delgado, algumas vezes o estômago e a bexiga e raramente o fígado. Não existe saco cobrindo as alças intestinais que estão imersas, em contato com o líquido amniótico³³. As alças intestinais apresentam-se, em geral, espessadas, edematosas, encurtadas e cobertas com uma grossa membrana de fibrina e colágeno a que a literatura de língua inglesa denominou de *peel* (que significa casca), designação que se consagrou em várias línguas.

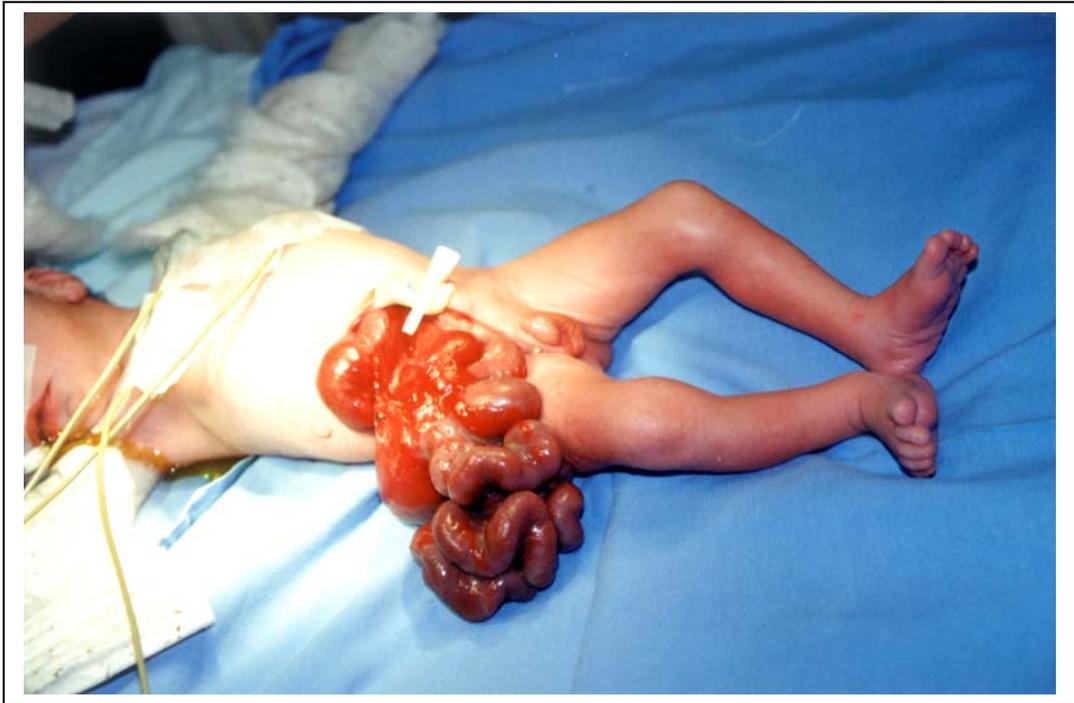


Fig. 1 - Gastrosquise



Fig. 2 - Gastrosquise – detalhe

As **onfalocelos** são defeitos da linha média do abdômen na cicatriz umbilical que apresenta um anel herniário, por onde protui conteúdo abdominal (intestino e freqüentemente o fígado) dentro de um saco formado internamente por peritônio e, na sua camada externa, por âmnio³³ (figura 3). A tabela 2 compara os achados de gastrosquise e onfalocel.



Fig. 3 - Onfalocel – Observar o saco recobrindo, as alças intestinais

Tabela 2 - Gastrosquise versus Onfalocele

Parâmetro	Gastrosquise	Onfalocele
Tamanho do defeito	Pequeno	Pequeno ou grande
Conteúdo	Intestino	Intestino, fígado e baço
Saco herniário	Ausente	Presente (íntegro ou roto)
Inflamação	Presente	Ausente (a menos que o saco esteja roto)
Cordão umbilical	Lateral ao defeito	Inserido no centro do saco herniário
Anomalias associadas	Raras (a mais freqüente é atresia intestinal)	Freqüentes (defeitos cardíacos)
História familiar	Rara	Freqüente

(modificado de Molenaar e Tibboel²¹)

1.2 - Aspectos Históricos

Nem sempre é simples afirmar a quem se deve a primeira descrição de uma doença ou anomalia congênita e, no caso da gastrosquise, sua semelhança com a onfalocele provocou inicialmente muita confusão no diagnóstico.

Segundo Irving², foi Ambroise Paré, famoso cirurgião que viveu no período renascentista (1510-1590), quem fez as primeiras descrições da onfalocele.

Já Nikolas Bax³³, no livro intitulado *Cirurgia do Recém-Nascido*, atribui a Calder, em 1733, a primeira descrição de uma gastrosquise. Bax também refere que o primeiro relato de uma onfalocele teria sido feito em 1557 por

Lycosthenes, com base na célebre publicação *Manual de Patologia e Higiene Antenatal* de autoria de J.W. Ballantyne, em Edimburgo, Escócia, em 1904.

Em 1887, Olshausen propôs a mobilização de retalhos de pele, obtidos a partir de descolamento da pele do abdômen, para cobrir o defeito das onfaloceles. Esse método foi reintroduzido por Willians em 1930 e retomado por Gross em 1948^{2, 33, 35}. A técnica, inicialmente muito atraente, mostrou-se falha porque originava uma grande hérnia ventral que, ao contrário do que se esperava, não diminuía com a idade, mas aumentava cada vez mais a desproporção entre a hérnia e o tamanho da cavidade abdominal³⁵.

Ahlfeld^{2, 33} desenvolveu, em 1899, o chamado tratamento conservador com curativos embebidos em álcool sobre o saco da onfalocele. Esse método foi reintroduzido 60 anos depois por Grob^{2, 35}, utilizando iodo e mercúrio, o que tampouco reduziu a mortalidade.

Ballantyne, em 1904, foi quem propôs o termo **gastrosquise** para designar *todos os defeitos somáticos abdominais, com exceção da hérnia de cordão umbilical fisiológica*.

Em 1943, Watkins descreveu com sucesso o primeiro caso de correção cirúrgica de gastrosquise².

Dez anos mais tarde, Moore e Stokes redefiniram o termo gastrosquise, restringindo-o aos defeitos ventrais da parede abdominal sem a presença de saco². Assim, embora a gastrosquise tenha sido descrita em 1733, somente a partir de 1953 ela foi claramente diferenciada da onfalocele.

Em 1969, Allen e Wrenn³⁶ utilizaram, para a correção da gastrosquise, a técnica de fechamento do defeito com retalhos de pele, anteriormente descrita para a onfalocele.

Outro marco importante no tratamento dessas anomalias foi a descrição por Schuster³⁷ (1967) do uso do silo de material protético para acomodar as alças intestinais no tratamento estagiado da onfalocele e da gastrosquise.

Em 1972, Richard Earlam³⁸ publicou nos Anais do Colégio Real do Cirurgiões de Londres, Inglaterra, o primeiro relato da utilização de embriões de galinha como animal de experimentação para o estudo de anomalias do trato gastrointestinal, com o artigo intitulado *Um estudo sobre a etiologia da estenose congênita do intestino*. A seguir surgiram também as pesquisas do grupo da Holanda, chefiados por Dick Tibboel e, após, as da Turquia, coordenadas por Tanju Aktug, que permanecem até hoje como importantes contribuições na área de investigação da gastrosquise utilizando o mesmo modelo animal.

A Dommergues *et al.*³⁹ se devem os dois primeiros relatos, datados de 1996, sobre amnioinfusão para o manejo da gastrosquise associada com oligodrâmio, onde foram observados os benefícios da diluição do líquido amniótico sobre a inflamação intestinal presente ao nascer, e a Aktug *et al.*²⁹ o relato do primeiro caso de troca de líquido amniótico como forma de terapia intra-útero em fetos humanos com gastrosquise.

1.3 - Patogênese da Gastrosquise

Na literatura médica, a verdadeira natureza da gastrosquise e da onfalocele permanece em discussão. Enquanto alguns embriologistas e cirurgiões pediátricos consideram que elas representam entidades distintas com diferentes aspectos embriológicos e patológicos³³, outros pesquisadores julgam corresponder a gastrosquise à ruptura intra-útero do saco de uma pequena onfalocele, representando ambas, desta forma, anomalias similares^{40, 41}

Gross e Blodgett, citados por Kluth e Lambrecht⁴², descreveram a onfalocele como um defeito originado por uma interrupção no desenvolvimento da cavidade corporal que parava de se expandir entre a 8ª e a 12ª semanas de gestação; como resultado, o intestino não conseguiria retornar para a cavidade ao redor da 10ª semana e permaneceria em uma posição anormal. Porém, sendo assim, como explicar a presença de fígado, estômago e baço no saco herniário das onfalocelas gigantes, já que tais estruturas não estão presentes na hérnia fisiológica de cordão?

Shaw⁴¹ prefere definir a onfalocele como um verdadeiro defeito de formação da parede do abdômen (não somente no anel umbilical) para, desta forma, explicar a presença do fígado no saco e a associação de onfalocele com defeitos severos da parede abdominal, como a extrofia de cloaca.

Para explicar a origem da gastrosquise existem hoje, na literatura médica, quatro teorias:

1. **Evento teratogênico:** Em 1963, Duhamel⁴³ sugeriu que um evento teratogênico precoce deveria estar presente e, assim, evitaria a diferenciação do mesênquima que forma as bordas da somatopleura, sendo a falha nesse suporte a origem do defeito abdominal adjacente à cicatriz umbilical. Outros pesquisadores concordam com a opinião de Duhamel^{44, 45}, porém a falha nessa teoria está na ausência de defeito na musculatura dos retos abdominais¹. Gray e Skandalakis, citados por Kluth e Lambrecht⁴², assim se manifestaram na primeira edição de seu livro *Embriologia para Cirurgiões* (1972): *o defeito ocorre pela falha na migração da musculatura a partir dos miótomos dorsais que invadem a esplancopleura da parede abdominal embrionária*. Já na segunda edição (1994) os autores admitem não haver uma perfeita explicação embriológica para a gastrosquise.

2. **Ruptura de uma pequena onfalocele:** Shaw⁴¹ acredita ser a gastrosquise o resultado final da ruptura intra-útero das membranas que recobrem uma hérnia de cordão umbilical (nome dado na época às pequenas onfaloceles). O distúrbio poderia ocorrer a partir da involução anormal (em tempo ou extensão) da veia umbilical direita, em cujo local ficaria uma zona de infarto com subsequente defeito. Shaw⁴¹ faz uma crítica aos artigos e definições que apresentam a gastrosquise como um defeito lateral a um cordão umbilical “normalmente” inserido. Segundo ele, várias fotos nos próprios artigos mostram que o cordão não está “normalmente” formado. A sugestão de que a gastrosquise é gerada pela ruptura de uma membrana que cobre uma hérnia do cordão umbilical é reforçada pela presença muito freqüente de má-rotação intestinal associada, bem como pelo relato do caso de um feto com

34 semanas de gestação, apresentando gastrosquise, que, em uma ultra-sonografia realizada sete semanas antes, apresentava apenas um hérnia umbilical, facilmente demonstrada. Esse fato chamou tanto a atenção da comunidade científica que os autores denominaram o artigo⁴⁰ publicado no *Journal of Pediatric Surgery*, em 1985, de *O elo perdido da gastrosquise*. Glick et al.⁴⁰ entendem que existem dois tipos distintos de onfaloceles, as relacionadas com síndromes, nas quais a onfalocele em geral é gigante, as anomalias associadas são freqüentes e o prognóstico é ruim, e as onfaloceles não-relacionadas com síndromes, nas quais o tamanho do defeito é variável, as anomalias associadas são raras e o prognóstico é bom, sugerindo que a gastrosquise poderia ser ruptura intra-útero de onfaloceles não relacionadas com síndromes. Interessante também é a constatação de que, em modelo experimental de embriões de galinha, como o aqui apresentado, a gastrosquise é produzida com mais fidedignidade de aspectos histopatológicos quando o defeito é criado no coto umbilical e não na parede abdominal do embrião lateral ao cordão¹⁵.

3. Anomalias da veia umbilical direita: Teorias mais recentes têm centrado foco na hipótese de uma anomalia vascular. Em humanos, a veia umbilical direita involui ao redor da 5^a semana de gestação. Baseado na observação de uma série de embriões, DeVries⁴⁶ postulou que a gastrosquise seria originada a partir da prematura atrofia ou da prolongada persistência da veia umbilical direita (e raramente a esquerda), interferindo no desenvolvimento da parede abdominal e na junção com o coto umbilical.

4. **Defeito nas artérias onfalomesentéricas:** Alternativamente, tem se postulado que um acidente vascular envolvendo as artérias onfalomesentéricas seria a causa da gastrosquise^{47, 48}. As artérias onfalomesentéricas são ramos embrionários da aorta, pares, a artéria esquerda involui e a direita persiste como a artéria mesentérica superior⁴⁹. A disrupção intra-uterina da artéria onfalomesentérica direita poderia comprometer a irrigação da parede abdominal com necrose da base do cordão umbilical e herniação do intestino. O interessante dessa teoria é que ela poderia explicar a associação de gastrosquise com atresia intestinal, relativamente freqüente, já que esta última tem uma gênese vascular comprovada. Seriam as atresias uma lesão secundária ao comprometimento vascular e não ao estrangulamento do intestino no anel herniário como já foi postulado⁴¹. Um reforço à teoria de mecanismo vascular é a associação de consumo de álcool, fumo e compostos com substâncias vasoativas (como os descongestionantes nasais e cocaína) com fetos com gastrosquise^{1, 50, 51}. O álcool é conhecido por atravessar a barreira placentária e afetar a circulação umbilical; o cigarro também atua causando vasoconstricção e vasoespasmo placentário⁵¹.

Não existe consenso sobre o momento da gestação em que ocorre a gastrosquise. Estudos de ultra-sonografia já evidenciaram fetos de 12 e 14 semanas com o defeito^{8, 52, 53}, mas, em abortos de 8 semanas, já foi encontrada a anomalia^{18, 19, 20}. Alguns autores identificaram gastrosquise no último trimestre de gestação quando ultra-sonografias prévias eram normais¹.

1.4 - Epidemiologia

Estima-se a prevalência global da gastrosquise em 1,36 para cada 10.000 nascimentos (variando de 0,4 a 3,01), número que passa a 1,96 para 10.000 quando se incluem os abortamentos e cai para 1,06 quando somente nativos são considerados¹. Um aparente incremento na prevalência vem sendo observado nas últimas duas décadas e pode se dever parcialmente ao aumento no número de diagnósticos e a uma maior acurácia na diferenciação com as onfaloceles, mas, em contrapartida, a prevalência mantida em outras regiões do globo fala a favor de um aumento real. Dados do *Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas – ECLAMC*⁵⁴ informam que a prevalência da gastrosquise na América Latina é de 1,24 para cada 14.000 nascimentos vivos, já a onfalocele situa-se em 1 para cada 4.000 nascimentos vivos. Em 16 maternidades de Porto Alegre que participam do ECLAMC, no ano de 2000 houve 23.518 nascimentos e 9 casos registrados de gastrosquise, com uma taxa de 3,8 para cada 10.000 nascimentos⁵⁵. No Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a prevalência de gastrosquise entre nascidos vivos é da ordem de 4,13 para cada 10.000. Esta elevada taxa deve-se ao fato de ser um centro de tratamento terciário que recebe casos com diagnóstico pré-natal encaminhados de todo o estado do Rio Grande do Sul⁵⁵.

Muitas possibilidades têm sido levantadas como fatores de risco para gastrosquise. A tabela 3 resume os principais.

Tabela 3 - Fatores de risco para gastrosquise

Fator em estudo	Evidência
Fatores Obstétricos	
Mães jovens ^{50, 51}	Forte
Doença materna (gripe) ⁵¹	Fraca
Baixo índice de massa corporal ⁵⁶	Fraca
Agentes Químicos	
Fumo ¹	Fraca
Álcool ⁵¹	Fraca
Salicilatos ^{50, 51}	Fraca
Descongestionantes nasais ^{50, 51}	Fraca
Ibuprofeno ^{50, 51}	Fraca
Drogas (cocaína e <i>Canabis</i>) ¹	Fraca
Fatores Socioeconômicos	
Classe social baixa ⁵⁶	Fraca
Fatores Ambientais	
Moradia próxima de depósitos de lixo ⁵⁷	Fraca
Nutrientes da dieta ¹	Fraca

Modificado de Curry *et al.*¹

Ocorrência familiar de gastrosquise tem sido descrita por vários autores⁵⁸. No estudo populacional da Califórnia⁵⁶, 6 (4,7%) de 127 famílias tiveram mais de um filho acometido, e o risco de recorrência é calculado em 3,5%.

1.5 - Diagnóstico Pré-Natal dos Defeitos da Parede Abdominal

O desenvolvimento das técnicas de diagnóstico pré-natal tem sido cada vez mais rápido nas últimas duas décadas⁵⁹. Um grande número de anomalias atualmente pode ser diagnosticado no período gestacional.

Decisões importantes são tomadas a partir desses diagnósticos, razão pela qual alguns autores defendem a interrupção da gravidez quando do diagnóstico de uma anomalia cromossômica, de uma onfalocele gigante ou de alterações sabidamente incompatíveis com a vida^{59, 60}.

O diagnóstico diferencial, através da ultra-sonografia, entre onfalocele e gastrosquise pode ser difícil no primeiro trimestre gestacional⁵². Porém a disponibilidade cada vez maior de sondas de ecografia transvaginal de alta resolução (5 e 7,5 MHz) tem possibilitado um maior detalhamento das estruturas embriológicas no início da gravidez, tanto assim que Bahlmann *et al.*⁵², estudando 58 fetos com diagnóstico de defeito da parede abdominal, obtiveram 100% de diagnóstico diferencial entre onfalocele e gastrosquise por ultra-sonografia.

Elevação nos níveis de alfafetoproteína no soro materno tem sido associada com defeitos do fechamento do tubo neural e da parede abdominal, assim como níveis baixos estão associados com defeitos cromossômicos. Bahlmann *et al.*⁵² encontraram alta sensibilidade para detecção de gastrosquise utilizando a dosagem de alfafetoproteína no soro materno. Na sua série, os valores de alfafetoproteína foram 7 vezes superiores aos da média para casos de gastrosquise e 4,1 vezes aos de casos de onfalocele. Acredi-

ta-se que a diferença entre o nível de detecção de onfalocele e gastrosquise se deva à presença do saco que cobre as onfaloceles. Uma vez que a alfafetoproteína é liberada pelo intestino na troca de proteínas que realiza com o líquido amniótico, o saco das onfaloceles diminuiria essa troca e, consequentemente, sua reabsorção pelo sangue materno^{52, 61}. Além das medidas no soro materno, alfafetoproteína e acetilcolinesterase podem ser dosadas no líquido amniótico^{62, 63}.

1.6 - Etiologia da Lesão Intestinal na Gastrosquise

A gastrosquise é muitas vezes complicada pela lesão do intestino delgado herniado, resultando em distúrbios da motilidade, ocasionalmente necrose intestinal e atresias^{61,64, 65, 66, 67}, o que se torna importante na medida em que o prognóstico desses pacientes está relacionado com as condições do intestino ao nascimento^{61, 68, 69, 70}.

A obtenção de tecido humano para estudo da lesão intestinal na gastrosquise é difícil. Na maioria dos casos, não se realizam ressecções intestinais que possam produzir material para análise histológica e, quando isso ocorre, geralmente trata-se de associações com atresia ou com lesões que tornaram parte do intestino inviável.

Uma valiosa fonte de informação foram as pesquisas de Tibboel *et al.*^{18, 19, 20} que apresentaram em alguns trabalhos uma análise detalhada de fetos com gastrosquise originados de abortos. Estudando esses fetos, os autores puderam concluir que o defeito que origina uma gastrosquise deve ocor-

rer precocemente na formação do embrião, ao redor da 6^a a 8^a semanas. Observaram ainda que fetos com menos de 30 semanas de idade gestacional não apresentavam sinais de lesão intestinal, como fibrose ou edema, características da gastrosquise, tendo tais alterações sido verificadas somente em fetos com mais de 33 semanas. Essas observações suportaram a hipótese levantada por Tibboel *et al.* de que as alterações do intestino estavam relacionadas ao início do funcionamento renal pleno e ao aumento da urina fetal no líquido amniótico. A idéia foi compartilhada com alguns outros autores, como Lopez de Torre *et al.*^{71, 72}, que demonstraram ser a gastrosquise uma espécie de diálise peritoneal intra-útero na qual trocas entre o líquido amniótico e o plasma se efetuam através do peritônio, levando a uma certa desidratação hipercalêmica. Essas mesmas trocas seriam a gênese da hipalbuminemia, da hipogamaglobulinemia e da diminuição dos níveis séricos de transferrina nos recém-nascidos com gastrosquise⁷³. A hipótese de que a urina fetal seria o agente causal do dano ao intestino foi posteriormente questionada por estudos mais aprofundados^{28, 31, 74} como veremos a seguir.

Albert *et al.*⁷⁵, em em 1993, criaram um modelo experimental para confirmar o efeito do líquido amniótico sobre as alças intestinais. Utilizando coelhas prenhas, criaram, cirurgicamente, um feto com a metade posterior do corpo para fora do útero (feto extra-amniótico). A conclusão do estudo foi que o intestino da gastrosquise na ausência de líquido amniótico não desenvolvia as alterações de espessamento e inflamação que se observam quando em contato com o líquido.

Com a intenção de provar que os dejetos urinários estavam envolvidos, Klück *et al.*¹⁶ desenvolveram um experimento com embriões de galinha, aproveitando a característica desse animal de apresentar um saco alantóide isolado do líquido amniótico onde são depositados seus dejetos. Até o 5º dia embrionário, é possível criar uma gastrosquise no embrião de galinha sem misturar o líquido amniótico com os dejetos do alantóide, criando assim um modelo de gastrosquise no qual o intestino está somente embebido em líquido amniótico, enquanto, a partir do 7º dia de desenvolvimento embrionário, a criação de uma gastrosquise só é possível através da abertura do alantóide e mistura de líquidos, criando um líquido amniótico que se assemelha ao humano. Com esse modelo, os autores mostraram que os achados histológicos de espessamento intestinal só estavam presentes no grupo em que se misturava o líquido. Acreditavam ter confirmado, assim, a hipótese de que a urina estaria envolvida na lesão intestinal.

Em 1998, Aktug *et al.*²⁸ realizaram um estudo semelhante utilizando o mesmo animal. Através da troca de líquido amniótico e do estudo bioquímico do líquido trocado, foi possível demonstrar que com esse procedimento se promovia uma diminuição de dejetos intestinais no líquido (ácidos biliares e bilirrubina), mas não a diminuição de dejetos urinários (uréia e creatinina), provavelmente pela sua produção relativamente rápida. Nos embriões em que se realizou a troca de líquido amniótico (diminuindo os dejetos intestinais) a lesão intestinal foi muito menor. Esse fato, associado às comprovações de que fetos, mesmo fora de situações de estresse, evacuam “fisiologicamente” pequenas quantidades de mecônio no líquido amniótico^{76, 77, 78},

consolidou a idéia de que seriam os dejetos intestinais e não os urinários os promotores do espessamento e da inflamação intestinal.

Olgumer *et al.*³¹, em outro importante estudo do grupo da Turquia, realizaram um experimento no qual, utilizando embriões de galinha no 5º dia de desenvolvimento embrionário, criaram gastrosquise sem abrir o saco alantóide, ou seja, mantendo o líquido amniótico livre de dejetos próprios do embrião e instilaram urina e mecônio de recém-nascidos humanos no líquido amniótico dos embriões. Ao contrário dos embriões que receberam urina de recém-nascidos, os que receberam mecônio apresentaram espessamento, inflamação e depósitos de fibrina e colágeno na serosa, alterações descritas na gastrosquise humanas. Com esse trabalho os autores reforçaram a idéia de que são os dejetos intestinais os causadores da lesão do intestino da gastrosquise.

Em outro estudo realizado no Reino Unido, Morrison *et al.*⁷⁹ analisaram amostras de líquido amniótico no final da gestação de 10 mães que apresentavam fetos com gastrosquise, comparando-as com líquido amniótico de gestações normais. O interesse desse estudo foi avaliar a presença de mediadores de inflamação. A análise microscópica do líquido de mães de bebês com gastrosquise mostrou a presença de um exsudato inflamatório composto predominantemente por polimorfonucleares. Essas células inflamatórias não estavam presentes no líquido amniótico dos controles. Da mesma forma, observou-se que havia aumento do antígeno celular CD15 e, nessas células, aumento dos níveis de CD11b, quando comparados com os controles. A elevação de CD11b na população de células CD15 revela que as células

derivadas do líquido amniótico estavam em pleno estado ativado. Mas, a partir desses achados, como identificar quem produziu as células inflamatórias, se a mãe ou o feto? Para responder a essa pergunta os pesquisadores tiparam as células inflamatórias nas gestações com fetos masculinos, comprovando que elas eram provenientes do feto e não da mãe.

Guo *et al.*⁸⁰ apresentaram um estudo experimental de gastrosquise em fetos de coelho, utilizando dexametasona no líquido amniótico, que mostrou menor lesão histológica da parede intestinal e melhor atividade de enzimas digestivas da mucosa, sugerindo o efeito protetor do corticóide como antiinflamatório.

Outro campo de estudo é a influência do óxido nítrico como gênese do dano intestinal na gastrosquise. O óxido nítrico, um poderoso neurotransmissor vital para as funções normais do intestino, é produzido pela enzima óxido nítrico sintase. Anormalidades nessa enzima têm sido apontadas como causa de distúrbios da motilidade intestinal e de malabsorção⁸¹. Dois estudos foram realizados para tentar comprovar a relação entre o óxido nítrico e a lesão do intestino da gastrosquise. O primeiro, em 1996, realizado por Bealer *et al.*⁸¹, no Centro de Tratamento Fetal da Universidade da Califórnia, em São Francisco, utilizou o modelo experimental em coelhos para medir a atividade da enzima óxido nítrico sintase no intestino. Com esse experimento, os autores conseguiram mostrar que existe um aumento na atividade total da enzima no intestino eviscerado.

Em 1999, Dilsiz *et al.*³⁰, utilizando o modelo experimental de embriões de galinha, testaram novamente a hipótese da influência do óxido nítrico no

processo de inflamação da gastrosquise, desta vez utilizando um inibidor da óxido nítrico sintase, o chamado NG-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME). Os investigadores colocaram L-NAME na cavidade âmnio-alantóide de embriões de galinha submetidos ao procedimento para criar uma gastrosquise. Comparando com o grupo controle que não utilizava o bloqueador da enzima óxido nítrico sintase, o grupo com o L-NAME mostrou menor lesão intestinal.

Entretanto, nem todos os pesquisadores estão certos de que o contato com o líquido amniótico seja a origem do problema. Deans *et al.*⁸² relataram cinco casos de gastrosquise acompanhados com ultra-sonografias pré-natais por pelo menos 18 semanas, nos quais os recém-nascidos não apresentavam sinais de espessamento das alças ou *peel*, e concluíram que, apesar da prolongada exposição das alças intestinais, esses casos seriam uma importante evidência de que não há relação entre o tempo de exposição ao líquido amniótico e a lesão intestinal. Da mesma forma, Steinbrecher, Hanna e Burge⁸³ publicaram, em 1996, o relato do caso de um recém-nascido que apresentava uma onfalocele e o intestino no interior do saco mostrava-se semelhante ao intestino da gastrosquise, espessado, endurecido e inflamado. Os autores identificaram pelo menos uma zona de estenose visível e atribuíram os achados ao estreito colo da onfalocele por onde protuíam as alças. Assim, afirmavam ser a constrição do anel o principal efeito sobre as alças intestinais, já que o intestino não havia sido exposto ao líquido amniótico em virtude do saco da onfalocele. Os achados histológicos de congestão, inflamação e fibrose da serosa, atrofia da mucosa e edema e fibrose da submucosa realmente são os encontrados na gastrosquise, mas não há relato da

formação do *peel* nesse caso. Parece haver uma relação entre o contato do líquido amniótico e o depósito de fibrina e colágeno na serosa, como demonstraram Amoury *et al.*⁸⁴ e Langer *et al.*⁶¹.

Na tentativa de identificar quais fatores estavam relacionados com a lesão intestinal, Langer *et al.*⁶¹ desenvolveram um estudo utilizando um modelo de fetos de ovelha. Os autores submeteram o intestino fetal à constricção por ligadura e ao contato com o líquido amniótico, isoladamente e em associação. O surgimento do *peel* foi observado somente no intestino exposto ao líquido amniótico, com ou sem a constricção do mesentério. Dilatação venosa e de vasos linfáticos, espessamento da camada muscular e alterações da mucosa foram observados em animais onde se utilizou a fita para criar a constricção do mesentério, independentemente de estar ou não exposta ao líquido amniótico. E, tanto no modelo de exposição ao líquido amniótico quanto no modelo de constricção do mesentério, surgiram distúrbios da motilidade intestinal. Com esse estudo, os autores conseguiram isolar os dois fatores, ou seja, a camada fibrosa, *peel*, estaria relacionada à exposição do intestino ao líquido amniótico, as lesões estruturais da parede intestinal estariam ligadas à obstrução crônica ocasionada pela constricção do intestino na parede abdominal. O distúrbio da motilidade intestinal estaria relacionado a ambas.

Santos⁸⁵, através da análise com técnicas histopatológicas especiais, correlacionou, em fetos de coelhos, a hipomotilidade intestinal com alterações na maturação dos neurônios dos plexos mioentéricos da gastrosquise.

Albert *et al.*⁸⁶, em 2001, publicaram um experimento no qual submetiam fetos de coelho a dois tamanhos diferentes de defeito de parede para criar uma gastrosquise (respectivamente 1,5 e 3 vezes o diâmetro do intestino), e os compararam com um grupo controle sem manipulação. O objetivo era avaliar se o anel herniário por onde protuem as alças da gastrosquise teria influência nas modificações observadas no intestino. Não houve diferenças entre os grupos e, desta forma, não foi possível estabelecer uma relação entre a constrição causada pelo anel herniário e as lesões presentes na gastrosquise.

1.7 - Modelos Experimentais de Gastroquise

Gastrosquise pode ocorrer espontaneamente em ratos, coelhos da raça nova zelândia, cães da raça beagle e gatos¹. E é passível de ser induzida em laboratório por uma variedade de agentes como escopolamina e triancinolona em galinhas, antagonistas do estrogênio em cães, 6-mercaptopurina e óxido nítrico em *hamster*, metilmercúrio em patos, aurotiomalato, concavolina e tioglicose ouro em coelhos, benzopirenos, pirabital, hidroxiuréia, raios X, nitrosuréia, cádmio, cisplatina, metilsalicilatos e hipertermia materna em ratos^{1, 87}. Apesar desse grande número de possibilidades, modelos teratogênicos de gastrosquise têm o inconveniente de apresentar baixo índice de sucesso, além de poder gerar anomalias associadas que se constituiriam em fonte de confusão na avaliação de resultados. Existem vários modelos cirúrgicos, em coelhos, ovelhas, ratos e galinhas⁸⁸.

1.7.1 - Modelos Experimentais em Coelho

A primeira vez que coelhos foram utilizados para produzir gastrosquise foi em 1972. O trabalho, apresentado por Sherman *et al.*⁸⁹ na reunião anual da Academia Americana de Pediatria, foi publicado no ano seguinte. Os autores realizaram um procedimento cirúrgico no qual criavam gastrosquise em coelhos da raça nova zelândia. Das 12 ninhadas submetidas ao experimento foram obtidos 37 (88%) de 42 fetos. Os embriões que tiveram o intestino exposto ao líquido amniótico apresentaram um comprimento intestinal menor que os dos outros grupos e maiores alterações histopatológicas, como serosite e enterite severas. Alguns problemas foram observados, como a contaminação freqüente do líquido amniótico por *Pasturella multocida* e o fato de alguns fetos, nos quais se criou gastrosquise, ao final do procedimento apresentarem também o fígado para fora do abdômen, evento que não é comum na gastrosquise.

Aoki, Ohshio e Komi⁹⁰, pesquisadores japoneses, repetindo o procedimento para criar gastrosquise em fetos de coelho muito semelhante ao descrito por Shermann *et al.*⁸⁹, conseguiram demonstrar os achados da gastrosquise, mas com altos índices de mortalidade que variaram de 15% a 56%.

Phillips *et al.*⁹¹, em 1991, apresentaram uma proposta de modificação dos modelos experimentais de Shermann *et al.*⁸⁹ e de Aoki, Ohshio e Komi⁹⁰, com o intuito de aumentar a sobrevivência dos fetos. Para tanto utilizaram os mesmos princípios cirúrgicos básicos, mas agregaram um manuseio mais delicado dos fetos (usando eletrocautério para diminuir sangramentos), ado-

taram o uso profilático de antibióticos e trocaram a anestesia com barbitúricos pelo emprego de halotano com oxigênio, com o que conseguiram um índice de sobrevivência de 82%.

Kubaski⁹², em 1994, repetiu o experimento proposto por Philips *et al.*⁹¹, em 15 fetos de coelho submetidos à cirurgia para criar uma gastrosquise, tendo obtido sucesso em 9 (60%). Os fetos com gastrosquise apresentavam um peso ao nascer menor que os do grupo controle, e alterações histológicas como enterite e serosite foram observadas, porém não foi possível estabelecer diferença entre o grupo gastrosquise e o grupo controle quanto a essas alterações.

Estabelecido o modelo, a literatura médica continua até o momento recebendo importantes contribuições de pesquisadores utilizando este animal em seus experimentos^{75, 80,81,85, 86}.

1.7.2 - Modelos Experimentais em Ovelha

Haller *et al.*⁹³, da Universidade Johns Hopkin, Baltimore, Estados Unidos, aproveitaram sua experiência prévia com cirurgia experimental em ovelhas para produzir intra-útero a coartação da aorta e, em 1974, publicaram o primeiro relato do modelo experimental de gastrosquise em ovelhas. Foram operados 31 fetos, com uma sobrevivência de 19 (61%). O interessante desse modelo foi o prolongado período gestacional (145 dias), o que permitiu expor o intestino da gastrosquise durante 10 a 30 dias ao líquido amniótico. Novamente as alterações mais marcantes, como edema, serosite e formação de

peel, foram notadas no grupo com maior tempo de exposição. Um achado interessante desse estudo foram alterações nas células ganglionares do intestino, consistindo em atrofia e diminuição da quantidade de acetilesterase e acetilcolinesterase. Os autores relacionaram a essas alterações os distúrbios da peristalse típicos das crianças operadas por gastrosquise, porém a maioria dos trabalhos desenvolvidos nos anos seguintes não conseguiram reproduzir esse achado^{18, 19, 20, 92}.

O modelo descrito por Haller *et al.*⁹³ foi adotado pela equipe de pesquisadores do Programa de Tratamento Fetal da Universidade da Califórnia, São Francisco, Estados Unidos, chefiado pelo Dr. Michael Harrison. Esse grupo, um dos mais expressivos no estudo de Medicina Fetal na atualidade, publicou três importantes artigos, compondo uma série denominada *Etiologia da Lesão Intestinal na Gastrosquise*^{61, 68, 94}.

1.7.3 - Modelos Experimentais de Gastrosquise em Rato

Correia-Pinto *et al.*⁹⁵ apresentaram, em 2001, um novo modelo experimental para gastrosquise, desta vez em ratos. Utilizando ratos da raça Wistar, criaram a gastrosquise através de cirurgia fetal, por abertura do útero e da parede abdominal dos fetos com exposição do intestino. Na análise dos resultados, os autores demonstraram fetos com gastrosquise com peso corporal, peso do intestino e comprimento do intestino menores que os dos controles. Na avaliação histológica, o intestino exposto apresentava-se edematoso, com achatamento das vilosidades, dilatação venosa e linfática, mas

sem infiltrado inflamatório. Os autores acreditam serem as principais vantagens do modelo o curto período gestacional, o extenso conhecimento a respeito da anatomia, embriologia e histologia dos ratos, a necessidade de pouco material cirúrgico, a facilidade de criação do animal, a grande quantidade de fetos por ninhada e, principalmente, a grande disponibilidade de marcadores e reagentes para análise de DNA em ratos, capaz de permitir a utilização do modelo em pesquisas a nível molecular.

Em outro estudo, Ferreira *et al.*⁷⁴ utilizaram ratos adultos para mimetizar, através de injeção intraperitoneal, os efeitos da urina e do mecônio nas alças intestinais. Conseguiram desta forma demonstrar a importância dos dejetos intestinais na lesão da gastrosquise e reproduzir graus variados de lesão.

1.7.4 - Modelos Experimentais em Galinha

1.7.4.1 A Incubação de Embriões de Galinha

Para a realização desta pesquisa, fez-se necessário conhecer melhor os princípios e práticas de incubação de ovos de galinha, o que foi obtido através do estudo dos manuais de criação de aves^{96, 97, 98, 99}.

Para se obterem bons resultados, o ideal é que os ovos tenham a casca íntegra e limpa e sejam normais em todos os seus aspectos. Os ovos de galinha pesam em média 60 g^{96, 98}. Algumas características individuais dos ovos podem influenciar na sua capacidade de eclodir; são elas: o tamanho, a qualidade do seu interior, a qualidade da casca e a idade. Para o desenvolvi-

mento da pesquisa os ovos foram selecionados de acordo com esses critérios. Morris *et al.*⁹⁸, em 1968, estudaram o percentual de fertilidade e eclosão de acordo com o peso do ovo. Ovos de 44 g tiveram 81% de fertilidade e 51% de eclosão, já os de 58 g tiveram 91% de fertilidade e 74,5% de eclosão. O peso médio do pinto ao nascer e o percentual sobre o peso do ovo também foram estudados, sendo a média e o percentual, respectivamente, de 34 g e 66,8% do peso do ovo.

Ao colocar os ovos na incubadora, procura-se manter a extremidade mais larga para cima, para que o embrião não se desenvolva com a cabeça voltada para a cavidade mais estreita, desprovida da câmara de ar⁹⁷. A posição do ovo é importante na medida em que, se a câmara de ar não estiver presente na extremidade em que está a cabeça do embrião, este poderá morrer de asfixia quando iniciar a respiração pulmonar, ao redor do 20º dia de incubação. Da mesma forma, o processo de perfuração da casca não se completa na extremidade mais estreita do ovo, por não haver espaço suficiente para o embrião mover a cabeça em várias direções⁹⁶.

O controle da temperatura é um item importante no desenvolvimento do experimento. As incubadoras automáticas com ventilação forçada ou com ventiladores de circulação de ar devem manter uma temperatura ao redor dos 37,5º C; nas incubadoras de ar parado, naquelas em que nenhum ventilador ou nenhuma corrente de ar se move dentro delas, a temperatura deve ser mais elevada, ao redor de 38 a 39,5º C. Flutuações na temperatura alteram seriamente o processo de crescimento e desenvolvimento do embrião. Baixas temperaturas atrasam a eclosão, enquanto temperaturas de incuba-

ção elevadas fazem o pinto eclodir antes dos 21 dias. Apesar de o embrião ser relativamente resistente a períodos curtos de exposição a baixas temperaturas, ele é muito sensível a altas temperaturas⁹⁶.

A umidade contida no ar da incubadora é muito importante para o desenvolvimento normal e conseqüente eclosão do ovo. A manutenção de uma umidade relativa de aproximadamente 65% previne, sob condições normais, uma perda excessiva de umidade dos ovos⁹⁹. Em incubadoras pequenas, onde a viragem manual e individual dos ovos é realizada com a abertura da máquina, a cada vez que a máquina é aberta ocorre uma perda muito rápida de umidade. Apesar de a água estar presente na incubadora, a recuperação da umidade envolve considerável retirada de água do interior dos ovos. Incubadoras pequenas podem necessitar de um borrifamento de água morna a cada abertura para viragem. Nesta pesquisa foi mantida a umidade relativa ao redor de 80%, graças à colocação de água quente no reservatório específico da incubadora⁹⁶.

Com respeito à viragem, ela têm por finalidade prevenir a aderência do embrião na casca. Os manuais de criação aconselham virar os ovos pelo menos 5 vezes ao dia. As incubadoras grandes mantêm os ovos em uma posição de 45° e procedem à viragem automática e regular dos ovos. Esse procedimento deve ser realizado durante todo o período de incubação e interrompido 3 dias antes da eclosão^{96, 99}.

As incubadoras devem fornecer uma troca de ar contínua para remover o dióxido de carbono produzido pela respiração do embrião e fornecer oxigê-

nio. Outro aspecto importante é a manutenção da limpeza e desinfecção da incubadora a fim de evitar contaminações no procedimento.

1.7.4.2 - A Embriologia da Ave

As espécies aviárias com sua reprodução sexuada peculiar, na qual o feto se desenvolve fora da mãe, oferecem um sistema excelente para estudo da embriologia. Grande parte do processo de desenvolvimento que ocorre no embrião aviário pode ser diretamente relacionado com o processo de desenvolvimento comum a muitos outros animais, mas que não pode ser tão facilmente estudado como no embrião de aves.

Nas aves, a primeira divisão celular começa aproximadamente 3 horas após a fertilização, quando a gema chega ao istmo do oviduto⁹⁶, o que corresponderia em humanos ao período de 24 horas após a fecundação⁴⁹. A primeira diferenciação da camada celular ocorre no útero imediatamente antes de o ovo ser posto; esse processo é denominado de gastrulação^{96, 100}. Após a postura do ovo fértil, a divisão celular e a diferenciação continuam sempre que o ovo for mantido em uma temperatura acima de 27° C, de preferência ao redor de 37,5° C⁹⁶.

Durante o primeiro dia de incubação desenvolve-se todo o ectoderma primitivo, ou seja, o canal neural¹⁰⁰. O tecido do trato digestivo anterior estará diferenciado em 24 horas de incubação, assim como as células sexuais primárias^{96, 100, 101}.

Durante o segundo dia de incubação a partir da divisão das células primárias, surgem o cérebro, os olhos e os ouvidos, e são formados os extratos da cauda e do sistema vascular. Esse estágio corresponde no homem a aproximadamente 3 a 4 semanas de desenvolvimento embriônico⁴⁹. No segundo dia de incubação também inicia-se a formação do coração do embrião e durante o 4^o ou 5^o dia o coração estará completamente desenvolvido. Durante o 3^o dia de incubação formam-se os membros e o esôfago. No 4^o dia o ovo embrionado de galinha equivale a 2 meses de gestação humana⁴⁹. No 5^o dia pode-se observar a formação dos pulmões, da traquéia, do esôfago, do fígado, do pró-ventrículo, da moela, do pâncreas e dos órgãos sexuais¹⁰⁰.¹⁰¹. Durante esse dia o embrião de galinha tem uma aparência semelhante à dos embriões de muitos outros animais em estágio de desenvolvimento equivalente. No 6^o dia de incubação o embrião torna-se visivelmente diferenciado do de outros animais. As divisões estruturais iniciam a formar as asas e as pernas. A alça duodenal forma-se e o intestino delgado protui pelo anel para dentro do cordão umbilical. Os primeiros movimentos voluntários aparecem no 6^o dia. No 7^o dia o bico típico das aves surge, o intestino começa a ganhar volume e prolonga-se ocupando o interior do cordão umbilical, em seguida o abdômen torna-se mais proeminente. No 8^o dia começam a surgir os folículos das penas sobre a pele e no 9^o o contorno é típico de uma ave. No 12^o dia tem início o surgimento da penugem, e as penas são visíveis no 13^o dia. Até o 14^o dia o embrião permanece perpendicular ao eixo longitudinal do ovo, mas, a partir desse estágio, torna-se muito longo para essa posição e deve girar paralelamente para melhor acomodar-se. No 15^o dia o

abdômen começa a envolver o intestino delgado que habitava o cordão umbilical e no 16^o dia as escamas e as unhas estão mais duras e a albumina está toda consumida. Durante o 17^o dia o embrião inicia sua preparação final para eclodir. O líquido amniótico é absorvido, apesar de o âmnio ainda estar aderido ao embrião emplumado e úmido, e o intestino, que estava herniado no cordão umbilical, retornará para o abdômen. O embrião ocupa nesse momento quase todo o espaço no ovo. No 18^o dia o conteúdo restante da gema começa a entrar para o abdômen do embrião através da retração do saco da gema pela abertura umbilical essa retração perdura até o 19^o dia, e a abertura umbilical não estará completamente fechada antes da eclosão. Durante o 19^o dia o bico apresenta um capuz pontiagudo chamado dente do ovo, que perfura a câmara de ar, tendo início a respiração pulmonar. No 20^o dia começam a diminuir a respiração e a circulação pela membrana corioalantóide, as quais finalmente, cessam. É essencial que esta membrana esteja avascular no momento da eclosão para que não ocorram hemorragias. No 21^o dia ocorre a eclosão^{96, 101}.

No estudo da interação entre o líquido amniótico e as alças intestinais extrusas da gastrosquise, um aspecto importante é o reconhecimento das membranas que recobrem o embrião de galinha, sua disposição e suas funções. Quatro são as membranas encontradas no interior do ovo: saco da gema, âmnio, córion e alantóide (figura 4).

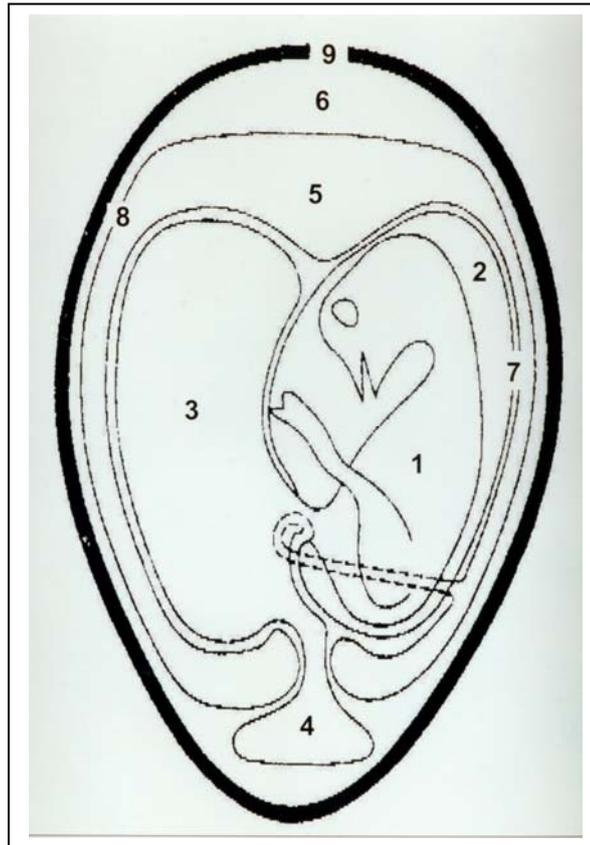


Fig. 4 - O embrião de galinha e sua relação com as membranas extra-embrionárias. (1) Embrião, (2) Cavidade amniótica - âmnio, (3) Gema - saco da gema, (4) Albumina, (5) Cavidade alantóide - membrana alantóide, (6) Câmara de ar, (7) Membrana amnioalantóide, (8) Membrana corioalantóide, (9) Casca do ovo - membrana do ovo (modificado de Molenaar, Meijers e Tibboel¹⁰⁰)

O **saco da gema** tem algumas características peculiares relacionadas com a sua função. Ele é uma membrana vascularizada. As ilhotas de sangue se desenvolvem a partir da sua camada externa. A camada interna se diferencia em células epiteliais glandulares que secretam enzimas digestivas que digerem os nutrientes da gema, e em outras células que absorvem esses nutrientes digeridos e os transportam para o sistema sanguíneo. O sistema vascular do saco da gema é contínuo ao do embrião, levando assim nutrientes importantes da gema para alimentar o embrião em crescimento⁹⁶.

Uma segunda membrana extra-embriônica, o **âmnio**, que começa a se formar no 2^o dia de incubação, é uma membrana transparente avascular que cresce sobre e através do embrião, envolvendo-o completamente. Aos 3,5 dias de incubação o embrião está totalmente envolvido por ele. O âmnio é preenchido por um líquido claro e incolor, no qual o embrião se encontra imerso. Esse líquido permite que o embrião se mova naturalmente, enquanto se protege de forças externas excessivas, portanto sua função é análoga à do líquido amniótico nos humanos⁴⁹. Retornando ao 2^o dia de incubação, o **córion** é formado com o âmnio a partir de uma dobra próxima da cabeça. No entanto, ao invés de crescer envolvendo diretamente o embrião, como faz o âmnio, o córion forma um grande saco, semelhante a uma bolsa, que envolve ambos. O córion surge e vai fundir-se com a membrana interna da casca do ovo. Mais tarde, no 3^o dia de incubação, na região abdominal do embrião, uma nova membrana brota como um balão e, à medida que cresce para fora do embrião, ocupa o espaço entre o córion e o âmnio; essa membrana é o **alantóide**. O alantóide desenvolve um sistema sangüíneo altamente vascularizado que se prolonga com o embrião. Ele continua a se expandir no interior do córion em desenvolvimento e, no 7^o dia de incubação, se une ao córion, formando a membrana corioalantóide, a qual tem uma superfície de contato com a casca e com a albumina do ovo, importante para a função digestiva do alantóide. A membrana alantóide secreta enzimas que digerem a albumina. Os nutrientes digeridos a partir da albumina bem como o cálcio da casca do ovo são absorvidos pelo sistema capilar do alantóide e transportados ao embrião em desenvolvimento. O alantóide efetua duas funções adi-

cionais igualmente importantes: ele recebe os produtos da excreção metabólica dos rins do embrião, retirando-os do sangue e depositando-os na cavidade do ovo^{16, 96, 100}, e colabora com a respiração embriônica, antes de ocorrer o desenvolvimento funcional do pulmão, captando oxigênio dos poros da casca. O sistema capilar sangüíneo do alantóide fortemente aderido à casca através do córion absorverá oxigênio e liberará dióxido de carbono, que será eliminado pelos poros da casca. Portanto ele funciona como um pulmão embriônico temporário⁹⁶.

O saco alantóide dá ao embrião de galinha uma característica peculiar, ele é o depósito das excretas do embrião. Portanto, no embrião de galinha, as excretas urinárias e intestinais não se misturam com o líquido amniótico, como acontece em humanos. Nos estágios iniciais de desenvolvimento, ou seja, até o 6º dia embrionário, o saco alantóide é pequeno, sendo relativamente fácil abordar o embrião sem abri-lo. Porém, a partir do 7º dia, a abordagem da membrana amniótica, do cordão umbilical e do embrião só é possível através da abertura do saco alantóide. Isto proporcionou aos pesquisadores a possibilidade de criar gastrosquise em que o intestino fosse banhado por líquido amniótico com e sem dejetos urinários e intestinais¹⁶, de acordo com o momento do no qual se realiza o experimento.

1.7.4.3 - O Embrião de Galinha como Modelo Experimental

O primeiro relato do uso do embrião de galinha como modelo experimental em cirurgia pediátrica encontra-se no trabalho de Earlam³⁸, datado

de 1972 e publicado nos Anais do Colégio Real de Cirurgiões da Inglaterra. Nesse estudo, através da abertura no ovo, o autor provocava lesão no mesentério a fim de desenvolver atresia e estenose intestinais. Earlam utilizou 160 ovos no 14^o dia de desenvolvimento e em 38 provocou a lesão dos vasos mesentéricos: 5 (13%) embriões desse grupo sobreviveram e 3 (8%) apresentaram estenose intestinal.

O trabalho de Earlam³⁸ serviu de base para Tibboel, Molenaar e Van Nie¹⁷, em 1979, darem início à utilização ampla desse modelo animal. Em seu artigo inicial denominado *Novas perspectivas em cirurgia fetal: o embrião de galinha*, os autores utilizaram 1372 embriões para desenvolver um estudo que ia desde a simples dissecação para familiarizar-se com o animal até a criação de um modelo de peritonite meconial (através da perfuração de uma alça intestinal do embrião) e de outro de atresia intestinal (através da lesão dos vasos do mesentério).

Para testar separadamente os efeitos da hipóxia generalizada e da isquemia localizada sobre o intestino, Tibboel, Van Nie e Molenaar²⁶ em 1980, utilizaram novamente o modelo de embrião de galinha. Nesse segundo estudo, submeteram um grupo de ovos a um ambiente com moderada e severa hipóxia e, em outro grupo, repetiram o experimento de ligadura do mesentério com fio de sutura, para criar uma isquemia mesentérica localizada e temporária. No grupo submetido a hipóxia, os embriões nasceram com lesões intestinais semelhantes às observadas na enterocolite necrosante; em contrapartida, os embriões submetidos a isquemia localizada do mesentério apresentaram tipos variados de atresia intestinal.

Nos anos seguintes o embrião de galinha foi utilizado como modelo experimental para várias doenças. A tabela 4 apresenta alguns desses experimentos.

Tabela 4 - O embrião de galinha como modelo experimental para outras patologias que não a gastrosquise

Doença	Autor/ Ano	Experimento	Objetivo	Sobrevida ao Experimento
Estudo da diferenciação sexual	Hutson ¹⁰² , 1984	Enxerto de ductos de Muller no peritônio entre embriões de galinha	Estudar o papel da morte celular programada nos mecanismos de regressão dos ductos de Muller	18% a 43%*
Atresia de esôfago	Kleckner ¹⁰³ , 1984	Sutura colocada no pólo cranial obrigando o embrião a assumir uma postura de hiperflexão da cabeça	Produzir atresia de esôfago (sem sucesso)	34% a 51%*
	Kluth ¹⁰⁴ , 1987	Preparação e análise através de microscopia eletrônica do intestino anterior de embriões de galinha em diversas fases do desenvolvimento	Estudar a formação e separação do esôfago e traquéia	–
Doença de Hirschsprung	Meijers ²⁴ , 1987	Demarcação de células nervosas com H ³ timidina	Analisar a migração de células nervosas	–
	Meijers ²³ , 1989	Transecção do intestino do embrião em diversas fases do desenvolvimento	Desenvolver um modelo experimental para estudo da doença de Hirschsprung	–
	Meijers ²² , 1992	Culturas de intestino de embriões de galinha	Estudar a colonização do intestino por células nervosas	–
Atresia intestinal e peritonite meconial	Tibboel ²⁵ , 1989	Lesão de vasos do mesentério e perfuração de alças do embrião	Testar a hipótese vascular das atresias intestinais e provocar contato do mecônio com o peritônio fetal	82% 78%
Atresia intestinal	Tovar ¹⁰⁵ , 1991	Coagulação de vasos do mesentério para criar atresia intestinal	Estudar através de microscopia eletrônica as atresias intestinais	19,4%
Meningomielocele	Olgumer ¹⁰⁶ , 2001	Modelo experimental de meningomielocele em embriões de galinha	Testar a troca de líquido amniótico como forma de diminuir a lesão medular	–

* Valores variáveis em virtude de o estudo ter utilizado embriões em diferentes fases de desenvolvimento

Klück *et al.*¹⁶, em 1983, publicaram o primeiro estudo com o modelo experimental de gastrosquise em embriões de galinha. Foram utilizados 999 embriões com uma sobrevivência global de 32%, mas com apenas 6% de sucesso no desenvolvimento de uma gastrosquise. Os autores conseguiram reproduzir os achados histológicos do intestino de gastrosquise e ainda levantaram a hipótese de que seria a urina fetal a causadora das alterações.

Em 1987 e 1989, Gheri e Bryk^{107, 108} apresentaram dois importantes estudos sobre o desenvolvimento do intestino delgado de embriões de galinha. Através de análise morfométrica digital, realizaram medidas de área e de espessura do duodeno e do íleo de embriões de galinha normais em diferentes dias de desenvolvimento. A pesquisa tem sua importância concentrada no fato de que, apesar de ser um modelo experimental, hoje consagrado, poucos artigos estão disponíveis a respeito da embriologia e da histologia normais. Os estudos mostraram que é possível calcular o índice de encurtamento dos espécimes de intestino de embriões de galinha submetidos à preparação histológica, que se situa ao redor de 13% em média, e forneceram importantes tabelas a respeito da espessura e da área da parede intestinal normal nesse modelo.

O embrião de galinha serviu também como modelo experimental na tentativa de testar as hipóteses de origem da gastrosquise. Aktug *et al.*¹⁵ realizaram um experimento no qual embriões de galinha no 13º dia de desenvolvimento embrionário eram submetidos à criação de uma gastrosquise através de dois métodos distintos. Um grupo tinha o defeito criado na parede abdominal (DPA) e o outro grupo no coto umbilical (DU). A sobrevivência dos

embriões ao experimento foi de 40% no grupo DPA e de 87% no grupo com DU, sendo que metade dos embriões vivos no grupo de DPA apresentava-se sem gastrosquise e com cicatrização do defeito. Na análise do defeito e das alças intestinais extrusas, os autores constataram que, no grupo DPA, havia um firme anel nas bordas e o intestino se apresentava com características hemorrágicas. Já no grupo DU as alterações macroscópicas e microscópicas, como edema, formação de *peel* e espessamento de parede, eram mais compatíveis com as observadas na gastrosquise. Seria esta uma comprovação da teoria de que a ruptura do cordão umbilical daria origem à gastrosquise.

Apesar de a maioria dos pesquisadores dar preferência a modelos de mamíferos quando realizam estudos do trato gastrointestinal e das malformações congênitas, alegando que a embriogênese dos mamíferos é semelhante, o desenvolvimento dos embriões de galinha pode ser comparado ao de humanos em alguns pontos. A peristalse nos embriões humanos inicia no segundo trimestre da gestação, o mesmo se aplicando à produção de bile e à deglutição de líquido amniótico pelo feto. A literatura relata que, da mesma forma, o embrião de galinha inicia a deglutição e a peristalse e passa a produzir a bile ao redor do 16^o dia de incubação¹⁷.

1.7.4.4 - O Embrião de Galinha e as Técnicas de Troca de Líquido Amniótico

No âmbito das pesquisas da influência do líquido amniótico na gênese da lesão da gastrosquise, o embrião de galinha foi o animal de experimen-

tação preferido para estudos que avaliavam os mecanismos de inflamação, como mediadores inflamatórios⁷⁹, óxido nítrico³⁰ e efeito do mecônio e da urina³¹ sobre as alças. A partir desses experimentos surgiu a idéia de “purificar” o líquido amniótico dos fatores agressores ao intestino, promovendo sua diluição.

Em 1995, Aktug *et al.*¹⁴ publicaram os resultados do primeiro experimento que utilizou a troca de líquido amniótico. No modelo de embrião de galinha, diluíram o líquido amniótico em uma solução fisiológica e, ao final do experimento, observaram menor lesão das alças submetidas à troca, tanto macro como microscopicamente.

Um ano depois, Dommergues *et al.*³⁹ publicaram o primeiro relato de infusão de solução fisiológica na cavidade amniótica em fetos humanos com gastrosquise. Esses pesquisadores franceses aproveitaram dois casos de gestações com fetos com gastrosquise e oligodrâmnios para propor amniotinfusão, com o intuito de diminuir os efeitos lesivos da ausência de líquido amniótico, tendo observado uma melhora no aspecto macroscópico do intestino da gastrosquise. Sapin *et al.*¹⁰⁹, aproveitando a experiência de Dommergues *et al.*³⁹, adotaram o mesmo procedimento com outros dois fetos com gastrosquise e oligodramnia, obtendo também bons resultados. Mas foi somente em 1998 que Aktug *et al.*²⁹, acumulando a experiência com o modelo de embrião de galinha, realizaram a troca de líquido amniótico por uma solução salina fisiológica em uma gestação de um feto com gastrosquise e sem oligodrâmnio. Ao nascer, a criança apresentava mínimo edema de alças, o que possibilitou o fechamento fascial sem dificuldade e com início da

via oral no 5º dia e alta hospitalar no 8º dia, o que não é o habitual nos casos de gastrosquise.

Luton *et al.*¹¹⁰ apresentaram o primeiro estudo comparando gestações de gastrosquise com e sem troca de líquido amniótico (10 casos em cada grupo). Como resultado houve uma melhor evolução clínica dos pacientes submetidos à troca de líquido amniótico, porém ensaios clínicos com um número maior de pacientes são necessários.

Simultaneamente os estudos foram sendo aprofundados e, com o objetivo de testar duas diferentes soluções para troca de líquido amniótico na gastrosquise, Aktug *et al.*²⁷, em 1998, utilizaram o embrião de galinha como modelo experimental, trocando líquido por uma solução fisiológica, e em outro grupo, uma solução hiperosmolar com glicose. Novamente os melhores resultados foram obtidos com a troca de líquido pela solução fisiológica. Os autores concluíram ser a simples diluição do líquido o fator determinante da melhora das alças intestinais. No mesmo ano esses pesquisadores publicaram um artigo complementar²⁸ ao anterior no qual realizavam a análise do líquido amniótico pós-troca, tendo descoberto que ocorria uma importante diminuição dos dejetos intestinais (ácidos biliares e bilirrubina), ao contrário dos urinários, que não se alteravam. Assim, a melhora no aspecto do intestino após a troca de líquido amniótico por uma solução fisiológica muito provavelmente se devia à eliminação de dejetos intestinais, não urinários, determinando, desta forma, uma correção às conclusões do primeiro artigo¹⁴.

Recentemente, Kanmaz *et al.*¹¹¹ utilizaram o modelo de gastrosquise em embriões de galinha para testar a alcalinização do líquido amniótico com

bons resultados na diminuição da lesão intestinal, podendo ser esta uma alternativa à troca de líquido, mais simples de ser executada.

———— 2 - OBJETIVOS ————

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

- Reproduzir o modelo experimental da gastrosquise em embriões de galinha.

2.2 - Objetivos Específicos

- Determinar as taxas de sobrevivência dos embriões ao experimento.
- Avaliar o aumento ponderal dos embriões.
- Analisar, à microscopia ótica, as alterações histológicas do intestino dos embriões.
- Utilizar técnicas de morfometria digital para medir a espessura da parede intestinal dos embriões.
- Comparar as diferenças entre o intestino exposto ao líquido amniótico e o intestino não-exposto.
- Determinar se o modelo desenvolvido apresenta as alterações observadas na gastrosquise.

———— 3 - MATERIAL E MÉTODO ————

3 - MATERIAL E MÉTODO

3.1 - Delineamento da Pesquisa

Este estudo foi do tipo experimental, randomizado, contemporâneo, cego e controlado.

3.2 - Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Biotério e Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

3.3 - Estudo Piloto

Visando adquirir experiência com a estrutura do ovo de galinha e com a anatomia do embrião, realizou-se a exploração e dissecação de 14 ovos, estudando-se a disposição das membranas embrionárias, a estrutura do cordão umbilical com as alças intestinais em seu interior e a distribuição do líquido amniótico (figura 5).

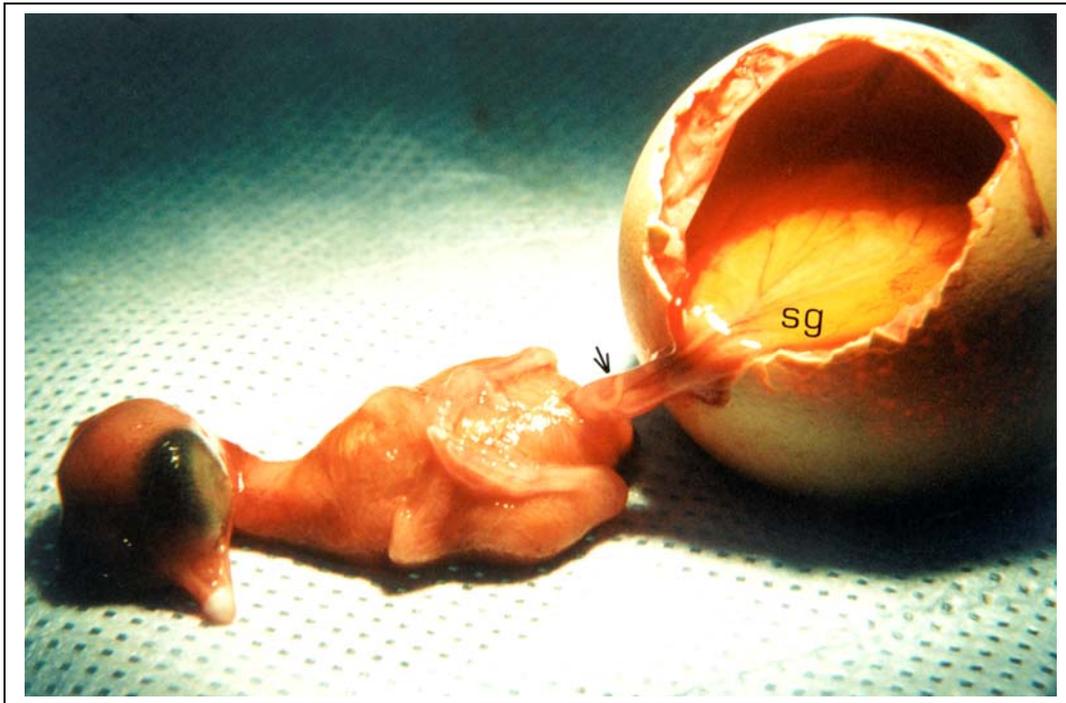


Fig. 5 - Embrião de 13 dias de desenvolvimento. Notar o cordão umbilical com as alças intestinais no seu interior (seta) e o saco da gema (sg)

Com o objetivo de verificar a viabilidade do experimento, adquirir familiaridade com o diagnóstico dos ovos fecundados e não-fecundados, desenvolver a técnica e escolher o melhor momento de criar a gastrosquise, foi realizado um estudo piloto com **90 ovos**, cujos resultados são apresentados a seguir: em 8 ovos foi possível diagnosticar a ausência de embrião através da ovoscopia. A ovoscopia, um procedimento diagnóstico simples e muito utilizado pelos criadores, realiza-se colocando o ovo contra uma fonte de luz com razoável intensidade (em nossa pesquisa utilizamos uma lâmpada de Halogênio – Decostar – Osram® - Germany 500w – 12v); a completa transiluminação do ovo, sem sombras no seu interior, faz o diagnóstico da ausência do embrião, ao passo que os ovos fecundados apresentam uma sombra que

corresponde ao embrião em desenvolvimento (figura 6). Em 10 ovos não se realizou nenhum procedimento, eles foram deixados para nascer, a fim de se confirmar o dia do desenvolvimento embrionário no qual se encontravam os ovos da mesma série.

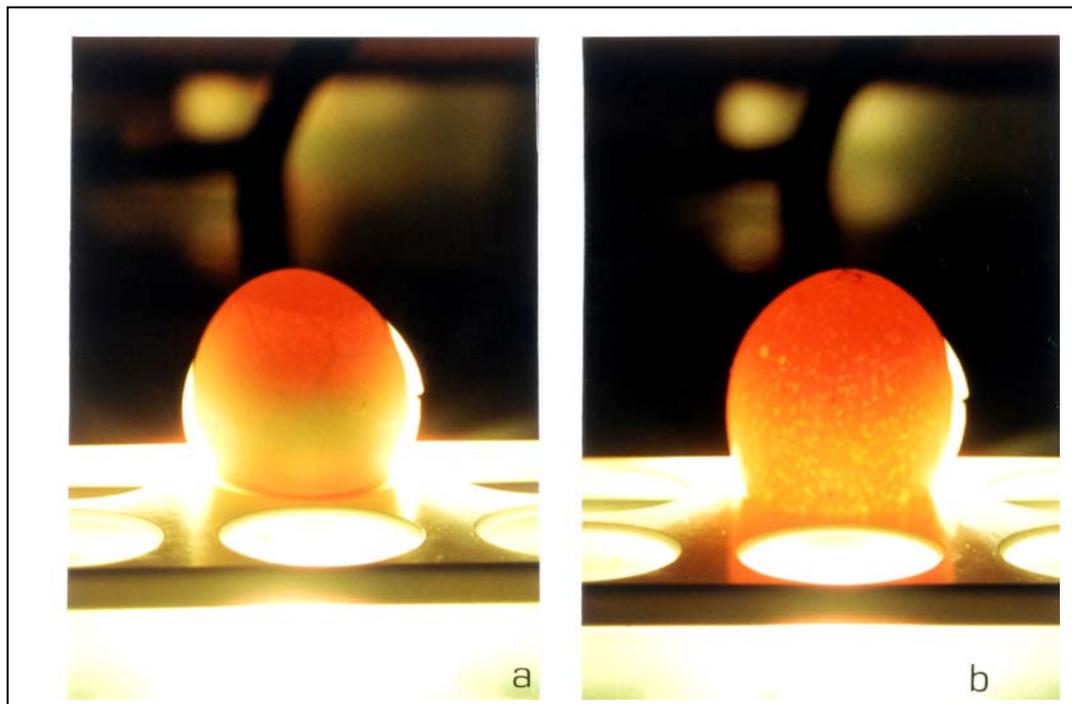


Fig. 6 - Transiluminação evidenciando o ovo fecundado (a) e não fecundado (b)

Foram selecionados para o procedimento piloto de criação da gastrosquise 72 ovos. Em 59 o procedimento foi feito seguindo as descrições prévias da literatura^{14, 15, 27, 28}. No 19º dia, havia 55 embriões mortos e 4 (7,2%) vivos. Nos restantes 13 (18%) embriões, selecionados para o procedimento, houve algum acidente técnico que impossibilitou a execução. Em 1 caso ocorreu fratura da casca do ovo, em 6 casos, abertura acidental do saco da gema, em 2 casos, sangramento importante das membranas que envolvem o embrião e, em 4 casos, houve lesão do corpo do embrião pelo instrumental cirúrgico.

A partir do estudo piloto optou-se por realizar a pesquisa no 13^o dia embrionário, considerando não só a facilidade propiciada pelo tamanho do embrião como também o fato de que a maioria dos autores dos trabalhos de troca de líquido amniótico desenvolveram seus estudos nessa fase^{14, 15, 27, 28, 112}. Foi constatada também uma extrema dificuldade técnica na manobra de exteriorização do cordão umbilical, quando se utilizavam instrumentos cirúrgicos delicados convencionais, como a pinça de Adson e a pinça hemostática tipo mosquito. A apreensão do corpo do embrião por essas pinças ocasionou variados graus de lesão, indo desde uma escoriação até arrancamento completo de membros, razão pela qual se desenvolveu um instrumento próprio para realização do procedimento que consiste em um gancho, manufaturado a partir de um estilete cirúrgico (figura 7). Com esse gancho foi possível facilmente exteriorizar o cordão umbilical, junto à sua implantação no corpo do embrião, e não foram mais observadas lesões tipo arrancamento.

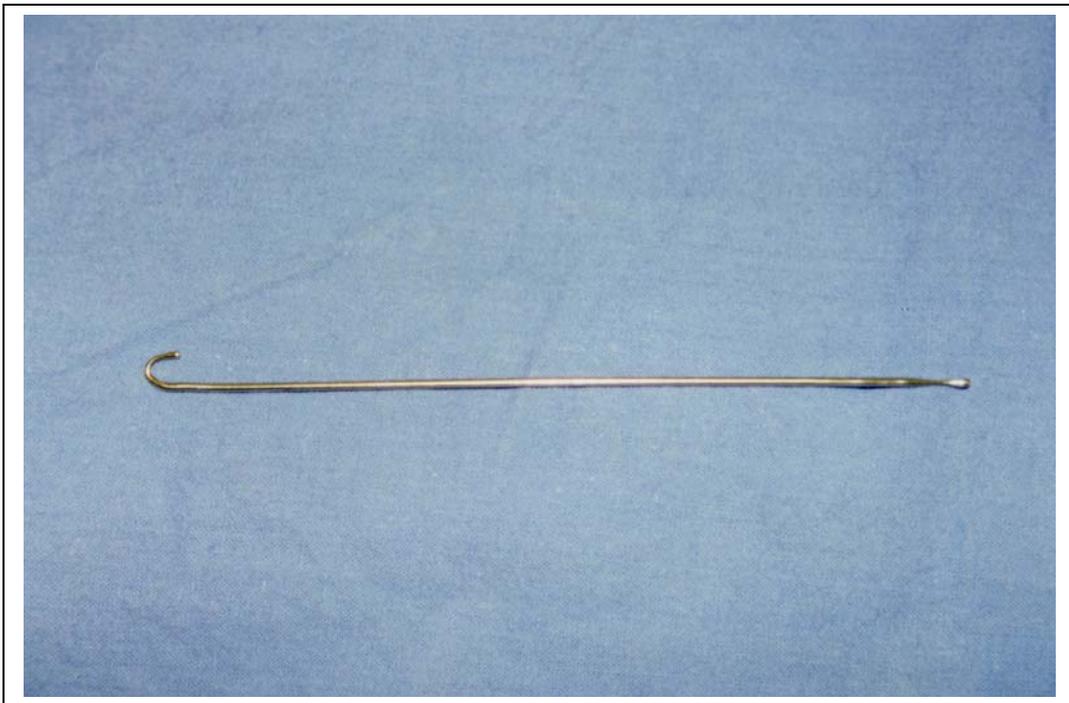


Fig. 7 - Gancho manufaturado a partir de um estilete cirúrgico, utilizado para identificar e trazer para fora o cordão umbilical, diminuindo o risco de lesão do embrião

3.4 - Amostra

3.4.1 - Critérios de Inclusão

Foram utilizados na pesquisa 278 ovos fecundados de galinha da raça Leghorn (*Gallus domesticus*), fornecidos por um mesmo incubatório e procedentes de diversos criadores da região nordeste do Rio Grande do Sul.

O ovos foram selecionados por veterinário especialista em criação de aves e levados para o laboratório em uma caixa isolante térmica, a fim de evitar perda de calor durante o transporte. O transporte do incubatório até o laboratório de pesquisa não demorou mais de 10 minutos na maioria das vezes. Os ovos selecionados para o estudo foram retirados do incubatório no 11^o ou 12^o dia de desenvolvimento embrionário para a realização do procedimento no 13^o dia. Na chegada ao laboratório os ovos foram submetidos à ovoscopia: os sem embrião foram excluídos e os ovos com embrião foram identificados com o número do seu protocolo, escrito na casca com lápis preto, pesados e medidos no seu comprimento e largura e as informações registradas no protocolo de pesquisa (Anexo 1).

3.4.2 - Critérios de Exclusão

Foram considerados critérios para exclusão do estudo:

a) ovos nos quais ocorreu algum tipo de acidente no procedimento de criação da gastrosquise, como sangramento abundante do cordão umbilical, lesão com extravasamento do saco da gema, lesão traumática do embrião (laceração ou arrancamento de membros) e fratura da casca do ovo;

b) embriões que, mesmo sendo submetidos ao procedimento de criação de gastrosquise, apresentavam uma regeneração total do coto umbilical, sem exteriorização de vísceras no momento da abertura do ovo no 19^o dia;

c) embriões mortos.

3.4.3 - Grupos

Utilizou-se para análise dos dados a divisão da amostra em 3 grupos:

- **Grupo G (Gastrosquise):** 18 embriões nos quais foi realizado o procedimento cirúrgico para criar uma gastrosquise no 13^o dia de desenvolvimento embrionário e que no final do experimento, no 19^o dia, na abertura do ovo apresentavam-se vivos e com o intestino protuído para fora da cavidade abdominal.

- **Grupo M (Mistura de líquido amniótico e alantóide somente):** 12 embriões nos quais foi realizado o experimento no 13^o dia, consistindo na abertura do orifício na casca e abertura das membranas amniótica e alantóide, promovendo a mistura dos líquidos amniótico e alantóide, mas que diferia do grupo gastrosquise **por não haver** a manipulação do cordão umbilical (sem expor as alças). No 19^o dia os ovos foram abertos, e o coto umbilical de cada animal vivo foi examinado para garantir que não havia vísceras expostas, sendo então abordado. As alças de intestino delgado ali localizadas foram removidas para exame.

- **Grupo C (Controle):** 10 embriões do 19^o dia, trazidos diretamente do incubatório, nos quais nenhum procedimento foi realizado. Os ovos foram abertos e o intestino delgado junto ao anel umbilical foi removido para exame.

3.5 - Método

No laboratório os ovos eram colocados em uma incubadora com sistema de aquecimento através de ar quente circulante, própria para esta finalidade (Hova-Bator® Incubator, Model G.Q.F. Mgf. Co. Savannah, Ga. USA) (figuras 8 e 9), mantidos a uma temperatura de 37,5° C e em um ambiente com 80% de umidade e girados manualmente 1 ou 2 vezes ao dia até o procedimento. A temperatura da incubadora era controlada por 2 termômetros, um termômetro-higrômetro digital (Hygroterm – Kat Nr. 30.5000 – TFA – Germany) com variação de – 10° a + 60° C de temperatura, com divisões de 0,1° C e com variação de 10% a 99% de umidade relativa, com divisões de 1%, e um termômetro a mercúrio, próprio para pequenas incubadoras (Incoterm® - ref. 89345/01), de 25° a 40° C, com divisões de 1° C. A umidade relativa era controlada pelo termômetro-higrômetro digital citado acima.

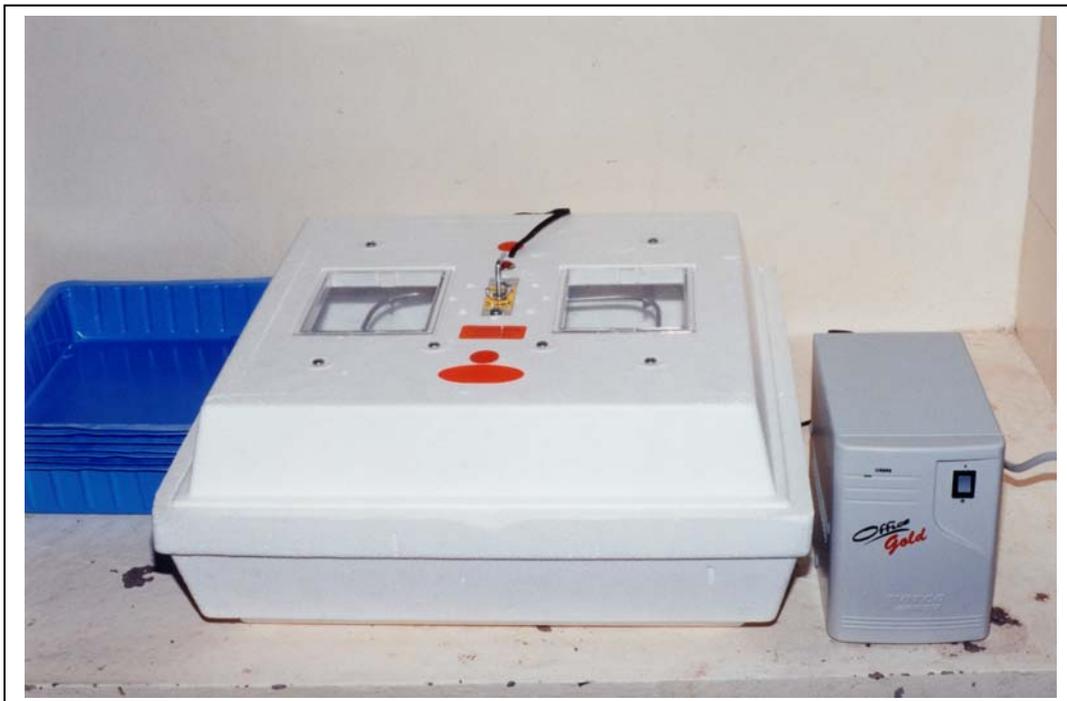


Fig. 8 - Incubadora



Fig. 9 - Incubadora aberta

Os ovos previamente randomizados por grupo, numerados, pesados e medidos eram retirados da incubadora e colocados em um suporte apropriado para o procedimento, tendo-se o cuidado de manter o pólo mais largo, aquele que contém a câmara de ar, voltado para cima, porque ali se daria a abordagem. Luvas cirúrgicas estéreis eram calçadas e um campo estéril era colocado sobre o ovo, de forma a permitir a exposição da área a ser manipulada. Em seguida se procedia à antissepsia do local de abordagem com álcool isopropílico a 70% (figura 10). O instrumental cirúrgico era selecionado e consistia de uma tesoura de íris, uma pinça de Adson sem dente, uma pinça de preensão tipo “mosquito” e o gancho fabricado para este procedimento. Com a pinça mosquito iniciava-se a confecção de um orifício no pólo do ovo de 0,7 a 1 cm de diâmetro (figura 11). A seguir abordava-se a câmara de ar do ovo (figura 12) e no assoalho da câmara de ar encontrava-se a membrana do ovo

que era aberta em conjunto com a membrana corioalantóide (figura 13). A abertura em separado dessas duas membranas não era possível. Os sangramentos eram controlados com o delicada preensão dos vasos ou com uma pinça de cautério do tipo bipolar. Em seguida abordava-se a cavidade amniótica e com o gancho procedia-se à busca pelo cordão umbilical (figura 14). Esta manobra é facilitada seguindo-se os grandes vasos umbilicais que são facilmente identificados (figura 15) ou explorando com o gancho junto aos membros inferiores do embrião. Após identificado, o cordão umbilical era gentilmente exteriorizado do ovo e procedia-se à identificação das estruturas do seu interior. As alças intestinais são facilmente visíveis dentro do cordão umbilical (figura 16). Com a tesoura de irís e com auxílio da pinça de Adson, fazia-se a abertura do cordão umbilical o mais próximo possível do abdômen do embrião (figura 17), na zona denominada coto umbilical. Em seguida uma gentil pressão era realizada a fim de que algumas alças intestinais saíssem pela abertura (figura 18). Atenção especial nesse momento era dada aos vasos umbilicais que cruzam dentro do cordão umbilical (figura 19); uma lesão desses vasos, com conseqüente sangramento, inviabiliza o procedimento. Após exteriorização das alças, o cordão umbilical retornava para dentro do ovo. A borda da abertura na casca era limpa de resíduos de sangue e líquido amniótico e o orifício era fechado com o uso de curativo plástico (figuras 20 e 21) (Tegaderm® - 3M Health Care, St. Paul, USA). Em seguida o ovo era recolocado na incubadora e seguia com cuidados de verificação de temperatura e umidade 3 vezes ao dia e viragem manual 1 a 2 vezes ao dia (figura 22). Em cada lote em incubação, pelo menos um ovo normal era deixado para nascer espontaneamente, afim de confirmar o dia previsto para a eclosão do lote. Os ovos eram examinados diariamente pelo pesquisador e, mesmo constatando-se a morte do embrião, eles não eram retirados da incubadora. Ao final do

experimento, no 19º dia, os ovos eram retirados da incubadora, pesados e abertos para exame. Os animais vivos, identificados pela presença de movimentos espontâneos e/ou sangramento de membranas na abertura da casca (figura 23), eram examinados e classificados como apresentando gastrosquise ou não. Aqueles que não apresentavam alças intestinais expostas eram excluídos e os com as alças de intestino delgado expostas eram submetidos à secagem do excesso de líquido amniótico, fotografados, pesados e realizada eutanásia por exangüinação dos vasos umbilicais, sendo removido o intestino protuído pelo defeito abdominal para posterior análise anatomopatológica (figuras 24 e 25). Esses embriões vieram a compor o grupo gastrosquise (G) no estudo.

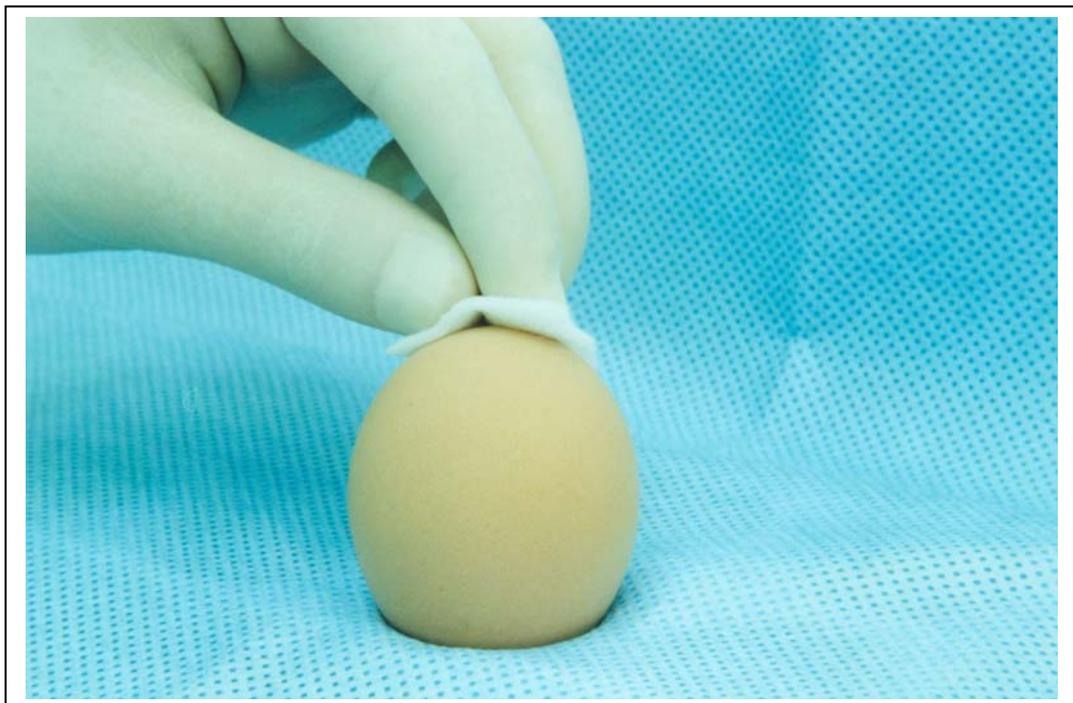


Fig. 10 - Antissepsia com álcool 70%, na extremidade mais alargada do ovo

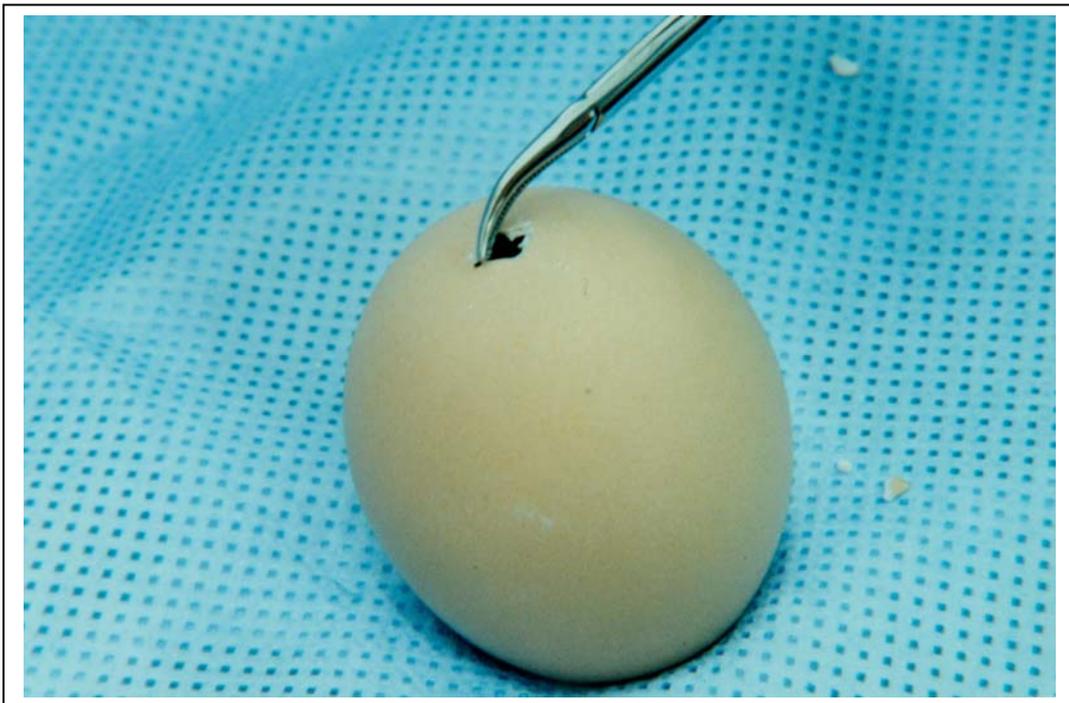


Fig. 11 - Abertura do orifício na extremidade mais alargada do ovo, com o uso da pinça tipo “mosquito”

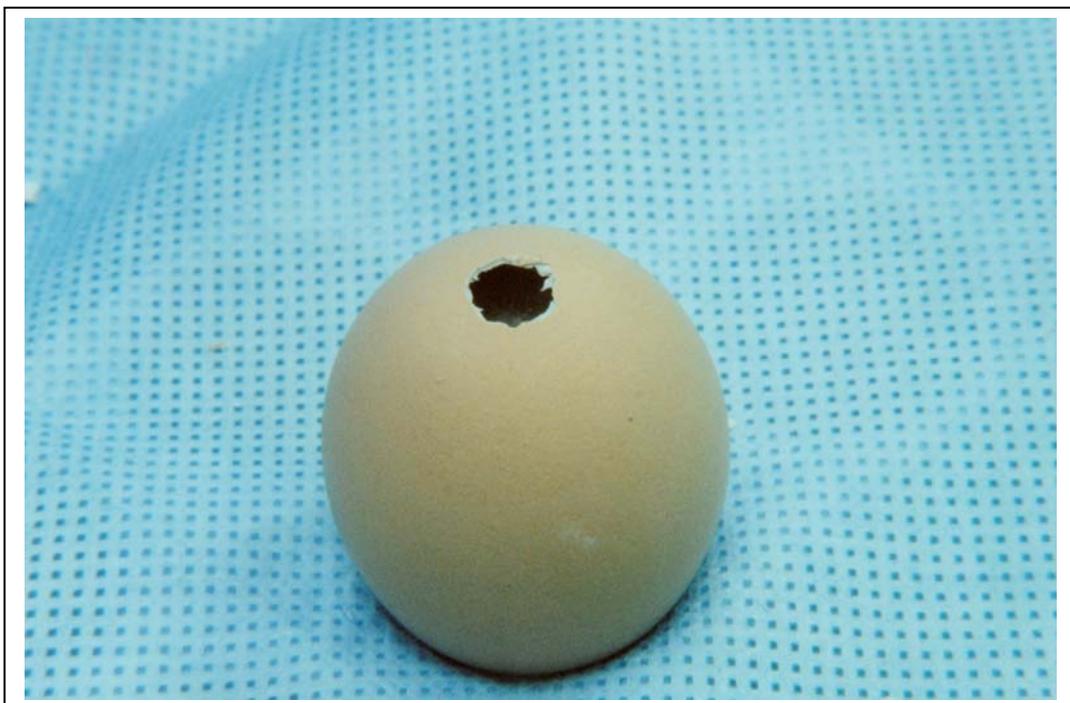


Fig. 12 - Orifício de 0,7 a 1 cm de diâmetro aberto sobre a câmara de ar para abordagem cirúrgica

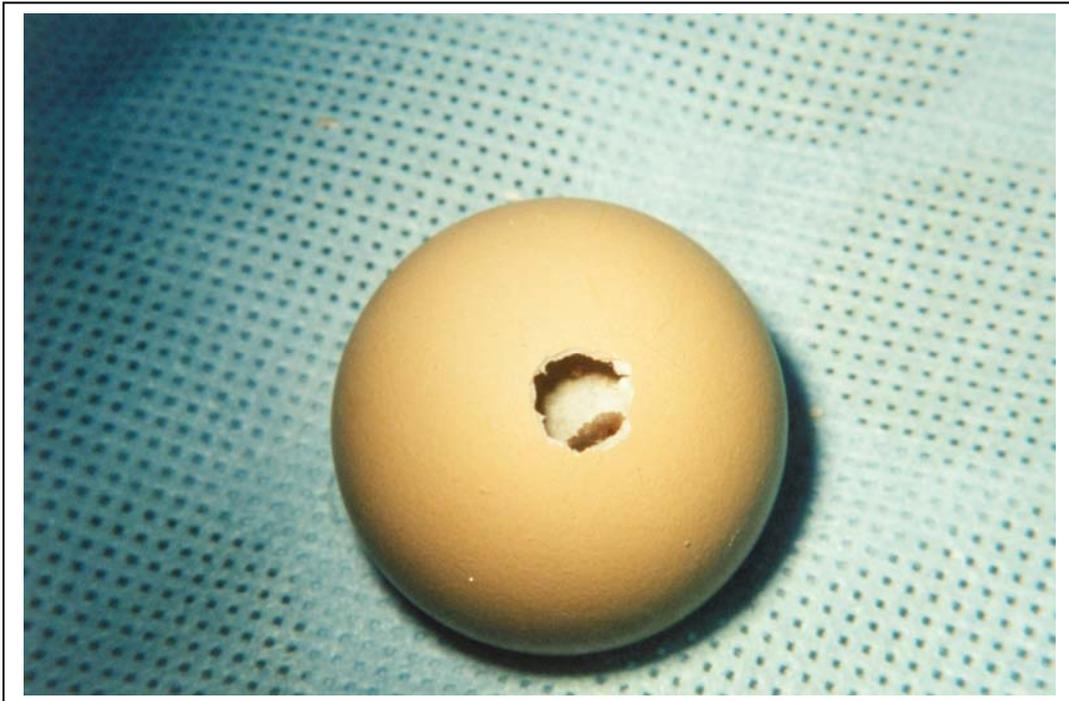


Fig. 13 - Orifício sobre a câmara de ar com visão da membrana do ovo

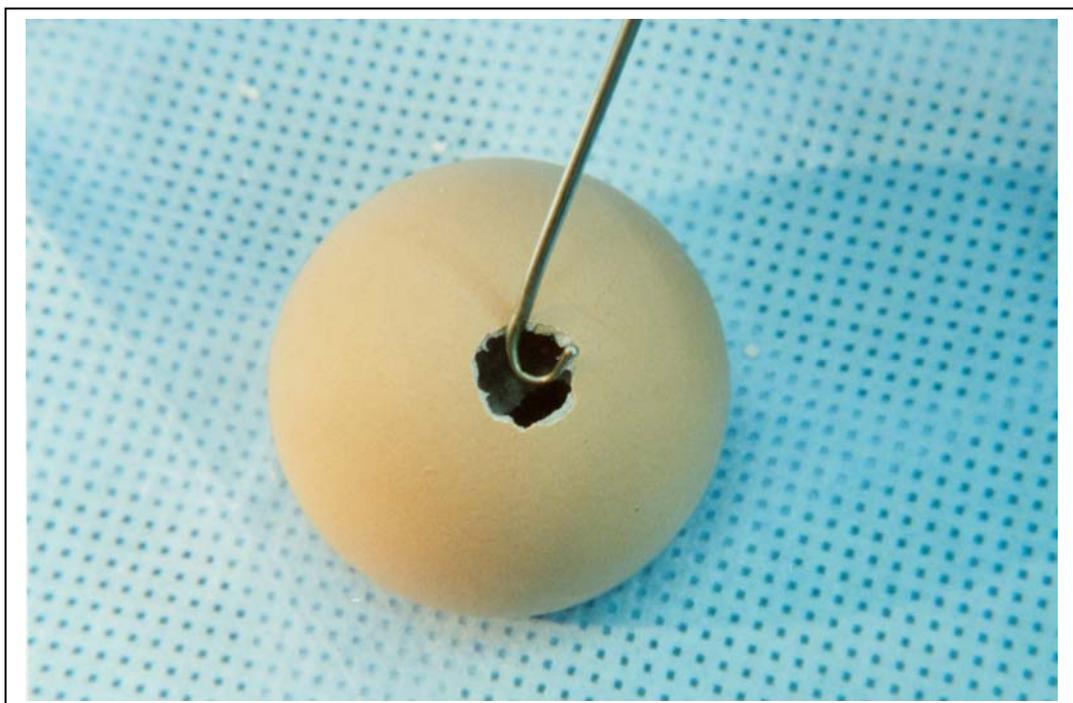


Fig. 14 - Abordagem da cavidade alantóide e amniótica com o gancho, para abrir as membranas e localizar o cordão umbilical

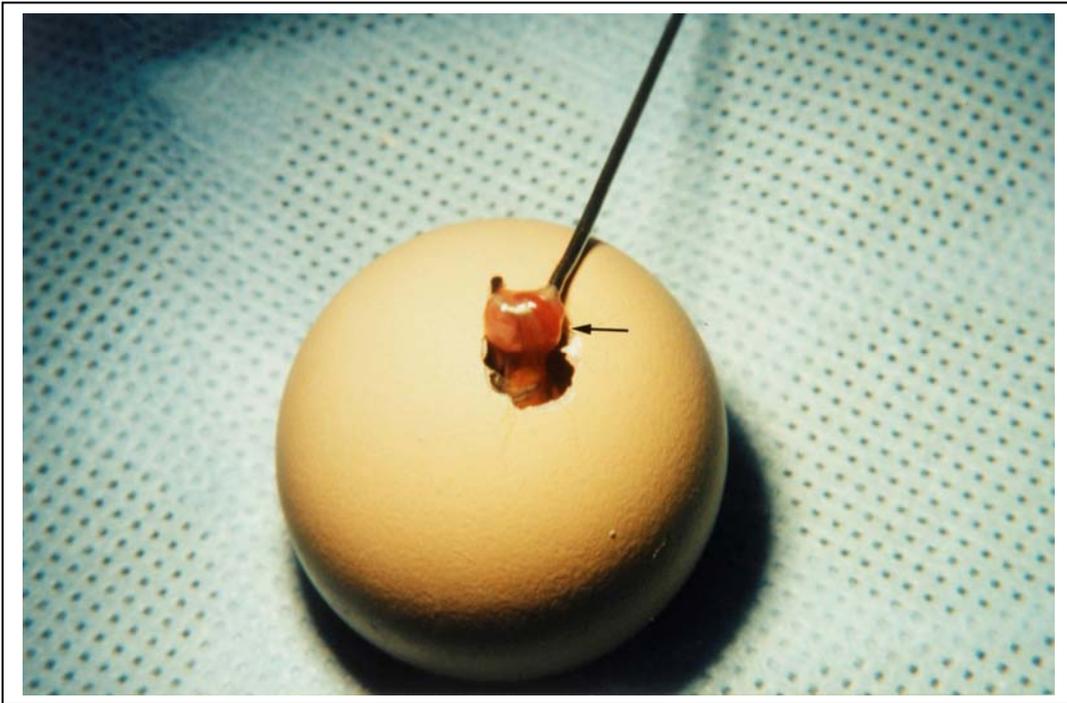


Fig. 15 - Gancho trazendo o cordão umbilical. Notar a grande artéria umbilical presente no seu interior (seta)

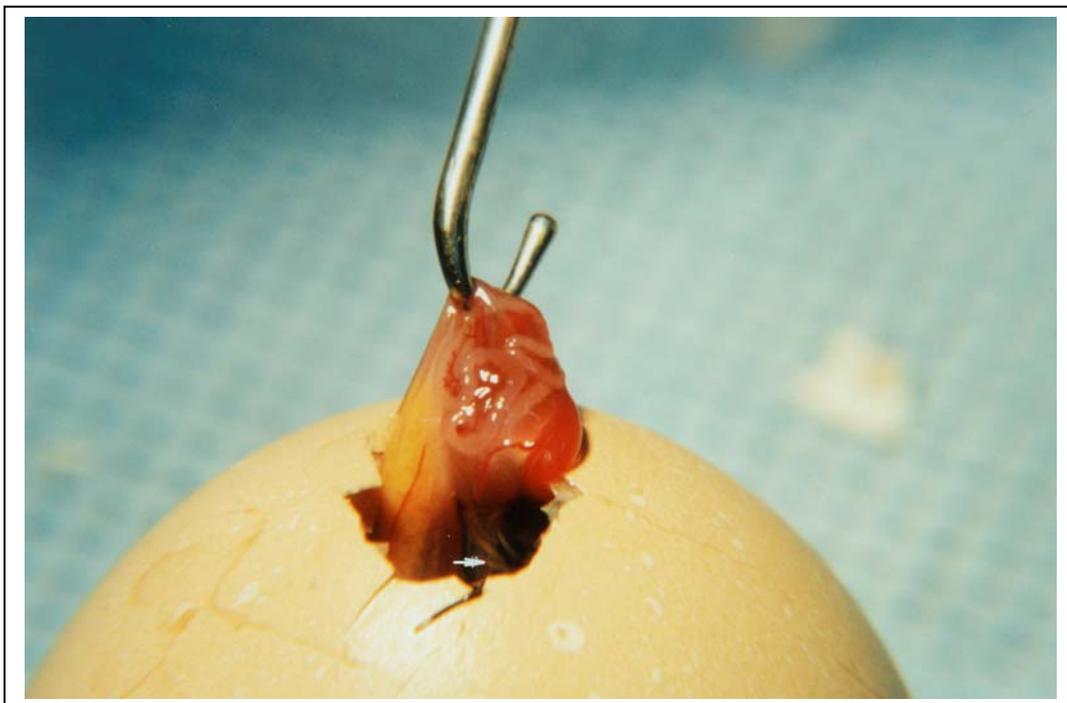


Fig. 16 - Gancho trazendo o coto umbilical com as alças intestinais visíveis mas cobertas pela membrana do cordão. Notar o corpo do embrião logo adjacente (seta)

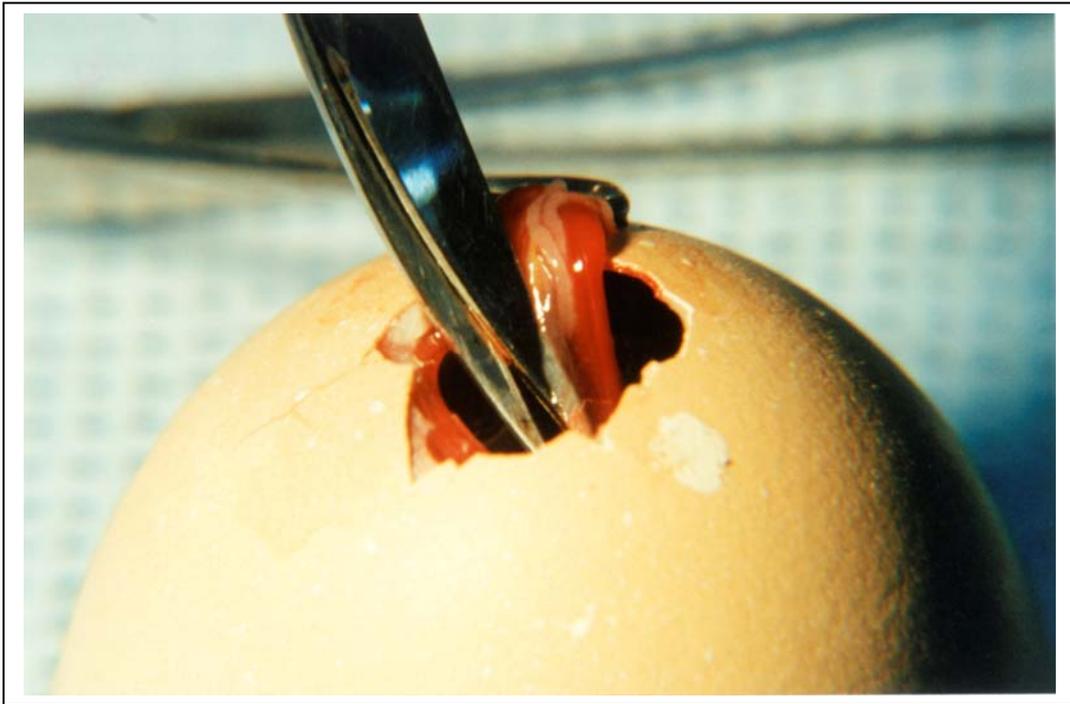


Fig. 17 - Tesoura de Iris abrindo o cordão umbilical, tomando-se o cuidado de não lesar a artéria e veia umbilical

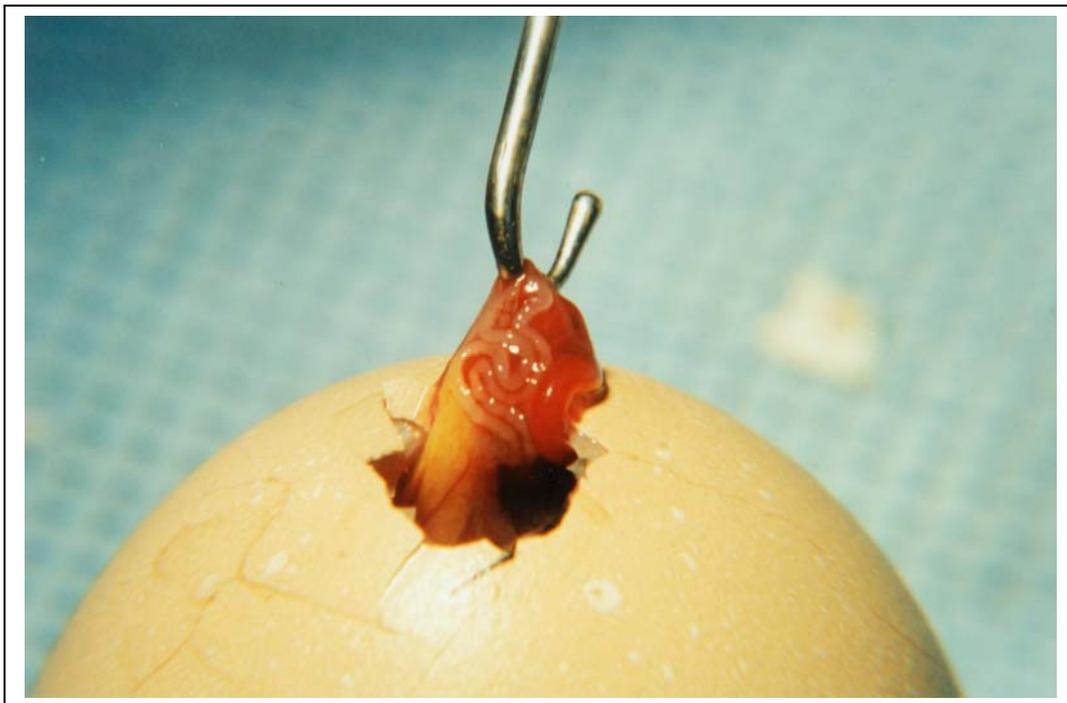


Fig. 18 - Cordão umbilical aberto e as alças intestinais parcialmente expostas

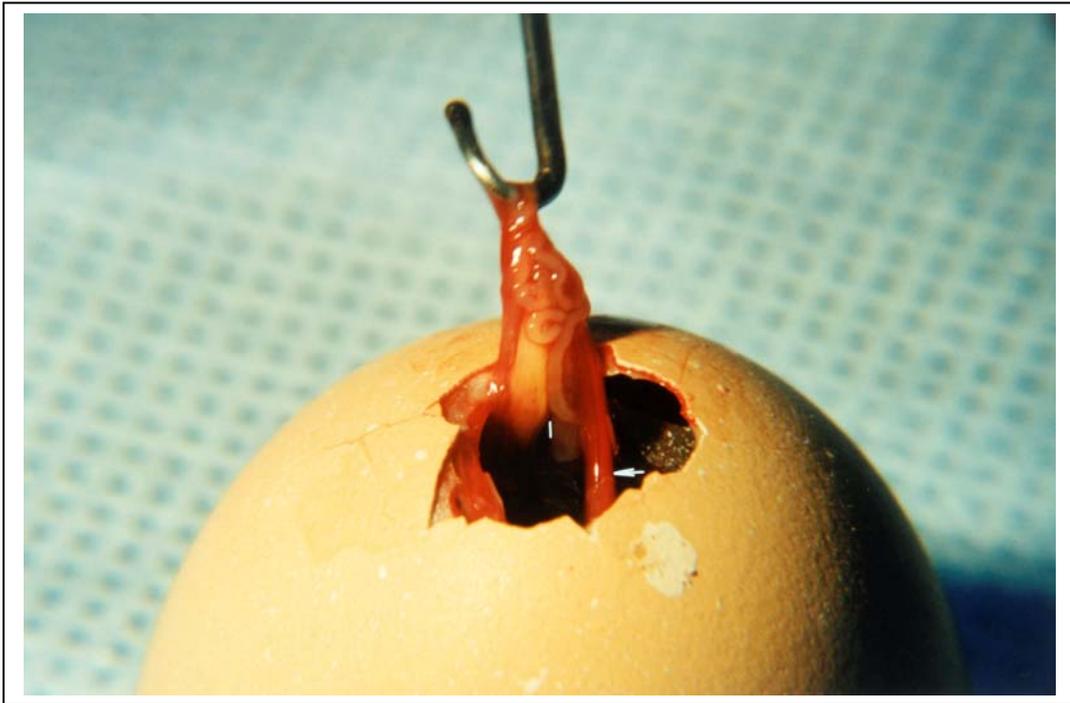


Fig. 19 - Alças intestinais fora do cordão umbilical, liberadas das membranas que recobrem. Notar a grande artéria umbilical (seta) que encontra-se no campo cirúrgico

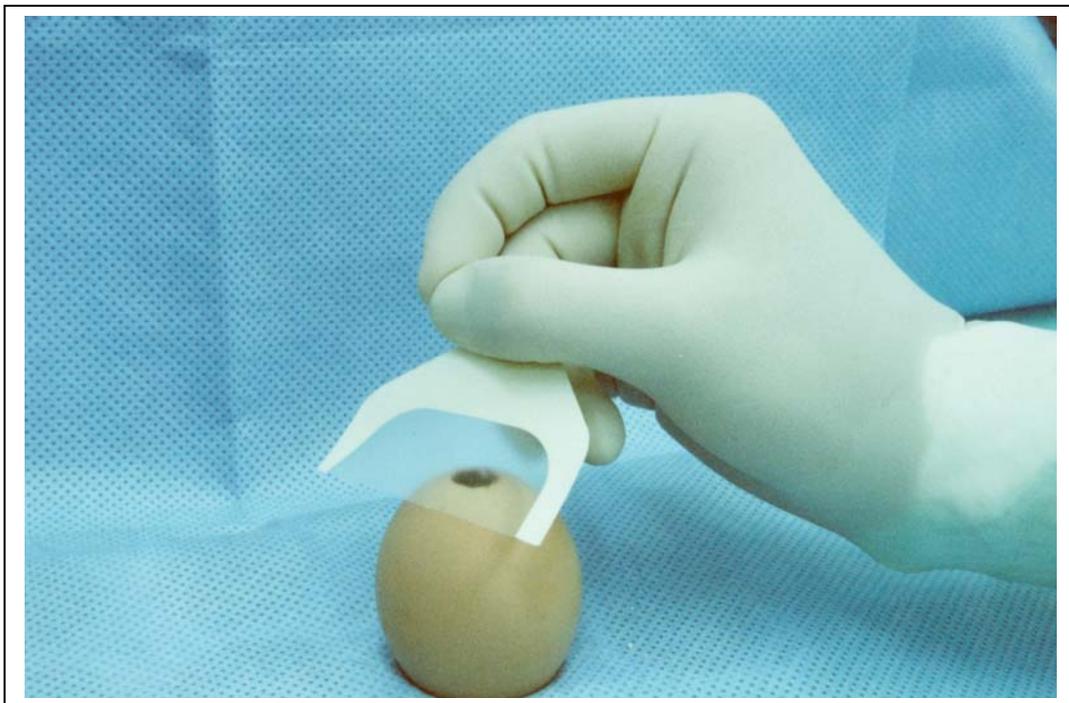


Fig. 20 - Cordão umbilical devolvido para dentro do ovo e o orifício sendo coberto por um curativo plástico adesivo

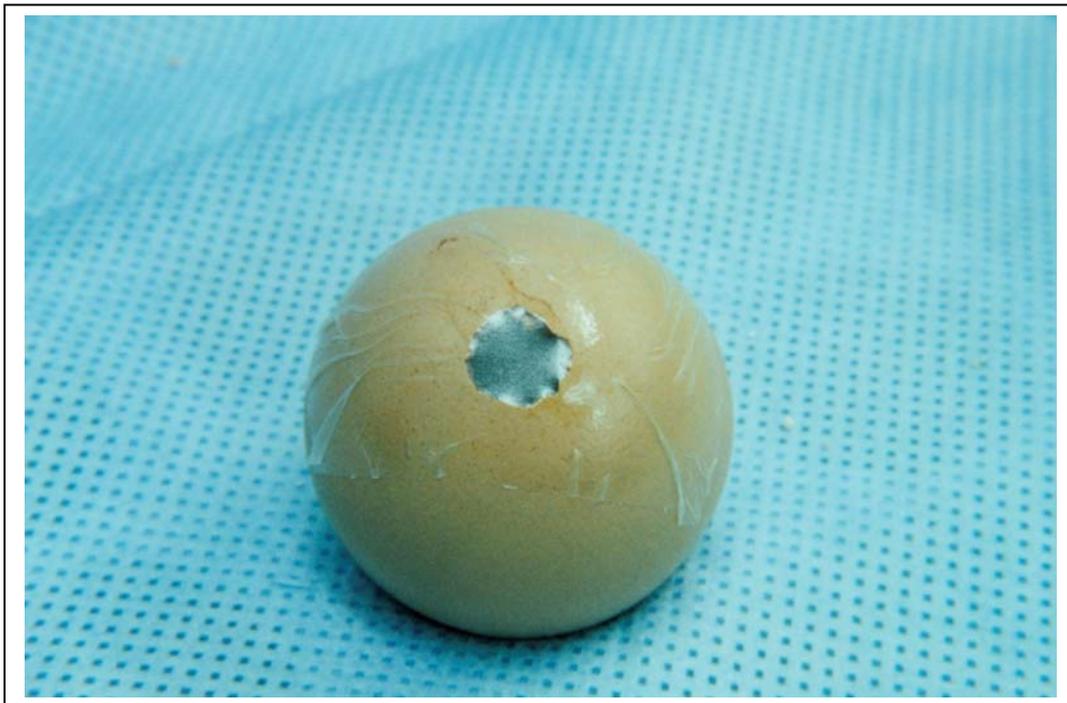


Fig. 21 - Fechamento do orifício com curativo plástico



Fig. 22 - Final do procedimento, ovos devolvidos à incubadora para controle de temperatura, umidade e viragem até o 19º dia



Fig. 23 - No 19^o dia de desenvolvimento o ovo é aberto e a vitalidade do embrião é avaliada pelos movimentos espontâneos ou pelo sangramento das membranas da casca (setas)

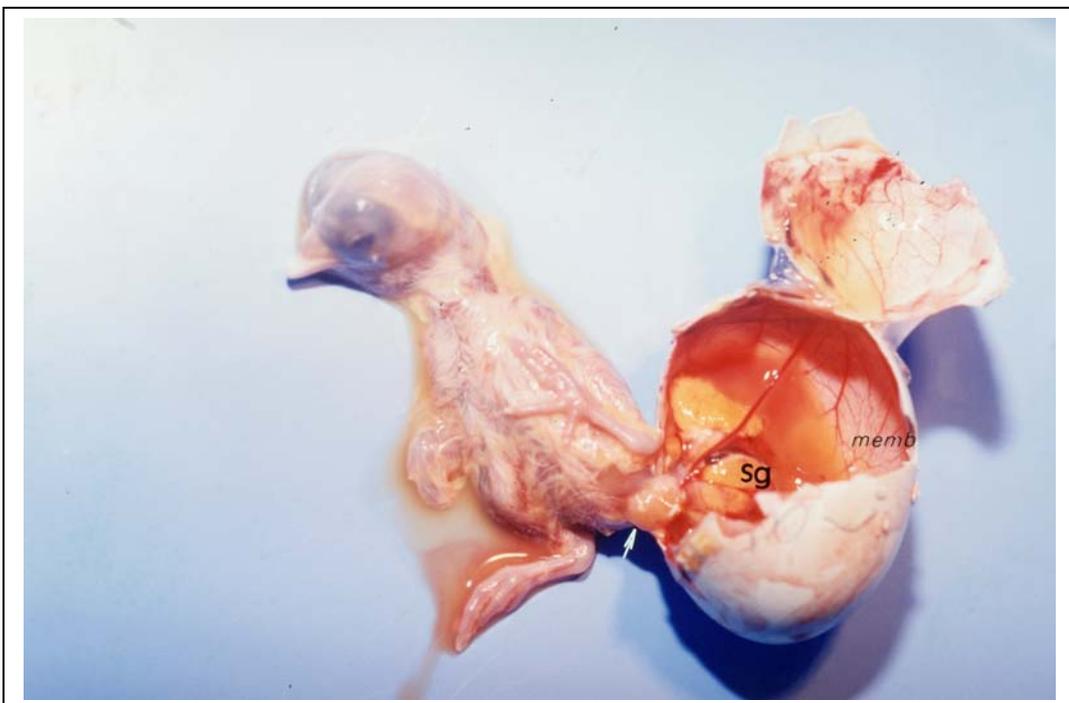


Fig. 24 - Embrião no 19^o dia, no momento da abertura do ovo. Notar a circulação ativa, o sangramento das membranas (*memb*) e o intestino protuído pelo defeito umbilical (*seta*), junto ao saco da gema (*sg*)



Fig. 25 - Detalhe do abdômen do embrião com o saco da gema, o cordão umbilical e as alças intestinais com aspecto espessado protuídas para fora do abdômen (seta)

As alças intestinais eram fixadas em formol a 10% e encaminhadas para o laboratório de patologia, para fixação em parafina. Para obter cortes transversos (de 5 micrômetros de espessura), o ângulo entre o eixo longitudinal do espécime e a lâmina do micrótomo foi o mais próximo possível de 90°. Os cortes do intestino eram montados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina. Procedia-se à avaliação histológica usual dos cortes à procura de sinais inflamatórios e da formação de *peel*, conforme a tabela 5. As análises morfométricas foram realizadas a partir da digitalização das imagens obtidas em microscopia ótica com microscópio Zeiss® (Modelo Axiostar) com ótica plana acromática e foto-tubo (videocâmara

Sony® DXC 151) e analisadas através do programa integrado de morfometria e análise de imagem *Image Pro Plus – Media Cybernetics®*.

Através da análise digital foi possível calcular a espessura da parede intestinal para cada corte histológico em micrômetros.

3.6 - Variáveis em Estudo

As variáveis estudadas foram:

- **Peso do ovo em gramas:** aferido através de balança semi-analítica da marca Micronal, modelo B2000, com divisões de 0,01 g.
- **Comprimento e largura do ovo em milímetros:** aferidos por de um paquímetro com divisões de 1 mm.
- **Mortalidade de embriões ao procedimento:** avaliada mediante exame visual de movimento do embrião e/ou sangramento de membranas na abertura da casca do ovo, para diagnóstico de vitalidade.
- **Peso do embrião em gramas:** aferido pelo mesmo método de pesagem de OVOS.
- **Relação peso embrião pelo peso do ovo (PE/PO):** em percentuais – calculada pela fórmula: $(\text{Peso do embrião} / \text{Peso do ovo no 19}^{\text{º}} \text{ dia}) \times 100$.
- **Acidentes do procedimento:** identificados pelo pesquisador e anotados no protocolo de pesquisa.
- **Avaliação das estruturas exteriorizadas na gastrosquise:** identificadas pelo pesquisador e anotadas no protocolo de pesquisa.

- **Avaliação da inflamação intestinal:** realizada através de escore semiquantitativo, por análise histológica convencional. A tabela 5 apresenta os critérios de avaliação histológica utilizados no estudo
- **Medidas das espessuras intestinais:** expressas em micrômetros, aferidas através de análise morfométrica digital dos cortes, realizando-se 6 medidas aleatórias para cada embrião, quais sejam:
 - espessura total de parede;
 - espessura da serosa;
 - espessura da camada muscular;
 - espessura da mucosa (medida a partir da base do vilão até o início da camada muscular).
- **Avaliação do número de plexos nervosos mioentéricos:** efetuada por análise histológica convencional em hematoxilina-eosina.

3.7 - Ética em Estudos Experimentais

A utilização dos embriões foi realizada sob condições éticas e científicas regulamentadas pela Lei Federal nº 6.638, de 08 de maio de 1979, a qual estabeleceu as normas para a prática didático-científica da experimentação com animais¹¹³. Esta pesquisa foi autorizada pela coordenação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Laboratório de Cirurgia Experimental, da Faculdade de Medicina da Universidade de Caxias do Sul, onde foi desenvolvido o trabalho experimental.

Tabela 5 - Avaliação histológica do intestino dos embriões de galinha

Classificação	Grau	Histologia	Escore
Serosite			
Ausente	0	Ausência de alteração anatomopatológica	0
Leve	I	Edema e infiltrado inflamatório grau I (até 5 leucócitos por campo de 40X)	1
Moderada	II	Edema e infiltrado inflamatório grau II (de 5 a 25 leucócitos por campo de 40X) + proliferação endotelial	2
Severa	III	Edema e infiltrado inflamatório grau III (mais de 25 leucócitos por campo de 40X, com exsudato seroso e hiperemia intensa) + proliferação mesotelial	3
Enterite			
Ausente	0	Ausência de alteração anatomopatológica	0
Leve	I	Edema e infiltrado inflamatório grau I com discreta ectasia venosa e linfática, com discreto edema vilositário (sem atrofia da vilosidade), do cório da mucosa ou do mesentério	1
Moderada	II	Edema e infiltrado inflamatório grau II, com congestão venosa e ectasia linfática + discreta atrofia vilositária com moderado edema das vilosidades, do cório da mucosa ou do mesentério	2
Severa	III	Edema e infiltrado inflamatório grau III apresentando congestão venosa intensa com extravasamento de hemácias para o interstício + atrofia vilositária severa com alargamento ou achatamento vilositário, do cório da mucosa ou do mesentério	3
Necrose			
Ausente	0	Ausência de alteração anatomopatológica	0
Leve	I	Necrose restrita à serosa	1
Moderada	II	Necrose estendendo-se à serosa e muscular	2
Severa	III	Necrose transmural	3
Depósito de colágeno e fibrina na serosa (Peel)			
Ausente	0	Ausência de <i>peel</i> sobre a serosa	0
Leve	I	Depósito focal de <i>peel</i> sobre a serosa	1
Moderado	II	Depósito moderado de <i>peel</i> sobre a serosa	2
Severo	III	Depósito extenso de <i>peel</i> sobre a serosa	3

Modificada a partir de Sherman *et al.*⁸⁹, Ferreira *et al.*⁷⁶ e Kubaski⁹².

3.8 - Análise Estatística

Inicialmente os dados foram descritos através de média e desvio padrão. Variáveis qualitativas foram expressas por frequência e percentual. Na comparação dos grupos utilizou-se a análise de variância com 1 (um) critério de classificação (ANOVA one-way). A localização de diferenças significativas foi feita mediante o teste de comparações múltiplas de Duncan. A comparação de variáveis assimétricas foi confirmada pela utilização do procedimento não paramétrico de Kruskal-Wallis, com localização de diferenças pelo teste de Dunn. O nível de significância foi de $\alpha = 0,05$. Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas SSPS® (v.10) e Sigmaplot® (V 2.1).

4 - RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 - Sobrevida

Dos 236 ovos do grupo gastrosquise (G), 207 (87,7%) tiveram o procedimento cirúrgico realizado com sucesso e 29 (12,3) apresentaram acidentes na execução.

Dos 207 embriões submetidos à criação de uma gastrosquise, 184 (88,9%) estavam mortos ao final do experimento (figuras 26 e 27) e 23 vivos, sendo, portanto, de 11,1% a taxa de sobrevida ao procedimento para criar uma gastrosquise.



Fig. 26 - Embriões mortos do grupo gastrosquise



Fig. 27 - Embrião do grupo gastrosquise morto. Observar a presença do defeito abdominal com as alças intestinais exteriorizadas (seta)

Dos 23 embriões que sobreviveram ao experimento, 5 (21,7%) mostravam cicatrização do defeito abdominal sem alças intestinais expostas (figura 28) e 18 apresentavam gastrosquise, reconhecida pelo exame do embrião. Então, considerando os 207 embriões submetidos inicialmente ao procedimento, a taxa de sucesso na realização de gastrosquise foi de 8,7% (IC 95%: 5,4 a 13,6).

Dos 17 embriões do grupo mistura (M), 12 (70,5%) sobreviveram ao experimento, o que resultou em taxa de sobrevivência de 70,5%.



Fig. 28 - Embrião do grupo gastrosquise, que no 19º dia apresentava cicatrização completa do coto umbilical, sem exteriorização das alças. Observa a zona de cicatriz no coto umbilical (seta)

A comparação da taxa de sobrevivência desses dois grupos mostrou haver entre eles diferença estatisticamente significativa ($P = 0,045$).

Os 15 ovos deixados para nascer eclodiram no dia previsto para ser o 21º do desenvolvimento embrionário.

A figura 29 resume a distribuição da amostra nos grupos de estudo.

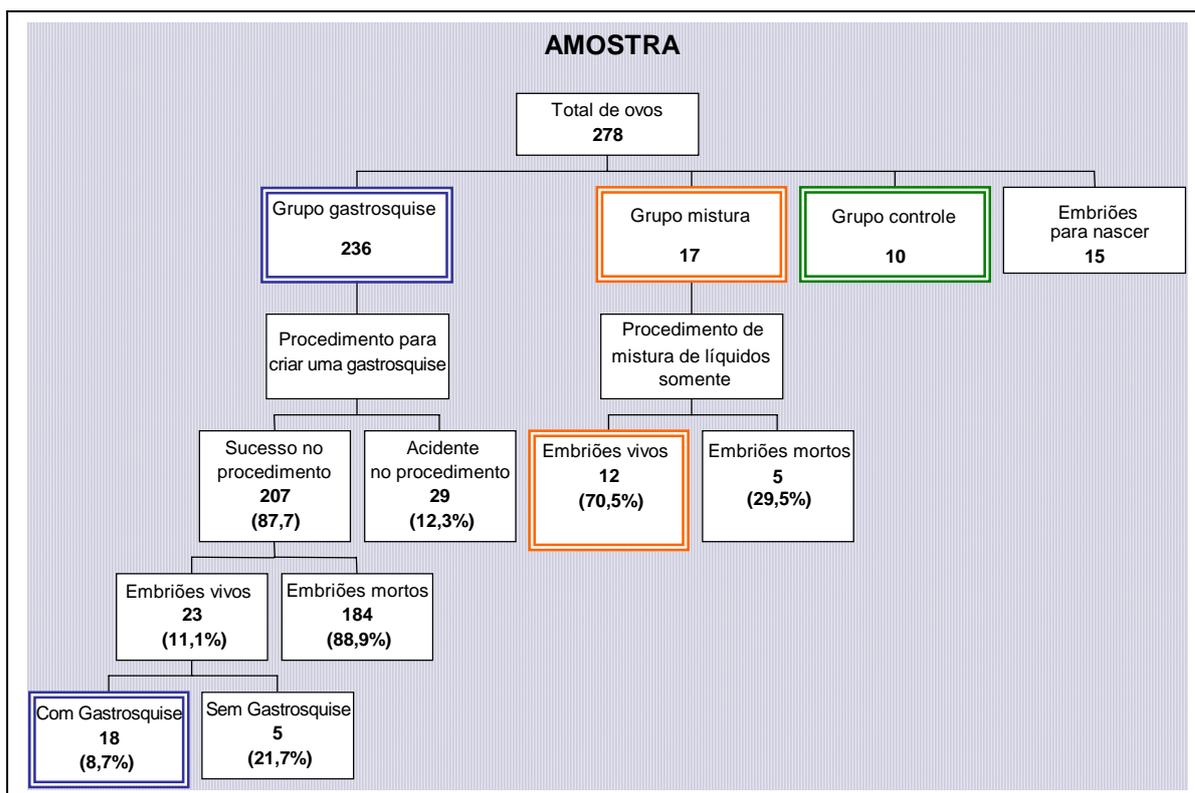


Fig. 29 - Distribuição dos ovos e embriões na amostra

4.2 - Acidentes no Procedimento

A tabela 6 indica os acidentes ocorridos no procedimento cirúrgico que fizeram com que 29 ovos do grupo G fossem desprezados.

Tabela 6 - Acidentes no procedimento para criar uma gastrosquise

Acidente cirúrgico	f	%
Lesão do saco da gema	16	55,17
Fratura da casca do ovo	2	6,90
Sangramento dos vasos umbilicais	11	37,93
Total	29	100,00

4.3 - Peso, Comprimento e Largura dos Ovos e Peso dos Embriões

A tabela 7 apresenta o peso, o comprimento e a largura dos ovos, bem como o peso dos embriões e a relação peso do embrião/peso do ovo (PE/PO).

Tabela 7 - Medidas de peso, comprimento e largura dos ovos, peso dos embriões e relação peso do embrião/peso do ovo (média \pm desvio padrão)

Variáveis	GRUPOS			P
	G	M	C	
	n = 18	n = 12	n = 10	
Peso do ovo no dia 13 (g)	53,51 \pm 5,70	57,71 \pm 3,62	54,20 \pm 4,34	0,069
Peso do ovo no dia 19 (g)	51,67 \pm 5,50	55,72 \pm 3,44	52,40 \pm 3,96	0,066
Comprimento (mm)	55,44 \pm 3,07 ^a	58,25 \pm 2,73 ^b	56,40 \pm 2,37 ^{a, b}	0,038
Largura (mm)	42,67 \pm 1,41	42,83 \pm 1,03	42,70 \pm 1,64	0,946
Peso do embrião (g)	17,43 \pm 4,01 ^a	21,98 \pm 1,74 ^b	25,43 \pm 2,44 ^c	< 0,001
Relação PE/PO	33,79 \pm 7,26 ^a	39,60 \pm 4,04 ^b	48,51 \pm 2,69 ^c	< 0,001

Letras-índice não-coincidentes apresentam diferenças estatisticamente significativas.

As médias de comprimento dos ovos mostraram uma diferença estatisticamente significativa no Grupo M, porém não foram evidenciadas diferenças nas comparações do peso do ovo no dia 13 e no dia 19 e da largura.

A comparação do peso do embrião e da relação PE/PO nos três grupos mostrou uma diferença estatisticamente significativa, indicando que houve uma diminuição no peso do embrião do grupo gastrosquise quando comparado com os grupos mistura e controle.

A figura 30 apresenta em gráficos as medidas de peso, comprimento e largura dos ovos, peso dos embriões e relação PE/PO.

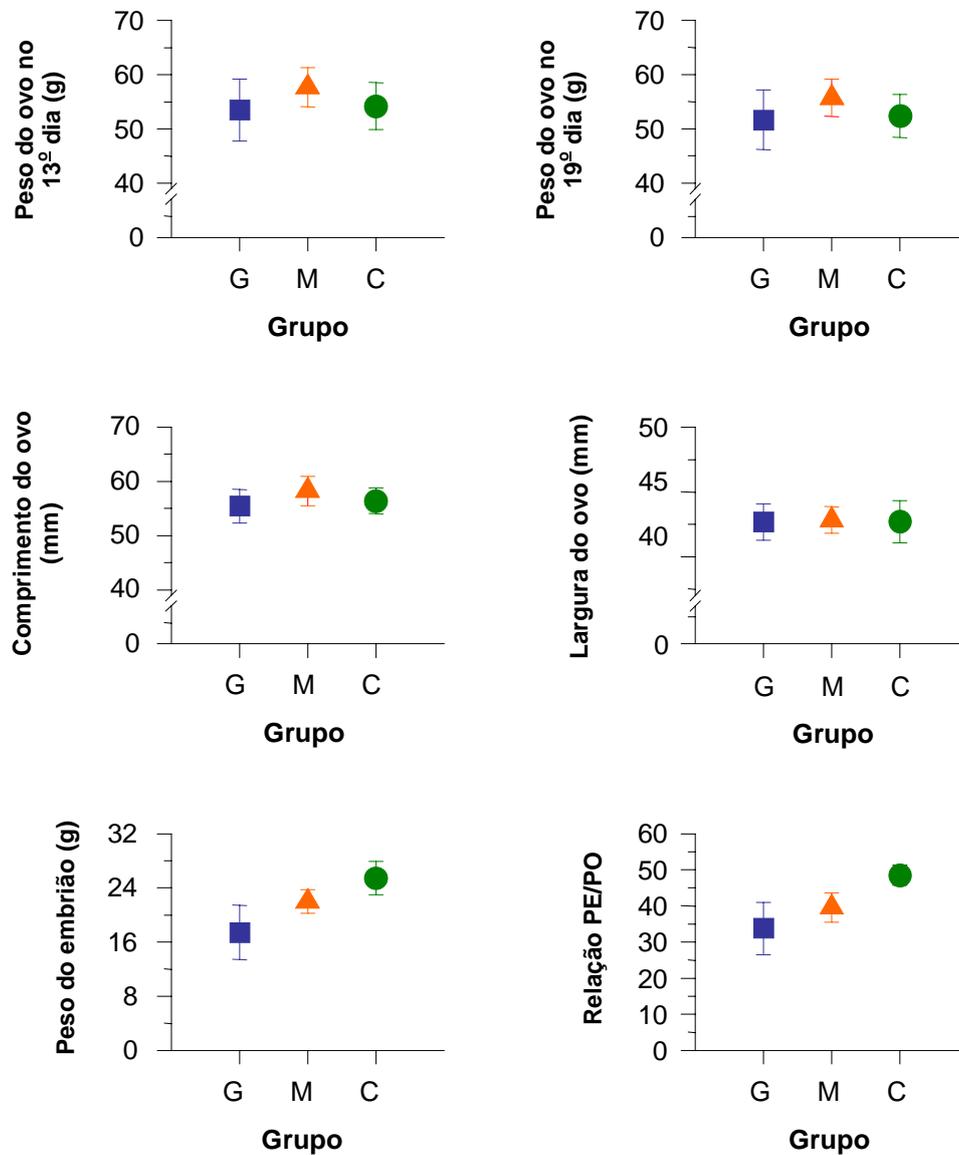


Fig. 30 - Gráficos de média e barra de erro (\pm desvio padrão) representando a comparação de diversas variáveis entre os grupos em estudo (G:gastroquise; M: mistura; C: controle).

4.4 - Análise Macroscópica das Visceras Expostas

A avaliação por inspeção das vísceras expostas ao nascimento mostrou que em todos os casos do grupo G as vísceras expostas foram alças do intestino delgado (figuras 31, 32, 33 e 34). Não foi observado fígado exposto em nenhum dos casos. Nos grupos M e C, no momento da abertura do ovo, o cordão umbilical encontrava-se intacto e não havia vísceras expostas em nenhum deles (figuras 35, 36 e 37).



Fig. 31 - Embrião vivo do grupo gastrosquise. Observar a dilatação e hiperemia das alças intestinais expostas

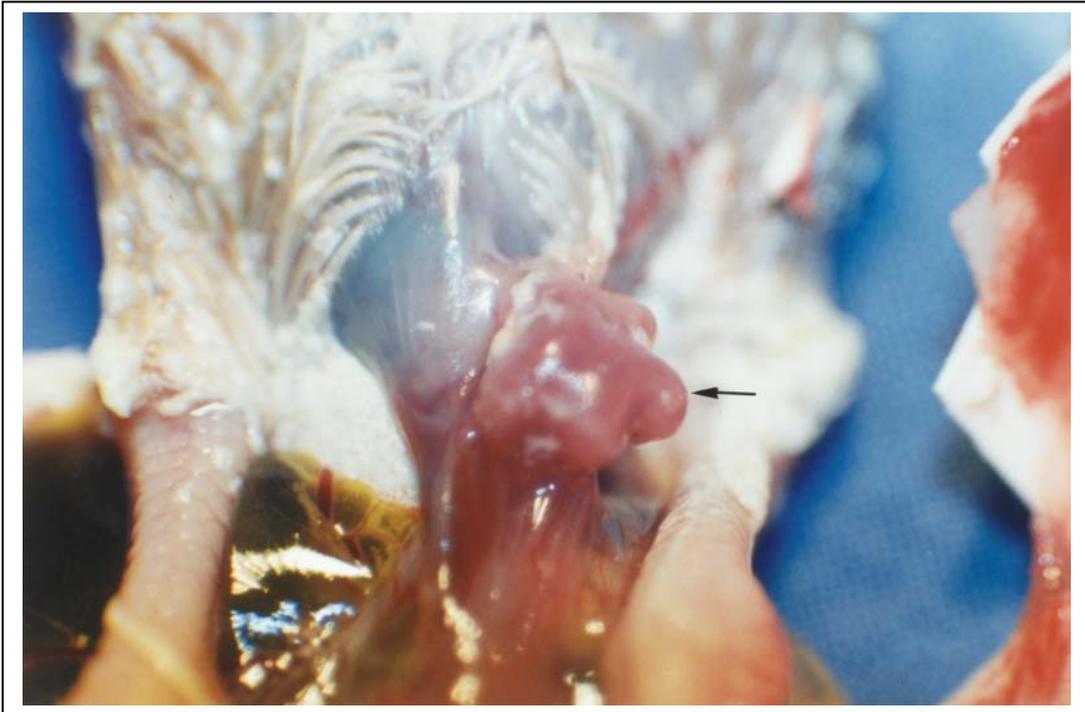


Fig. 32 - Embrião vivo do grupo gastrosquise. Observar o espessamento e a aglutinação de alças intestinais, lembrando uma gastrosquise humana (seta)



Fig. 33 - Embrião vivo do grupo gastrosquise. Alças intestinais expostas, aderidas e com parede espessada, ainda é possível identificar o saco da gema



Fig. 34 - Embrião do grupo gastrosquise. Alças intestinais expostas, lateralmente ao cordão umbilical e ao saco a gema. Notar a hiperemia e o aspecto inflamatório das alças.



Fig. 35 - Embrião do grupo mistura. Notar o coto umbilical intacto e o início do processo de retração do saco da gema



Fig. 36 - Embrião do grupo controle. Observar o coto umbilical intacto (seta), e o pleno desenvolvimento do animal no 19º dia

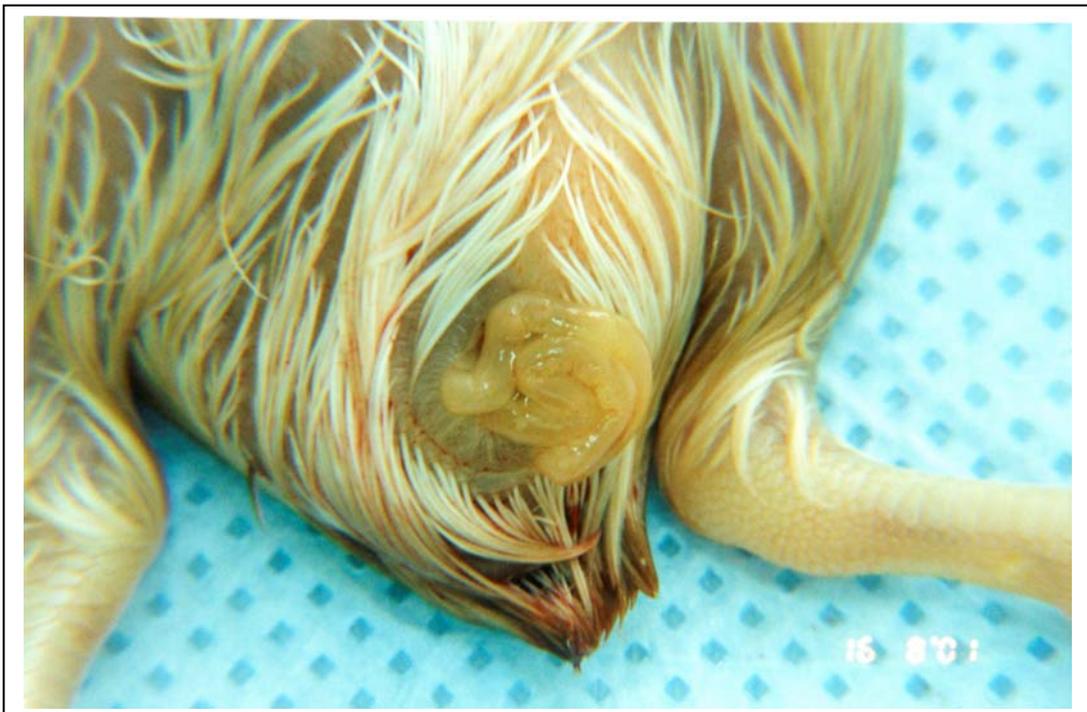


Fig. 37 - Detalhe do coto umbilical aberto do embrião do grupo controle. Observar as alças intestinais com aspecto normal, sem edema ou hiperemia

4.5 - Análise Microscópica das Alças Intestinais

A avaliação microscópica das alças intestinais baseada no escore previamente apresentado (tabela 5) classificou os achados de serosite, enterite, necrose e *peel*. Os grupos M e C exibiram poucas alterações ao exame histopatológico (figuras 38, 39, 40, 41 e 42). Diferentes graus de lesão puderam ser observados no Grupo G, conforme se pode ver nas figuras 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 e 51.

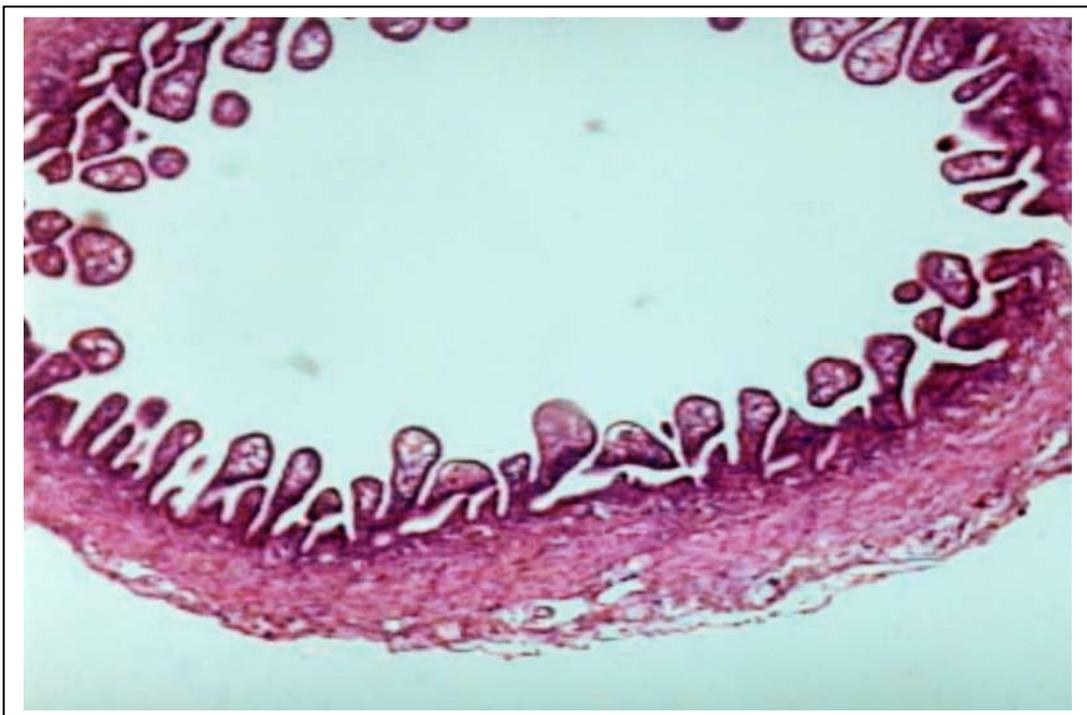


Fig. 38 - Corte histológico do intestino de embrião do grupo C, (100x). Observar o aspecto normal das camadas do intestino

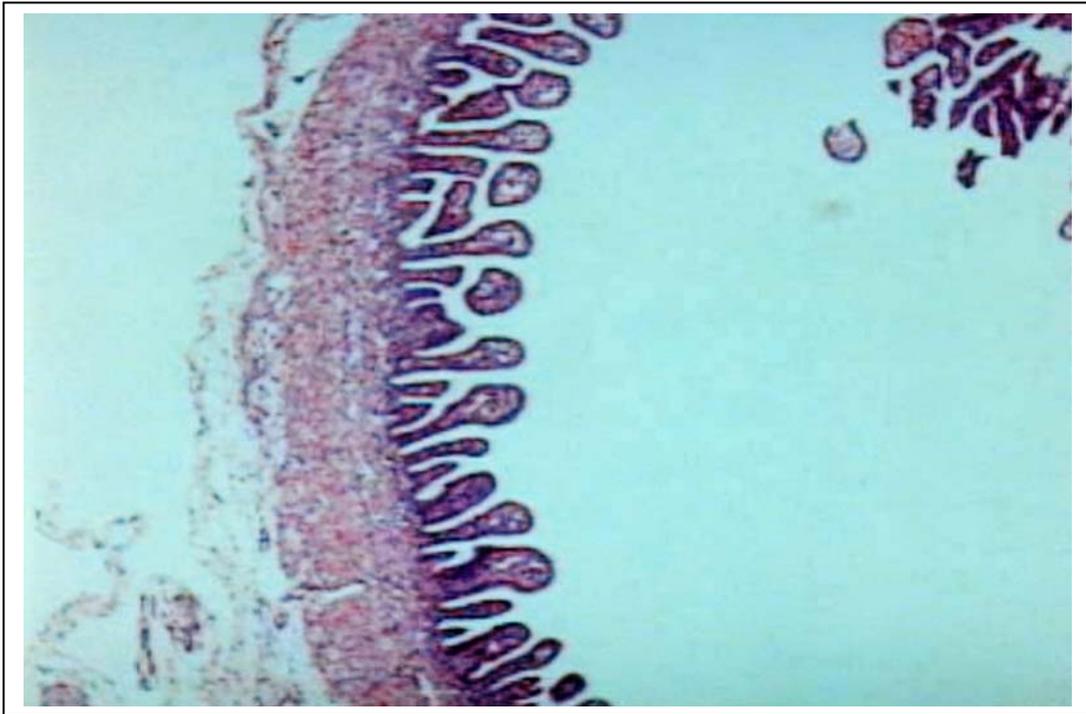


Fig. 39 - Corte histológico do intestino de embrião do grupo C, (100x). Enterite leve

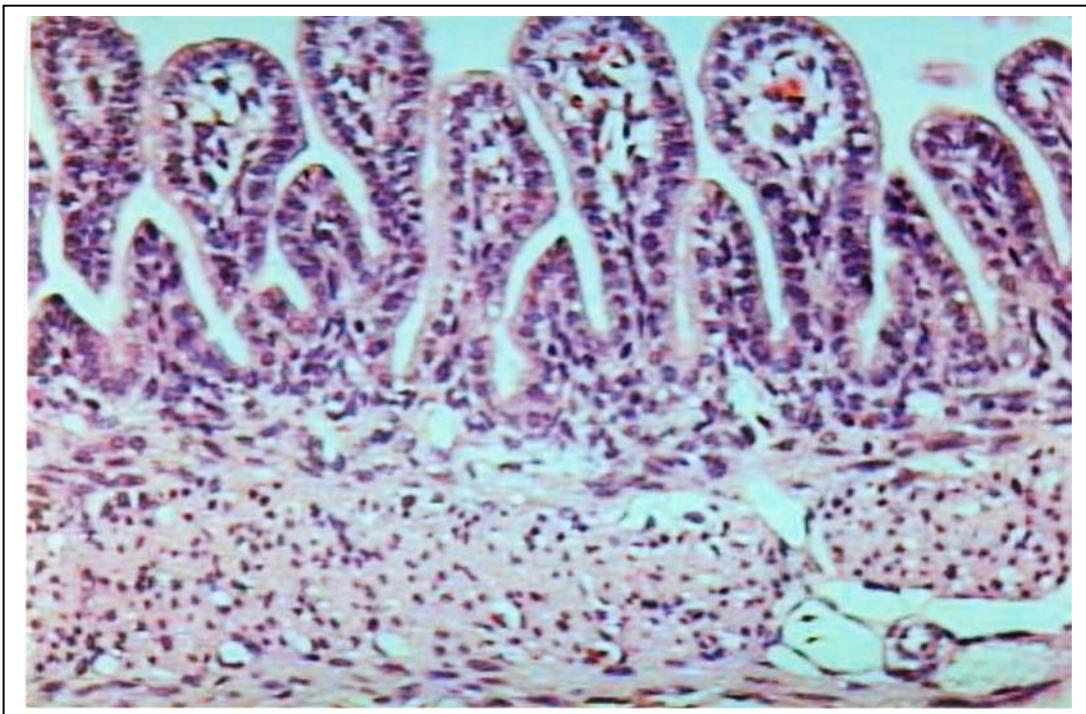


Fig. 40 - Corte histológico do intestino de embrião do grupo C, (400x). Observar o aspecto normal das vilosidades intestinais e das camadas mucosas e muscular

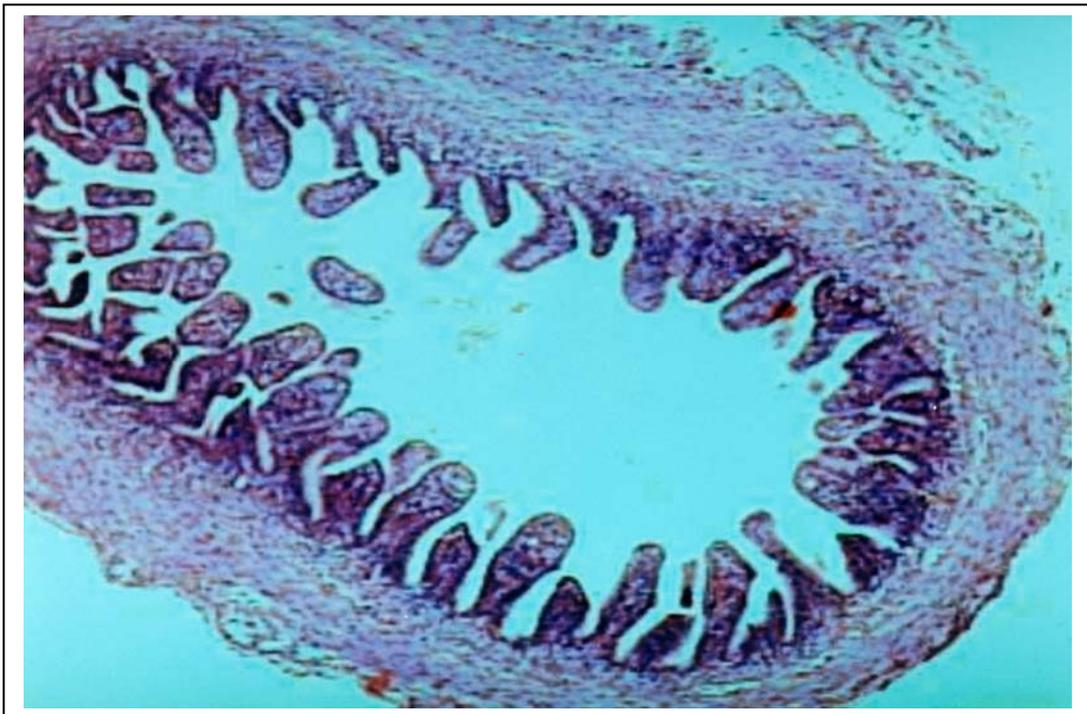


Fig. 41 - Corte histológico do intestino de embrião do grupo M, (100x). Observar infiltrado inflamatório nas vilosidades intestinais

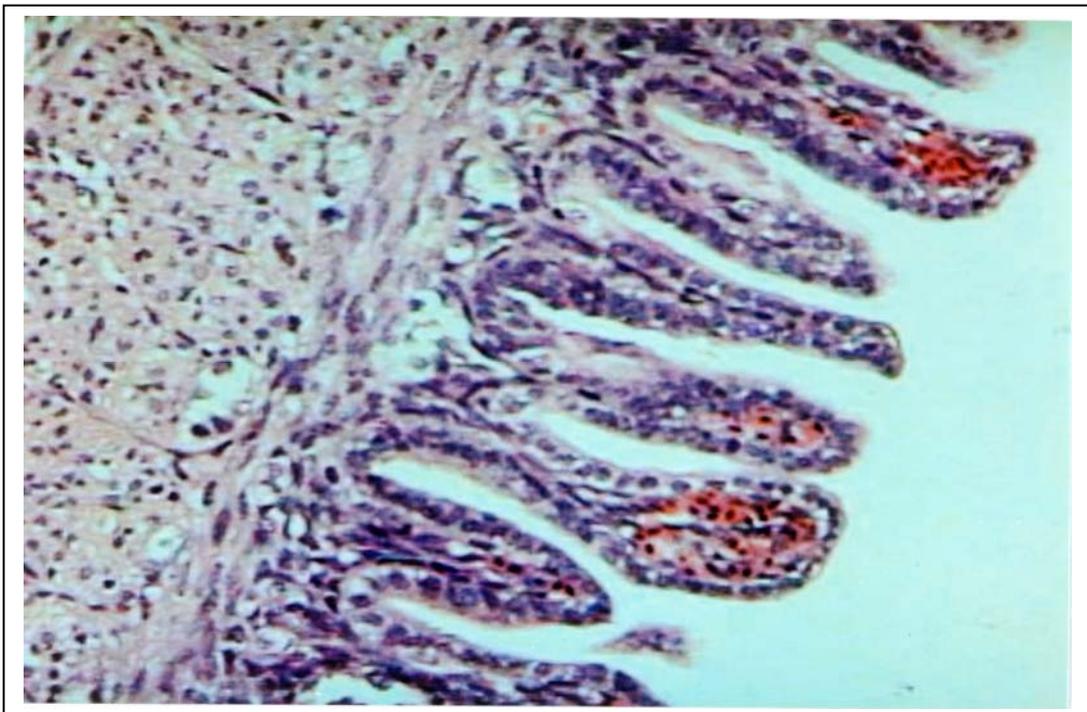


Fig. 42 - Corte histológico do intestino de embrião do grupo M, (400x). Enterite leve. Observar o nítido infiltrado inflamatório nas vilosidades intestinais



Fig. 43 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (40x). Observar espessamento da parede, as alças intestinais aderidas

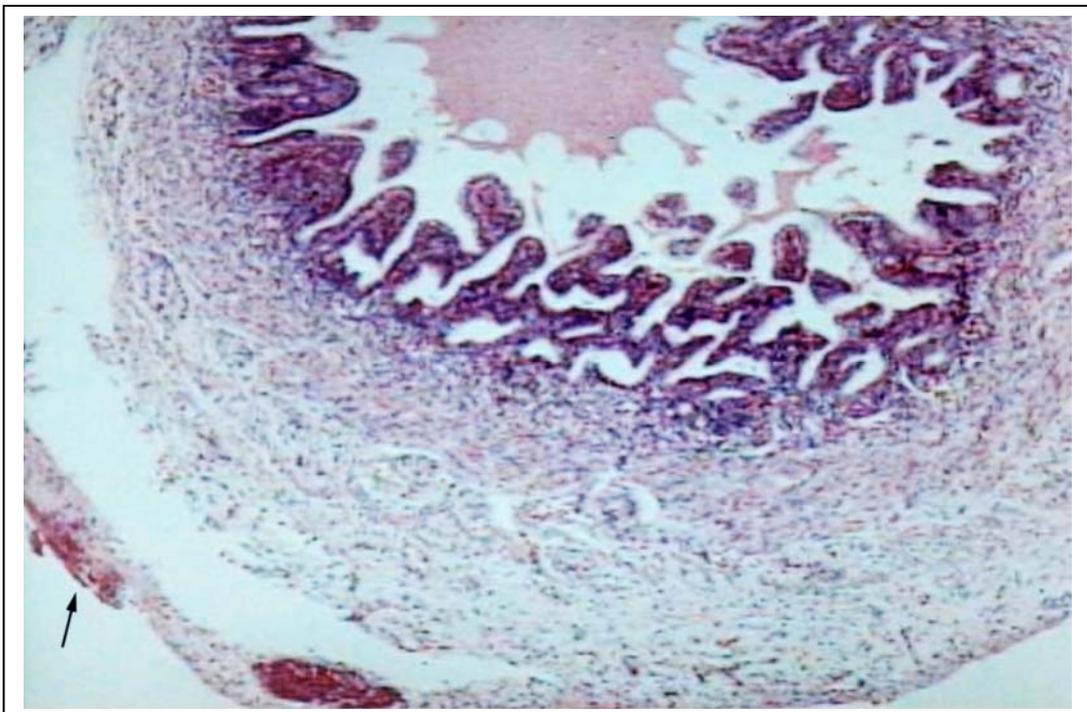


Fig. 44 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (100x). Observar espessamento da parede, edema e infiltrado inflamatório na serosa

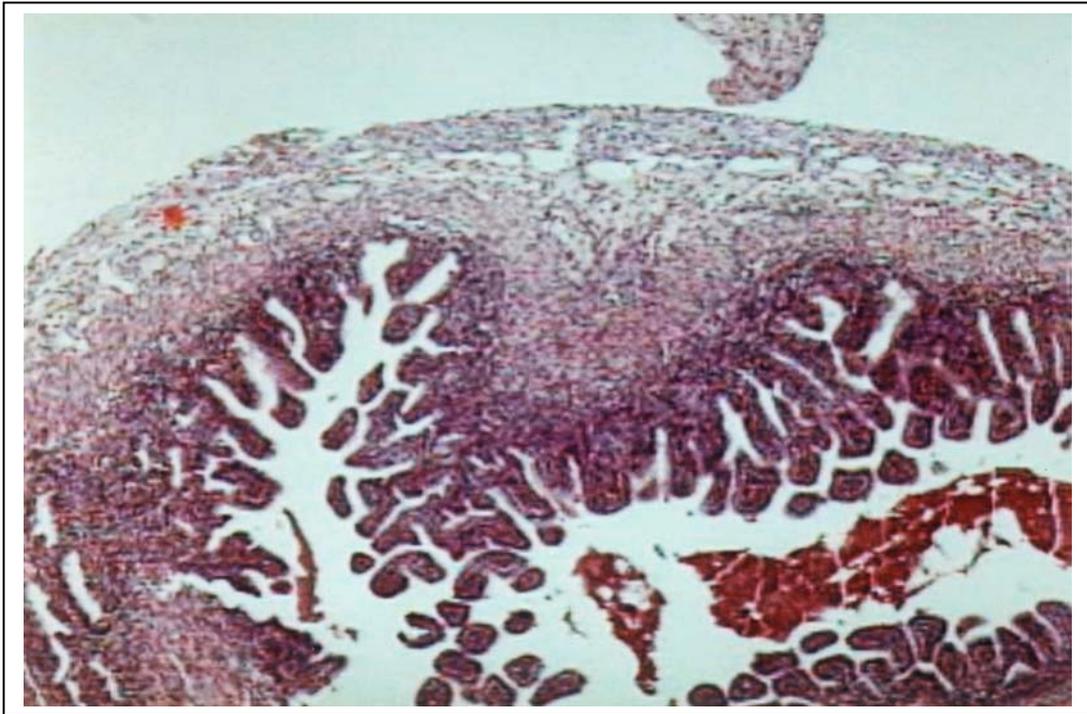


Fig. 45 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (100x). Observar espessamento da parede, e os sinais de enterite severa, com infiltrado inflamatório na mucosa

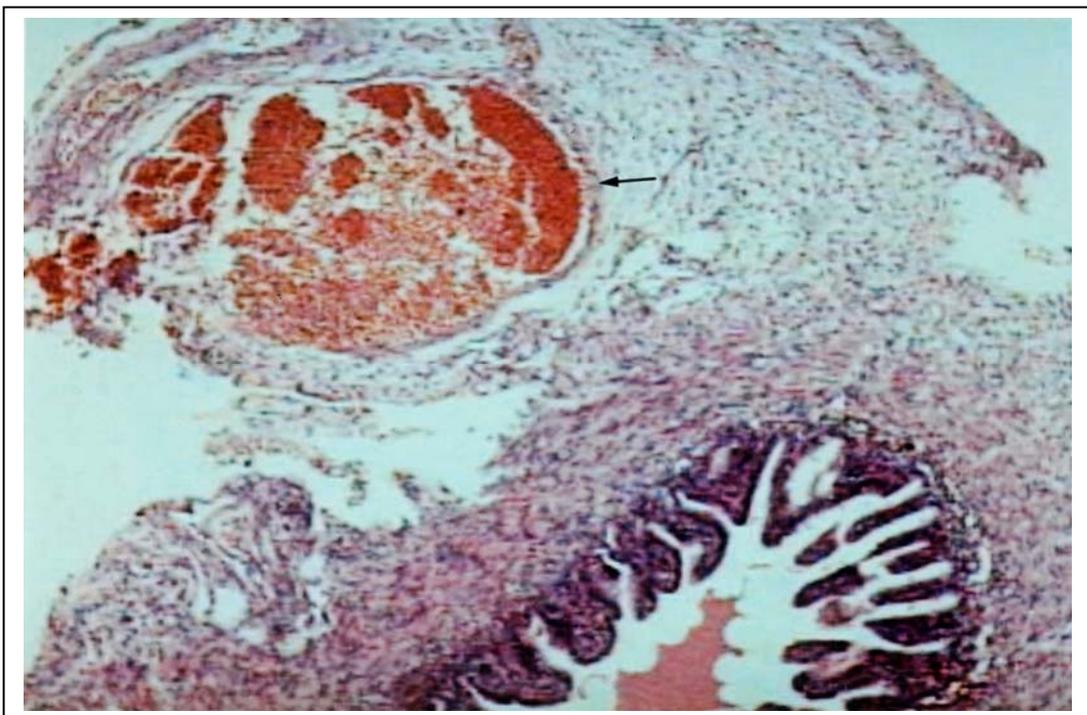


Fig. 46 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (100x). Observar a congestão dos vasos do mesentério (seta)

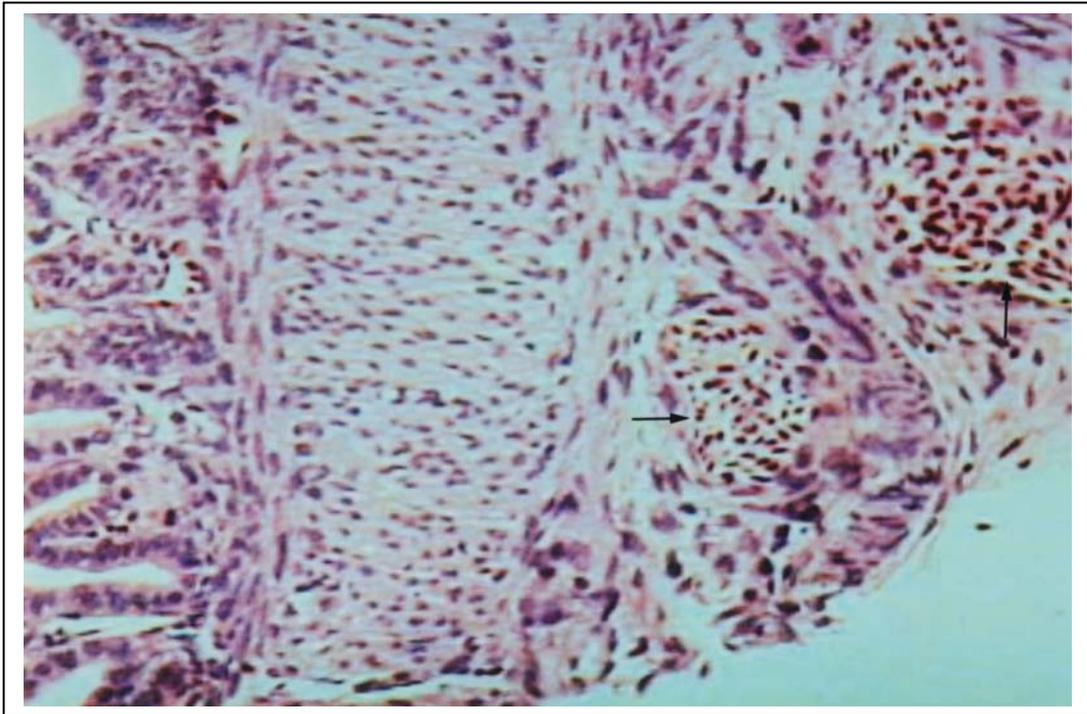


Fig. 47 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x). Serosite severa. Observar o infiltrado inflamatório na serosa (setas)

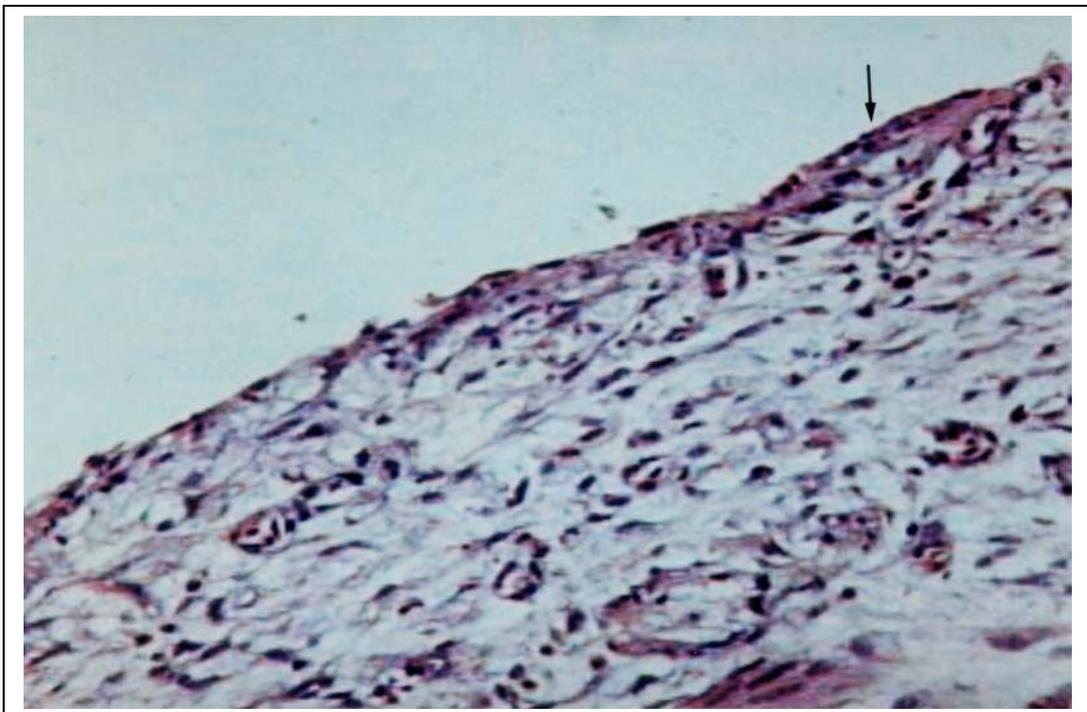


Fig. 48 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x). Observar espessamento da serosa e infiltrado inflamatório e fibrina

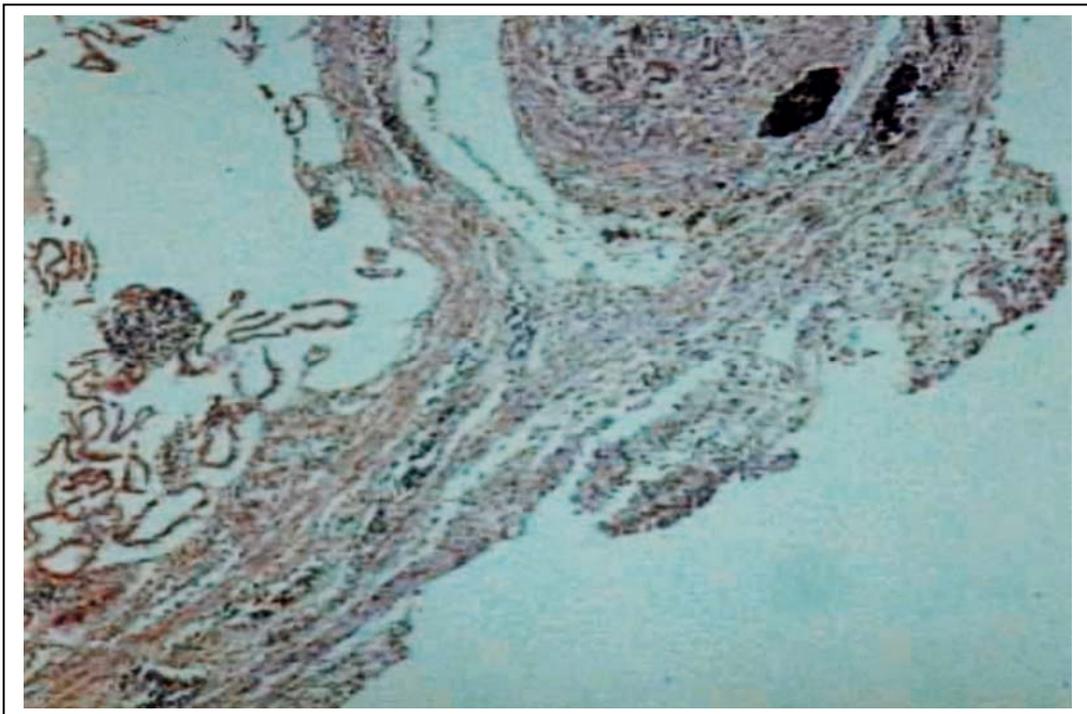


Fig. 49 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (100x). Observar a necrose de toda a parede intestinal e o depósito de fibrina sobre a serosa. Desorganização da estrutura normal da parede

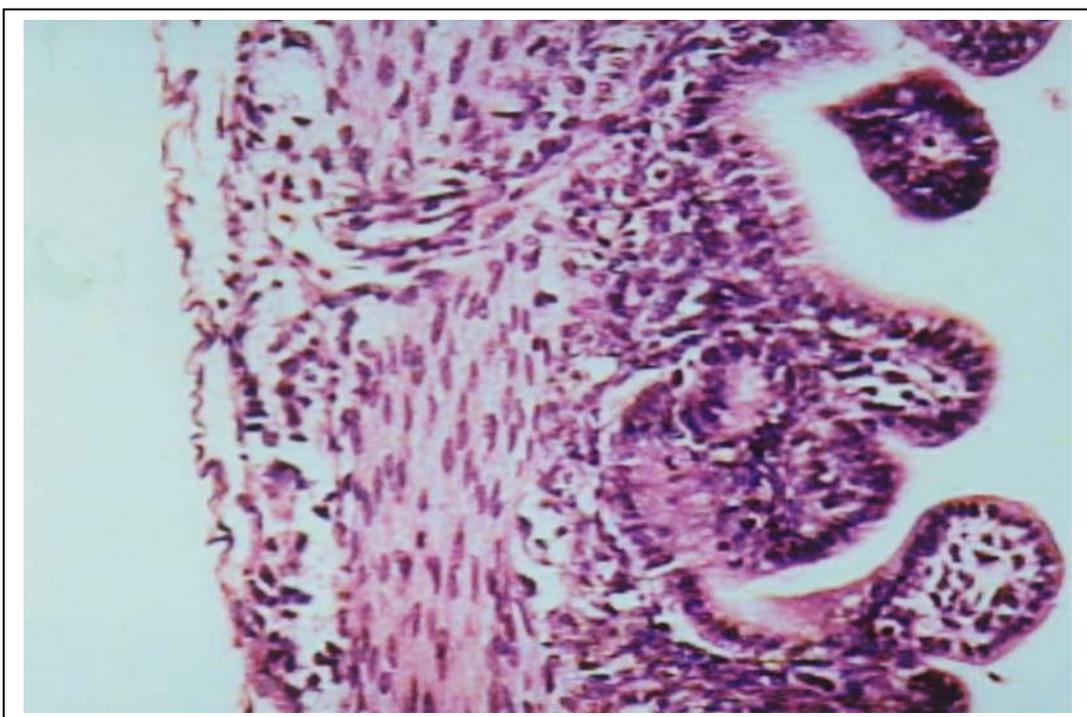


Fig. 50 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x). Observar infiltrado inflamatório na serosa e também na mucosa (enterite)

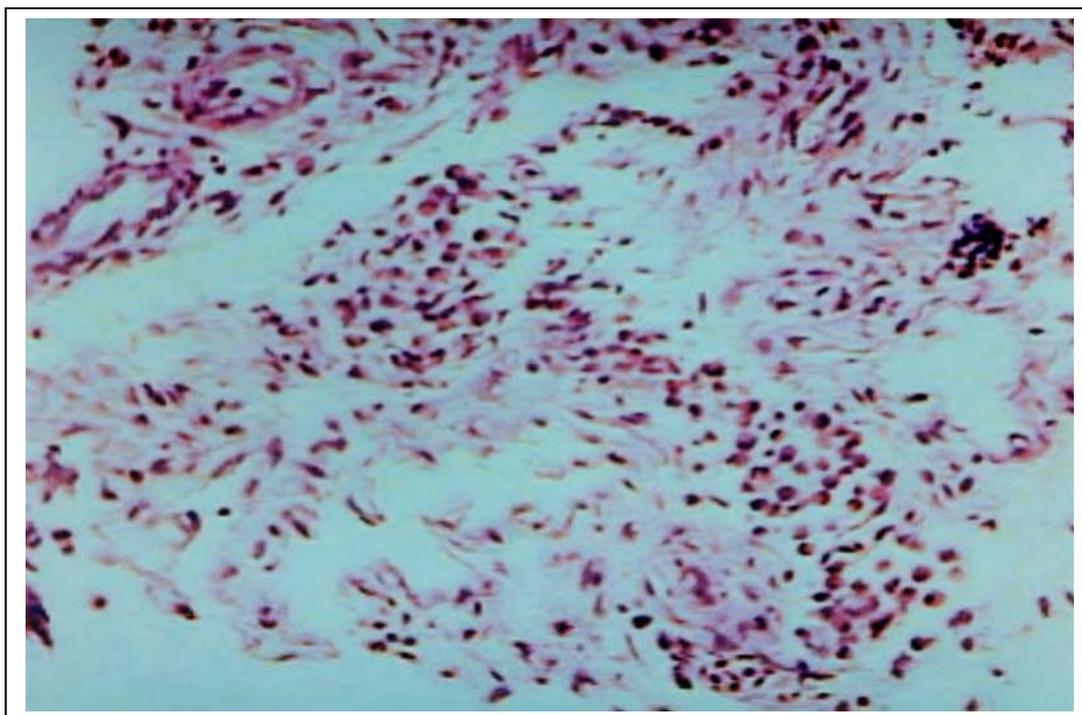


Fig. 51 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x). Observar intenso infiltrado inflamatório do mesentério

A tabela 8 apresenta as médias dos escores de avaliação histopatológica obtidos pelos três grupos em estudo.

Tabela 8 - Análise histológica das alças do intestino delgado dos 3 grupos, baseado no escore padronizado da tabela 5 (média \pm desvio padrão)

Achados	Grupos			P
	G	M	C	
	n = 18	n = 12	n = 10	
Serosite	2,17 \pm 0,79 ^a	0,25 \pm 0,45 ^b	0,3 \pm 0,48 ^b	< 0,001
Enterite	1,83 \pm 1,04 ^a	0,25 \pm 0,45 ^b	0,3 \pm 0,67 ^b	< 0,001
Necrose	0,94 \pm 1 ^a	0 ^b	0 ^b	< 0,001
Peel	1,28 \pm 1,07 ^a	0 ^b	0 ^b	< 0,001
Total	6,22 \pm 3^a	0,5 \pm 0,8^b	0,6 \pm 0,84^b	< 0,001

Letras índice não-coincidentes apresentam diferenças estatisticamente significativas.

A comparação dos escores obtidos pelos 3 grupos mostrou diferença estatisticamente significativa para todos os parâmetros do grupo G em relação aos demais.

4.6 - Número de Plexos Nervosos

O número de plexos nervosos da parede intestinal foi contado (figuras 52 e 53) e a tabela 9 apresenta os resultados.

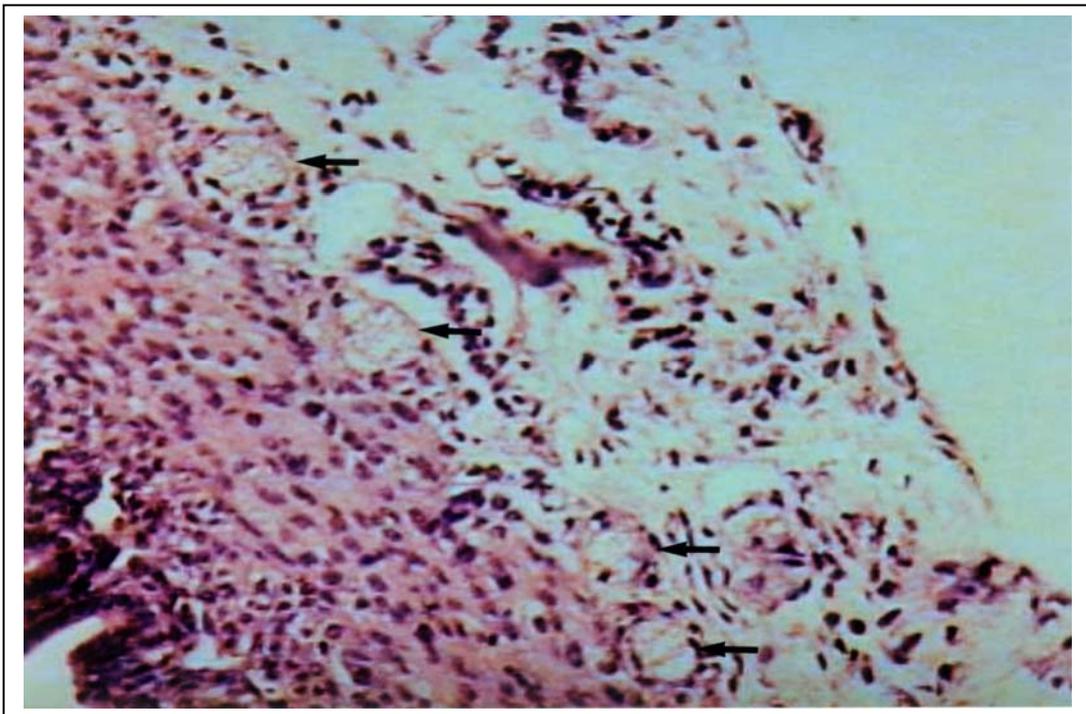


Fig. 52 - Corte histológico do intestino exposto de embrião do grupo G, (400x). Observar os plexos nervosos mioentéricos (setas)

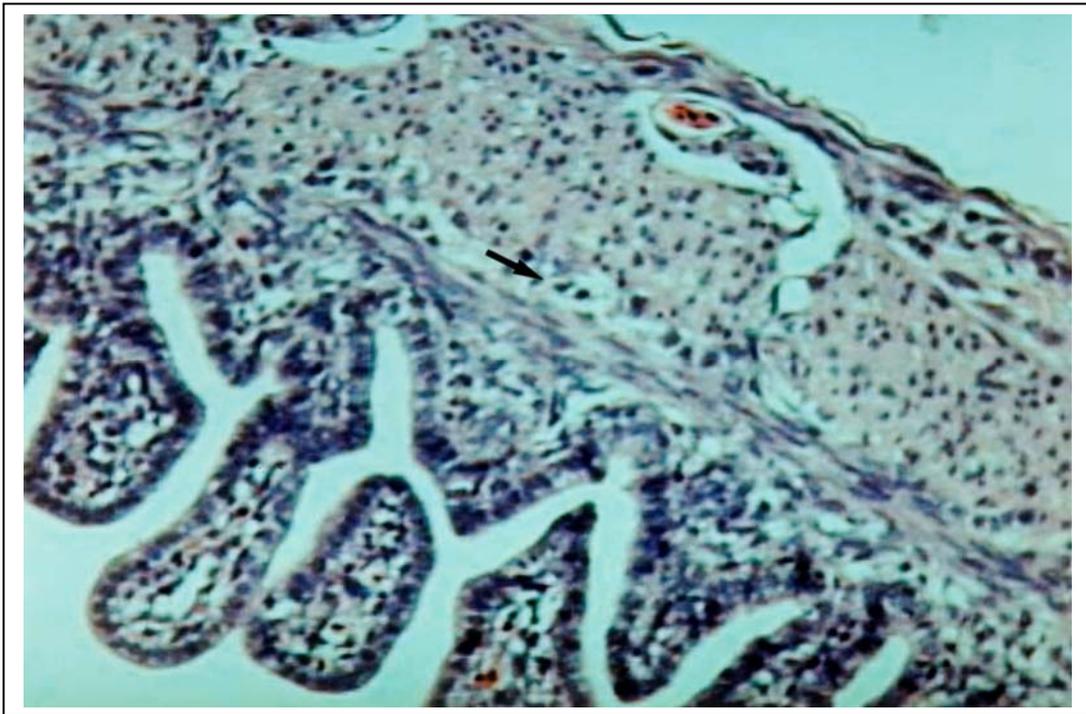


Fig. 53 - Corte histológico do intestino de embrião do grupo M, (400x). Observar o plexo nervoso mioentérico (seta)

Tabela 9 - Número de plexos nervosos por corte de intestino (média \pm desvio padrão)

	Grupos			P
	G	M	C	
	n = 13	n = 12	n = 10	
Plexos Nervosos	12,23 \pm 3,92	11,5 \pm 3,15	11,1 \pm 2,23	0,69

Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de plexos nervosos nos 3 grupos estudados.

Em 5 amostras do grupo G, as condições técnicas da preparação histológica não permitiram uma contagem precisa do número de gânglios, tendo sido esses casos excluídos.

4.7 - Espessura Intestinal

A tabela 10 apresenta as médias dos resultados obtidos das medidas da espessura da parede intestinal total e de suas diferentes camadas, mediante análise morfométrica digital (figura 54).

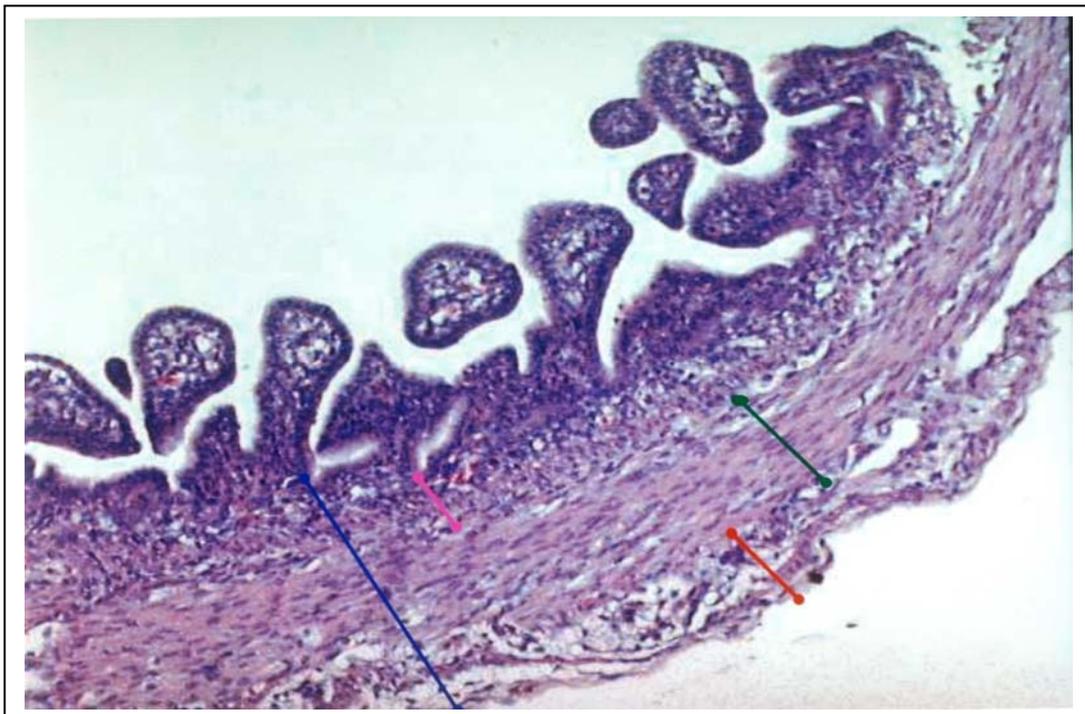


Fig. 54 - Corte histológico do intestino de embrião do grupo C, (40x). Demonstração das camadas intestinais medidas pela morfometria digital (azul: espessura total; rosa: mucosa; vermelho: serosa; verde: muscular)

Tabela 10 - Medidas de espessura intestinal em micrômetros

Camadas	Grupos			P
	G	M	C	
	n = 18	n = 12	n = 10	
Mucosa	187,13 ± 16,45 ^a	175,31 ± 12,77 ^b	176,85 ± 7,71 ^{a, b}	0,048
Muscular	173,76 ± 71,98	194,73 ± 57,97	181,68 ± 52,87	0,679
Serosa	96,98 ± 25,57 ^a	62,41 ± 14,26 ^b	51,7 ± 10,76 ^c	0,001
Total	457,86 ± 75,34	432,46 ± 54,27	410,24 ± 45,64	0,163

Letras-índice não-coincidentes apresentam diferenças estatisticamente significativas

Os valores da espessura intestinal mostraram uma diferença estatisticamente significativa nas medidas da serosa e da mucosa. A espessura da muscular não apresentou diferença.

Encontrou-se diferença na espessura total entre os grupos G e C, no entanto essa diferença (que pode ser considerada de tamanho moderado), não atingiu significância estatística clássica. No entanto, ao realizar-se uma análise de regressão linear, por estarem os grupos ordenados por magnitude de efeito, constatou-se uma significância limítrofe ($P = 0,056$). Isto quer dizer que, à medida que a exposição do embrião ao líquido amniótico modificado aumenta, maior é a espessura observada na parede do intestino.

A figura 55 contém os gráficos de espessuras intestinais nos três grupos em estudo.

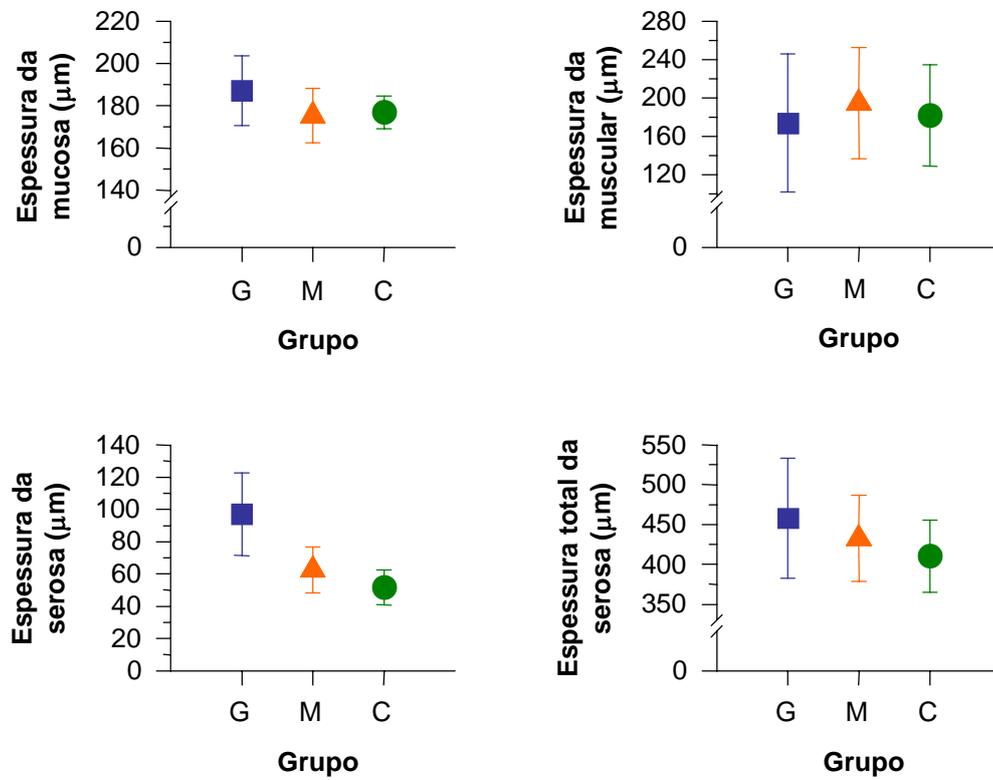


Fig. 55 - Gráficos de média e barra de erro (\pm desvio padrão) representando a comparação das medidas de espessuras intestinais. (G: gastroquise; M: mistura; C: controle)

5 - DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

A prevalência global de gastrosquise vem aumentando na última década, falando-se até em “epidemia da gastrosquise”¹⁴. Em contrapartida, avanços significativos foram alcançados nas diferentes áreas de atenção aos pacientes. As questões ainda pendentes quando ao manejo são hoje matéria de intenso estudo por pesquisadores de todo o mundo, e modelos experimentais em animais são parte fundamental das pesquisas.

O objetivo deste estudo foi o de reproduzir e, desta forma, avaliar o modelo experimental em embriões de galinha, testando a hipótese de que este modelo animal seria capaz de desenvolver achados intestinais compatíveis com a gastrosquise humana.

O embrião de galinha tornou-se o modelo experimental de gastrosquise em pelos menos dois grandes centros de pesquisa: Holanda e Turquia.

Sem dúvida, suas principais vantagens são o baixo custo de execução do experimento, o descarte fácil, a dispensa de anestesia e reduzido o material cirúrgico utilizado.

O embrião de galinha é um modelo único, principalmente porque o procedimento pode ser realizado no período em que o intestino protui pela hérnia do cordão umbilical¹⁵, e pelo fato de o líquido amniótico estar livre de dejetos urinários e intestinais fetais que estão contidos no saco alantóide. Assim sendo, pode-se optar por criar uma gastrosquise misturando ou não os dejetos cloacais do embrião ao líquido

amniótico, basicamente na dependência do momento do desenvolvimento embrionário em que se realiza o procedimento. Criar uma gastrosquise banhada somente por líquido amniótico, sem dejetos, pode ser útil quando se quer testar separadamente substâncias irritantes ao intestino, como urina e mecônio humanos³¹.

Outra vantagem é a de que, no embrião de galinha, a gastrosquise pode ser realizada em estágios precoces do desenvolvimento^{16, 19, 31} como se acredita ser sua embriogênese^{18, 19}.

Os custos com este modelo experimental são sensivelmente mais baixos do que com outros animais, os ovos de galinha embrionados são de baixíssimo custo e os gastos com incubação e procedimento cirúrgico também são modestos. O alto custo é a principal desvantagem dos modelos que empregam ovelhas.

As principais desvantagens do embrião de galinha como modelo experimental se situam na alta taxa de mortalidade e nas diferenças observadas nas membranas embrionárias e na composição do líquido amniótico.

Uma das críticas ao modelo em galinhas seria que a composição do líquido amniótico e do sangue seria distinta da dos mamíferos, em especial o homem. A osmolaridade plasmática e do líquido amnioalantóide do embrião de galinha é realmente menor que em humanos⁷¹, porém o comportamento do líquido amnioalantóide e do líquido amniótico humano se assemelha. Ambos apresentam diminuição dos níveis de sódio e elevação na concentração de potássio, uréia e creatinina, relacionadas ao início do pleno funcionamento renal, que acontece ao redor do 15^o dia nos embriões de galinha e na 30^a semana nos fetos humanos¹⁹.

Outra desvantagem do modelo é a dificuldade técnica em obter espécime de intestino no qual se possa medir o comprimento e, dessa forma, calcular a densidade, como realizado por Kubaski⁹². As alças intestinais, no presente estudo, na

maioria das vezes estavam agrupadas e aderidas, o que impossibilitou a medida do seu comprimento.

Quando comparados com o modelo experimental em ratos desenvolvido por Correia-Pinto *et al.*⁹⁵, os embriões de galinha têm a vantagem de ser animais maiores (o peso do embrião de galinha no 19^o dia é cinco vezes maior que o do feto de rato no 21^o dia embrionário). Sem dúvida, os ratos talvez sejam os animais com os quais os pesquisadores tenham maior experiência, porém, apesar das vantagens citadas pelos autores, como modelos experimentais de gastrosquise os fetos de rato são animais pequenos. Mesmo o trabalho de Correia-Pinto *et al.*⁹⁵ necessitou da utilização de microscópio (16x de aumento) para realizar o procedimento.

A infecção seguida de abortamento foi uma complicação observada em modelos experimentais em coelhos^{89, 92}. Nos embriões de galinha deste estudo, a contaminação não foi considerada, pois os ovos de galinha são estruturas colonizadas por germes, no seu exterior e interior. Para reduzir as perdas, os criadores utilizam métodos para controlar a contaminação, como vaporização com formalina, com permanganato de potássio ou banho em solução com antibióticos⁹⁶. Nenhum desses métodos, porém, foi utilizado nesta pesquisa, uma vez que o uso de produtos poderia causar danos ao embrião. Ovos de galinha contaminados são fáceis de ser identificados pelo odor característico, e os embriões não resistem à infecção.

A escolha do melhor momento para realizar gastrosquise em embriões de galinha leva em conta muitos fatores. Como este experimento desejava criar condições de líquido amniótico que se assemelhassem ao humano, o procedimento deveria ser realizado após o 7^o dia de desenvolvimento¹⁶. Porém embriões de 7 dias são animais pequenos¹¹² e de difícil manipulação sem microscópios ou lupas cirúrgicas³¹.

A opção por realizar o procedimento no 13^o dia foi baseada na maioria dos trabalhos que consideraram a data ao redor desse dia como a ideal^{14, 15, 28, 30, 31, 71}. Da mesma forma, o final do procedimento foi realizado no 19^o dia para proporcionar um período relativamente longo de exposição das alças intestinais ao líquido amniótico e porque, no 20^o e 21^o dias, o embrião cresce significativamente, começa a movimentar-se intensamente no interior do ovo, a quantidade de líquido diminui e existe o risco de o intestino eviscerado aderir a outras estruturas. Entretanto, autores^{16, 71} já demonstraram que, quanto mais precocemente se realiza a gastrosquise, maior é a sobrevida.

A decisão de realizar a abertura do coto umbilical do embrião ao invés de fazê-lo na parede abdominal, para promover a saída das alças, baseou-se no estudo de Aktug *et al.*¹⁵, que comparou esses dois procedimentos e demonstrou que os achados histopatológicos das alças intestinais do grupo em que se realizava uma abertura do coto umbilical, eram mais representativos da gastrosquise.

Os embriões onde se realiza a gastrosquise através da abertura da parede abdominal desenvolvem nítidas alterações isquêmicas do intestino, como se o anel na parede tivesse exercido constrição sobre o mesentério das alças extrusas e levado à necrose intestinal com completa cicatrização do defeito¹⁵. Esse fato também é observado em humanos, existindo relatos de fetos com diagnóstico de gastrosquise em ecografias pré-natais e que nascem com o abdômen sem defeito e com atresia intestinal associada (*vanishing bowel*)^{65, 115, 116}. A constrição do defeito pode ser explicada pela cicatrização das bordas da pele e dos tecidos da parede abdominal como músculo e aponeurose. Sabe-se, atualmente, que o processo de cicatrização intra-útero ocorre de maneira distinta do observado fora do útero¹¹⁷. Ferimentos da pele intra-uterinos resolvem sem formar cicatriz, mas feridas no estômago ou em

músculos como o diafragma produzem importantes cicatrizes cobertas por fibrina, efeito esse que os estudos atribuem ao contato com o líquido amniótico^{117, 118, 119} Porém algum mecanismo de autoproteção deve estar envolvido, salvaguardando o cordão umbilical, pelo fato de que, nos defeitos umbilicais, se os bordos do coto umbilical cicatrizassem em contato com o líquido amniótico, isso colocaria em risco a vida do feto já que faria constrição sobre o vasos umbilicais.

A sobrevida observada neste estudo é considerada baixa mesmo em comparação com a de outros estudos em embriões de galinha. A tabela 11 compara a sobrevida dos animais em vários trabalhos experimentais.

Tabela 11 - Sobrevida dos modelos experimentais de gastrosquise

Autor / Ano	Animal	Sobrevida ao experimento (%)
Haller ⁹³ / 1974	Ovelha	48,7
Langer <i>et al.</i> ⁶¹ / 1989	Ovelha	42,8
Aoki <i>et al.</i> ⁹⁰ / 1980	Coelho	15, 23,56 ^a
Phillips <i>et al.</i> ⁹¹ / 1991	Coelho	78
Albert <i>et al.</i> ⁷⁵ / 1993	Coelho	38,1
Kubaski ⁹² / 1994	Coelho	73,3
Santos ⁸⁵ / 2000	Coelho	86,9
Correia-Pinto <i>et al.</i> ⁹⁵ / 2001	Rato	90,6
Klück <i>et al.</i> ¹⁶ / 1983	Galinha	32 ^b (6 ^c)
Lopez de Torre <i>et al.</i> ⁷¹ / 1991	Galinha	51 ^b (22,8 ^c)
Aktug <i>et al.</i> ¹⁴ / 1995	Galinha	41 ^c
Aktug <i>et al.</i> ¹⁵ / 1997	Galinha	87 (80 ^c)
Dilsiz <i>et al.</i> ³⁰ / 1999	Galinha	36,6 ^c
Gandara / 2002	Galinha	11,1 ^b (8,7 ^c)

^a Taxa de sobrevida variável em decorrência de diferentes momentos da gestação em que foi realizado o procedimento.

^b Sobrevida global de embriões de galinha ao procedimento (com e sem gastrosquise).

^c Sobrevida de embriões com gastrosquise em relação ao número total de embriões submetidos ao procedimento.

Um fato relevante observado no presente estudo foi o de que a sobrevida dos embriões aumentou à medida que se diminuía o número de viragens dos ovos (de 3 para 1 vez ao dia), o que pode se dever ao fato de se reduzir também o número de vezes em que a incubadora foi aberta, tornando menor assim, a perda de calor e umidade. Porém o número de viragens dos ovos não foi uma variável controlada.

Uma maior sobrevida foi observada também nos últimos grupos em que se realizou o procedimento, fato que acredita-se estar relacionado à curva de aprendizado cirúrgico na realização da gastrosquise.

A elaboração do gancho para manipulação e tração do cordão umbilical foi fundamental para evitar lesões ao embrião. Com o gancho é possível abrir as membranas de maneira romba e com pouco sangramento, tornando-se, dessa forma, a tração sobre os vasos umbilicais também mais segura. Não há na literatura pesquisada relatos de sua utilização.

A utilização de microscópio e de material de microcirurgia (pinças e tesouras) é uma opção ao material empregado neste estudo; certamente a manipulação mais delicada dos embriões resultará em menor mortalidade.

Comparativamente houve diferença estatística entre a sobrevida do grupo G e do grupo M, basicamente, acredita-se, em decorrência da manipulação (tração e dissecação) do cordão umbilical e dos vasos (artéria e veia umbilicais), já que a diferença entre esses dois grupos aí se situa. Em outros trabalhos^{15, 16} que adotaram o mesmo modelo experimental, a manipulação do cordão, com conseqüente espasmo ou sangramento dos vasos umbilicais, foi considerada a principal causa de morte do embrião.

A perfuração do saco da gema foi o acidente cirúrgico mais comum no grupo G, fato que determinou, obrigatoriamente, interromper-se o procedimento e despre-

zar o embrião, visto que essa lesão provoca a mistura indesejável dos nutrientes da gema com o líquido amniótico, modificando-o. A fratura da casca do ovo leva à perda de líquido amniótico, e a lesão dos vasos umbilicais produz intenso sangramento e morte do embrião.

Outro importante aspecto a ser discutido é o fato de que, em modelos experimentais de ratos e coelhos, com frequência se observa a evisceração do fígado, estômago, intestino grosso, bexiga e até mesmo rins pelo defeito^{89, 90, 91, 92}, enquanto no embrião de galinha ocorre somente a evisceração do intestino delgado, parecendo representar melhor o que acontece na maioria dos pacientes com gastrosquise.

Existe uma intensa troca entre o embrião em desenvolvimento e o meio, através da casca do ovo. Oxigênio é absorvido pela membrana corio-alantoíde e chega até o embrião que excreta gás carbônico e água pelos poros da casca, com consequente diminuição do peso do ovo durante a incubação. Em virtude disso, realizou-se o controle do peso do ovo no início e no final do estudo. Apesar da abertura do ovo e da manipulação, não houve diferença de peso nos três grupos estudados, significando que as trocas através da casca foram semelhantes.

Uma diferença foi detectada no comprimento do ovo do grupo M. A intenção inicial foi a de que os grupos fossem iguais, principalmente na forma do ovo, razão pela qual se optou pela randomização. Porém, como os outros parâmetros de largura e peso se mantiveram sem diferença entre os grupos, esta observação não deve ter sido relevante.

O fato do peso do embrião ter sido menor no grupo G em relação aos grupos M e C demonstrou que a exposição das alças intestinais no modelo experimental promoveu o baixo peso, que é uma característica comum da gastrosquise^{5, 6, 8, 120, 121, 122, 123, 124, 125}. Em embriões de galinha, a alimentação por via transamniótica consti-

tui-se em significativa parcela de sua nutrição e, ao contrário das gestações em humanos, o líquido amniótico do embrião de galinha tem altos níveis de proteínas⁷¹. Explicações para o baixo peso poderiam ser a alteração do líquido amniótico pela mistura com o líquido alantóide, a dificuldade de trânsito intestinal e a alta taxa catabólica à qual são submetidos os embriões no procedimento¹⁴.

Da mesma forma, a relação PE/PO foi menor no grupo G. O controle dessa relação é útil para diminuir as variações possíveis nos pesos dos ovos. Este método é adotado pelos criadores^{96, 98} e foi utilizado também por Dilsiz *et al.*³⁰ e Aktug *et al.*¹⁴.

O funcionamento normal do trato gastrointestinal parece ser um fator essencial no crescimento intra-uterino, e recém-nascidos com gastrosquise são pequenos para idade gestacional provavelmente em virtude disso^{125, 126}. Assim, se justifica um rigoroso controle do bem estar fetal durante a gestação como forma de identificar e tentar controlar situações de sofrimento fetal, dilatação de alças intestinais e retardo do crescimento¹²⁷.

A análise histológica realizada através do escore padronizado mostrou ser o Grupo G distinto, em todos os aspectos avaliados, dos grupos M e C. Sem dúvida, a exposição do intestino ao líquido amnioalantóide foi a causa dessa diferença. Em todos os estudos em embriões de galinha como modelo para gastrosquise, alterações como serosite, enterite, necrose e formação do *peel* são observadas em diferentes graus^{14, 15, 16, 27, 28, 30, 31, 71}.

A serosa mostrou ser o local de maiores alterações, certamente por ser a superfície em real contato com o líquido amnioalantóide. Também, no estudo em fetos humanos realizado por Amoury *et al.*⁸⁴, foi a serosa que mostrou o maior comprometimento, com edema e acúmulo de colágeno e fibrina (*peel*). Nos modelos de ovelha

de Haller *et al.*⁹³, houve uma importante hipertrofia do peritônio visceral. Edema subseroso e formação de *peel* parecem ser achados constantes em humanos e nos embriões de galinha^{84, 18, 19, 20}. Langer *et al.*⁶¹ descreveram uma intensa reação inflamatória, com tecido de granulação e neovascularização na serosa de seu modelo em ovelhas, que também foi encontrado no presente estudo.

Comparando com os modelos em fetos de coelho, o embrião de galinha consegue reproduzir os achados de formação de *peel*, o que não é demonstrado nos experimentos com coelhos^{85, 92}. Em virtude do *peel* ser considerado um elemento importante na caracterização do intestino da gastrosquise, sendo, inclusive, associado aos distúrbios da motilidade intestinal^{61, 68, 69, 94}, os modelos em coelhos falham nesse aspecto. Possivelmente o tempo de exposição do intestino ao líquido amniótico não seja suficiente para desenvolver o *peel* em coelhos.

Espécimes de intestino de gastrosquise humana têm mostrado uma mucosa de aspecto normal⁸⁴, o que também se repetiu nos modelos de embrião de galinha de Kluck *et al.*¹⁶ e Tibboel *et al.*¹⁸. No presente estudo, a mucosa exibiu graus variados de enterite inespecífica, achado compartilhado também em modelos de coelho^{89, 92}. Já Haller *et al.*⁹³ demonstraram sérias alterações na produção de enzimas da mucosa.

Alterações isquêmicas foram observadas nos espécimes do Grupo G, consistindo de necrose da mucosa e áreas de necrose parietal. Tais alterações que não são vistas em outros modelos^{85, 90, 92, 93}, já foram descritas por Tibboel *et al.*¹⁸ e Aktug *et al.*¹⁵. Essas áreas isquêmicas podem ser explicadas por constrição das alças de intestino, e conseqüentemente do mesentério, no anel formado pela cicatrização do defeito se este se estendeu além do coto umbilical, na parede abdominal do embrião. A isquemia poderia explicar as atresias intestinais associadas, o *vanishing* do

intestino e o alto percentual de cicatrização dos defeitos observados no presente estudo e em outros relatos da literatura^{15, 16, 71}.

A simples contagem do número de plexos nervosos mioentéricos não mostrou diferença nos três grupos deste estudo. Isto se repete em outros trabalhos com diversos modelos experimentais^{18, 19, 20, 92} e na série de gastrosquise em humanos de Amoury *et al.*⁸⁴. Porém Haller *et al.*⁹³, em seu modelo em ovelhas, conseguiram demonstrar lesão nas células ganglionares mioentéricas e progressiva redução da atividade da ATPase nas camadas musculares da parede intestinal, justificando assim as alterações do peristaltismo. Recentemente, Santos⁸⁵ aprofundou a análise sobre os plexos mioentéricos do modelo de gastrosquise em coelhos, utilizando técnicas histoquímicas especiais, e identificou nítida deficiência de maturação neuronal no intestino.

A opção por se utilizar a análise morfométrica digital para avaliar a espessura do intestino se baseou no fato de que os espécimes de intestino de embriões de galinha são estruturas pequenas e delicadas à manipulação, o que tornou difíceis, inclusive, os processo de preparação histológica. A totalidade dos autores consultados utilizou a régua microscópica para medir a espessura intestinal dos modelos experimentais^{27, 28, 30, 31, 92}, porém em espécimes tão pequenos esse método comparativo poderia gerar um importante viés de aferição. Baseado nos artigos de Gheri e Bryk^{107,108}, que utilizaram morfometria digital para estudo do intestino de embriões de galinha normais, deu-se preferência por essa técnica.

A serosa foi a camada da parede intestinal que apresentou maior espessamento no grupo G quando comparado com os grupos M e C. A camada muscular não mostrou espessamento, o que também não foi visto nos estudos de Kluck *et al.*¹⁶ e Tibboel *et al.*¹⁸. O espessamento da parede intestinal é atribuído às enzimas pro-

venientes do trato gastrointestinal do embrião, como a fosfatase alcalina, as dissacaridasas e a tripsina, dissolvidas no líquido em contato com as alças^{128, 129}. O interessante é que essas substâncias estão presentes no líquido amniótico de gestações humanas normais, mas ausentes quando o feto apresenta atresia intestinal ou fibrose cística. Nos embriões de galinha foi demonstrada também a presença de sais biliares e bilirrubina na mistura de líquidos²⁷.

Qual dessas substâncias estaria diretamente envolvida com os achados, ou em que proporção cada uma delas participa são questões que necessitam de mais estudos para serem respondidas. De qualquer forma, o embrião de galinha se constitui num bom modelo para tais investigações.

———— 6 - CONCLUSÕES ————

6 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível estabelecerem-se as conclusões a seguir:

- modelo experimental da gastrosquise em embriões de galinha é passível de ser reproduzido, nas condições deste estudo.
- A taxa de sobrevivência dos embriões ao experimento foi de 11,1%, e a de sobrevivência dos embriões com gastrosquise, de 8,7%.
- Os embriões com gastrosquise apresentaram baixo peso.
- As alterações histológicas observadas são comparáveis às da gastrosquise humana e não estavam presentes no intestino não-exposto ao líquido amniocelotóico. São elas:
 - sinais histopatológicos de serosite, enterite, formação de *peel* e áreas de necrose em diferentes graus de intensidade;
 - espessamento das camadas serosa e mucosa intestinais;
 - aumento da espessura total da parede intestinal;
 - plexos nervosos mioentéricos quantitativamente normais.

7 - PERSPECTIVAS

7 - PERSPECTIVAS

***C'est un malade
(Eis a doença!)***

*Exclamação atribuída a **J.M. Charcot**, ao ser demonstrado o modelo experimental do acidente vascular cerebral, por destruição do córtex de macacos, durante o 7^o Congresso Médico Mundial em Londres, 1881.*

Desenvolvido o modelo experimental para o estudo da gastrosquise em embriões de galinha, deve-se agora prosseguir com as pesquisas na busca de alternativas e soluções para os problemas descritos na introdução desta dissertação:

- gênese da gastrosquise;
- estudo da maturação neuronal;
- novas terapias, como o uso de corticoesteróides e anti-inflamatórios sistêmicos ou no líquido amniótico;
- modificação do líquido amniótico como forma de reduzir a lesão intestinal;
- estudo da formação e da estrutura do *peel*.

—— 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ——

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Curry JI, McKinney P, Thornton JG, Stringer MD. The aetiology of gastroschisis. *BJOG* 2000; 107(11) 1339-46.
2. Irving IM, Rickham PP. Umbilical abnormalities. In: Rickham PP. Lister J. Irving IM. *Neonatal surgery*. 2nd ed. London, 1978; p.309-33.
3. Maciel EO. Enterocolite necrosante: o uso de nitroglicerina em um modelo experimental de isquemia-reperfusão. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 1997.
4. de Souza JC, da Motta UI, Ketzer CR. Prognostic factors of mortality in newborns with necrotizing enterocolitis submitted to exploratory laparotomy. *J Pediatr Surg*. 2001; Mar;36(3):482-6.
5. Vilela PC, Ramos De Amorim MM, Falbo GH, Santos LC. Risk factors for adverse outcome of newborns with gastroschisis in a Brazilian hospital. *J Pediatr Surg*. 2001; Apr;36(4):559-64.
6. Driver CP, Bruce J, Bianchi A, Doig CM, Dickson AP, Bowen J. The contemporary outcome of gastroschisis. *J Pediatr Surg* 2000; 35(12) 1719-23.
7. Ameh EA, Chirdan LB. Ruptured exomphalos and gastroschisis: a retrospective analysis of morbidity and mortality in Nigerian children. *Pediatr Surg Int*. 2000; 16(1-2):23-5.

8. Haddock G, Davis CF, Raine PAM. Gastroschisis in the decade of prenatal diagnosis: 1983-1993. *Eur J Pediatr Surg* 1996; 6: 18-22.
9. Davies MRQ, Beale PG. The pivotal role of the surgeon in the results achieved in gastroschisis. *Pediatr Surg Int* 1996; 11: 82-5.
10. Snyder CL. Outcome analysis for gastroschisis. *J Pediatr Surg*. 1999; Aug;34 (8):1253-6.
11. Dimitriou G, Greenough A, Mantagos JS, Davenport M, Nicolaidis KH. Morbidity in infants with antenatally-diagnosed anterior abdominal wall defects. *Pediatr Surg Int*. 2000; 16(5-6):404-7.
12. Molik KA, Gingalewski CA, West KW, Rescorla FJ, Scherer LR, Engum SA, Grosfeld JL. Gastroschisis: a plea for risk categorization. *J Pediatr Surg*. 2001; Jan;36(1):51-5.
13. Clausner A, Lukowitz A, Rump K, berger S, Wurfel A. Treatment of congenital abdominal wall defects – a 25-year review of 132 patients *Pediatr Surg Int*. 1996; 11: 76-81.
14. Aktug T, Erdag G, Kargi A, Akgür F, Tibboel D: Amnio-allantoic exchange for the prevention of intestinal damage in gastroschisis: A experimental study on chick embryos. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 384-387.
15. Aktug T, Hosgör M, Akgür FM, Olguner M, Kargi A, Tibboel D. End-results of experimental gastroschisis created by abdominal wall versus umbilical cord defect. *Pediatr Surg Int* 1997; 12: 583-586.
16. Klück P, Tibboel D, van der Kamp AWM, Molenaar JC. The effect of fetal urine on the development of the bowel in gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1983; 18(1): 47-50.

17. Tibboel D, Molenaar JC, Van Nie CJ. New perspectives in fetal surgery: The chicken embryo. *J Pediatr Surg* 1979; 14(4): 438-50.
18. Tibboel D, Raine P, McNee M, Azmy A, Klück P, Young D, Molenaar JC. Developmental aspects of gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1986; 21(10), 865-869.
19. Tibboel D, Klück P, van der Kamp AWM, Vermey-Keers Ch, Molenaar JC. The development of the characteristic anomalies found in gastroschisis – Experimental and clinical data. *Z Kinderchir* 1985; 40: 355-360.
20. Tibboel D, Vermey-keers, Kluck P, Gaillard JLJ, Koppenberg J, Molenaar JC. The natural history of gastroschisis during fetal life: Development of fibrous coating na the bowel loops. *Teratology* 1986; 33:267-272.
21. Molenaar JC, Tibboel D. Gastroschisis and omphalocele. *World J Surg.* 1993; May-Jun;17(3):337-41.
22. Meijers JH, van der Sanden MP, Tibboel D, van der Kamp AW, Luider TM, Molenaar JC. Colonization characteristics of enteric neural crest cells: embryological aspects of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1992; Jul; 27(7):811-4.
23. Meijers JH, Tibboel D, van der Kamp AW, van Haperen-Heuts IC, Molenaar JC. A model for aganglionosis in the chicken embryo. *J Pediatr Surg.* 1989; Jun;24(6):557-61.
24. Meijers JH, Tibboel D, van der Kamp AW, Van Haperen-Heuts CC, Molenaar JC. Cell division in migratory and aggregated neural crest cells in the developing gut: an experimental approach to innervation-related motility disorders of the gut. *J Pediatr Surg.* 1987; Mar;22(3):243-5.

25. Tibboel D, van der Kamp AW, Molenaar JC. The effect of experimentally induced intestinal perforation at an early developmental stage. *J Pediatr Surg*. 1981; Dec;16(6):1017-20.
26. Tibboel D, van Nie CJ, Molenaar JC. The effects of temporary general hypoxia and local ischemia on the development of the intestines: an experimental study. *J Pediatr Surg*. 1980; Feb;15(1):57-62.
27. Aktug T, Uçan B, Olguner M, Akgür F, Özer E: Amnio-Allantoic fluid exchange for prevention of intestinal damage in gastroschisis II: effects of exchange performed by using two different solutions. *Eur J Pediatr Surg* 1988; 8 308-311.
28. Aktug T, Uçan B, Olguner M, Akgur FM, Ozer E, Caliskan S, Onvural B: Amnio-allantoic fluid exchange for the prevention of intestinal damage in gastroschisis III: Determination of the waste products removed by exchange. *Eur J Pediatr Surg* 1988; 8 326-328.
29. Aktug T, Demir N, Akgür FM, Olgumer M. Pretreatment of gastroschisis with transabdominal amniotic fluid exchange. *Obstet Gynecol* 1998; 91(5): 821-823.
30. Dilsiz A, Gündogan AH, Aktan M, Duman S, Aktug T. Nitric oxide synthase inhibition prevents intestinal damage in gastroschisis: a morphological evaluation in chick embryos. *J Pediatr Surg* 1999; 34(8): 1248-1252.
31. Olguner M, Akgür FM, Api A, Özer E, Aktug 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): 458-461.

32. Akgur FM, Aktug T, Hakguder G, Olguner M. Differences between amnioinfusion and amniotic fluid exchange. *J Pediatr Surg.* 2000; Dec;35(12):1846-7.
33. Bax N. Exophalos and gastroschisis. In: Freeman NV, Burge DM, Griffiths DM, Malone PSJ. *Surgery of the newborn.* Churchill Livingstone, 1994; 301-20
34. Toth PP, Kimura K . Left-sided gastroschisis. *J Pediatr Surg.* 1993; Dec; 28(12):1543-4.
35. Maksud JG. Defeitos da região umbilical e paraumbilical, In: Maksud JG, *Cirurgia Pediátrica.* Revinter, Rio de Janeiro, 1998; 674-82.
36. Allen RG, Wrenn EL Jr. Silon as a sac in the treatment of omphalocele and gastroschisis. *J Pediatr Surg.* 1969; Feb;4(1):3-8.
37. Schuster SR. A new method for the staged repair of large omphaloceles. *Surgery Gynec Obstet.* 1967; 125, 837-50.
38. Earlam RJ. A study of the aetiology of congenital stenosis of the gut. *Ann Roy Coll Surg Engl* 1972; 51:126-130.
39. Dommergues M, Ansker Y, Aubry M, Mac Aleese J, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fékété C, Dumez Y: Serial transabdominal amnioinfusion in the management of gastroschisis with severe oligodramnios. *J Pediatr Surg* 1996; 31 1297-1299.
40. Glick PL, Harrison MR, Adzick NS, Filly RA, deLorimier AA, Callen PW. The missing link in the pathogenesis of gastroschisis. *J Pediatr Surg.* 1985; Aug;20(4):406-9.
41. Shaw A. The myth of gastroschisis. *J Pediatr Surg.* 1975; Apr;10(2):235-44.
42. Kluth D, Lambrecht W: The pathogenesis of omphalocele and gastroschisis. An unsolved problem. *Pediatr Surg Int* 1996; 1: 62-66.

43. Duhamel B. Embryology of exomphalos and allied malformations. Arch Dis Child 1963; 38: 142-147.
44. Hutchin P. Somatic abnormalities of the umbilicus and anterior abdominal wall. Surg Gynecol Obstet 1965; 1075-1090.
45. Izant RJ, Brown F, Rothman BF. Current embryology and treatment of gastroschisis and omphalocele. Arch Surg 1966; 93: 49-53.
46. deVries PA. The pathogenesis of gastroschisis and omphalocele. J Pediatr Surg. 1980; Jun;15(3):245-51.
47. Hoyme HE, Higginbottom MC, Jones KL. The vascular pathogenesis of gastroschisis: intrauterine interruption of the omphalomesenteric artery. J Pediatr. 1981 Feb;98(2):228-31.
48. Hoyme HE, Jones MC, Jones KL. Gastroschisis: abdominal wall disruption secondary to early gestational interruption of the omphalomesenteric artery. Semin Perinatol. 1983 Oct;7(4):294-8.
49. Moore KL, Persaud TVN, Embriologia Clínica. 5ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A. – 1994.
50. Werler MM, Mitchell AA, Shapiro S. First trimester maternal medication use in relation to gastroschisis. Teratology. 1992; Apr;45(4):361-7.
51. Werler MM, Mitchell AA, Shapiro S. Demographic, reproductive, medical, and environmental factors in relation to gastroschisis. Teratology. 1992; Apr;45(4):353-60.
52. Bahlmann F, Merz E, Weber G, Macchiella D. Prenatal diagnosis and management of gastroschisis and omphalocele. Pediatr Surg Int. 1996 11: 67-71.

53. Guzman ER. Early prenatal diagnosis of gastroschisis with transvaginal ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 1253-1254.
54. WHO – Collaborating centre for the prevention of congenital malformations – ECLAMC – Estudio colaborativo latinoamericano de malformaciones congénitas – Fundação Oswaldo Cruz – Boletim Informativo de malformações congênitas 1982 - 1999.
55. Leite, JC. Tabelas de Malformações Congênitas do ECALAMC – 2000 – Departamento de Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Comunicação pessoal.
56. Roeper PJ, Harris J, Lee G, Neutra R. Secular rates and correlates for gastroschisis in California (1968-1977). *Teratology* 1987; 35: 203-210.
57. Dolk H, Vrijheid M, Armstrong B, Abramsky L, Bianchi F, Garne E, Nelen V, Robert E, Scott JE, Stone D, Tenconi R. Risk of congenital anomalies near hazardous-waste landfill sites in Europe: the EUROHAZCON study. *Lancet*. 1998; Aug 8;352(9126):423-7.
58. Nelson TC, Toyama WM. Familial gastroschisis: a case of mother-and son occurrence. *J Pediatr Surg*. 1995; Dec;30(12):1706-8.
59. Nielsen OH. The pediatric surgeon and the prenatal diagnosis. *Pediatr Surg Int*. 1995; 11: 1-3..
60. Langer JC, Harrison MR. The fetus with na abdominal wall defect. In: Harrison MR, Golbus MS, Filly RA. *The unborn patient – Prenatal diagnosis and treatment*. 2nd ed. 1991. W.B. Saunders co. Philadelphia. p 453-59.

61. Langer JC, Longaker MT, Crombleholme TM, Bond SJ, Finkbeiner WE, Rudolph CA, Verrier ED, Harrison MR. Etiology of intestinal damage in gastroschisis. I: Effects of amniotic fluid exposure and bowel constriction infetal lamb model. *J Pediatr Surg* 1989; 24(10): 992-997.
62. Johnson JM, Harman CR, Evans JA, MacDonald K, Manning FA. Maternal serum alpha-fetoprotein in twin pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; Apr;162(4):1020-5.
63. Wald NJ, Barlow RD, Cuckle HS, Turnbull AC, Goldfine C, Haddow JE. Ratio of amniotic fluid acetylcholinesterase to pseudocholinesterase as an antenatal diagnostic test for exomphalos and gastroschisis. *Br J Obstet Gynaecol.* 1984; Sep;91(9):882-4.
64. Anveden-Hertzberg L, Gauderer MW. Paraumbilical intestinal remnant, closed abdominal wall, and midgut loss in a neonate. *J Pediatr Surg.* 1996; Jun;31(6):862-3.
65. Celayir S, Besik C, Sarimurat N, Yeker D. Prenatally detected gastroschisis presenting as jejunal atresia due to vanishing bowel. *Pediatr Surg Int.* 1999; 15(8):582-3.
66. Morris-Stiff G, al-Wafi A, Lari J. Gastroschisis and total intestinal atresia. *Eur J Pediatr Surg.* 1998; Apr;8(2):105-6.
67. Klein P, Hummer HP, Wellert S, Faber T. Short-term and long-term problems after duraplastic enlargement of anterior abdominal wall. *Eur J Pediatr Surg.* 1991; Apr;1(2):88-91.

68. Langer JC, Bell JG, Castillo RO, Crombleholme TM, Longaker MT, Duncan BW, Bradley SM, Finkbeiner WE, Verrier ED, Harrison MR. Etiology of intestinal damage in gastroschisis, II. Timing and reversibility of histological changes, mucosal function, and contractility. *J Pediatr Surg* 1990; 25(11): 1122-1126.
69. Langer JC, Bramlett G. Effect of prokinetic agents on ileal contractility in a rabbit model of gastroschisis. *Pediatr Surg*. 1997; Apr;32(4):605-8.
70. Muller F, Dommergues M, Aubry MC, Simon-Bouy B, Gautier E, Oury JF, Narcy F. Hyperechogenic fetal bowel: An ultrasonographic marker for adverse fetal and neonatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173(2) 508-513.
71. Lopez de Torre B, Tovar J, Uriarte S, Aldazabal P: Transperitoneal exchanges of water and solutes in the fetus with gastroschisis. Experimental study in the chick embryo. *Eur J Pediatr Surg* 1991; 1 346-352.
72. Lopez de Torre B, Tovar JA, Uriarte S. Dialisis peritoneal en embrion de pollo com laparosquisis. *Cir Ped* 1992; 5(4) 191-195.
73. Gutenberger JE, Miller DL, Dibbins AW, Gitlin D. Hypogammaglobulinemia and hypoalbuminemia in neonates with ruptured omphaloceles and gastroschisis. *Pediatr Surg*. 1973; Jun;8(3):353-9.
74. Ferreira PR, Motta UIC, Ferreira M, Bica CG, Zetler CG. Alterações microscópicas no intestino do rato causadas pelo mecônio e pela urina. *Rev Pesq Med* 2000; 34(2) p 71.
75. Albert A, Julia MV, Morales L, Parri FJ. Gastroschisis in the partially extraamniotic fetus: experimental study. *J Pediatr Surg* 1993; 28(5): 656-659.

76. Ciftci AO, Tanyel FC, Ercan MT, Karnak I, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. In utero defecation by normal fetus: a radionuclide study in the rabbit. *J Pediatr Surg* 1996; 31(10): 1409-1412.
77. Ciftci AO, Tanyel FC, Karnak I, Buyukpamukcu N, Hicsonmez A. In-utero defecation: fact or fiction? *Eur J Pediatr Surg*. 1999; Dec;9(6):376-80.
78. Abramovich DR, Gray ES. Physiologic fetal defecation in midpregnancy. *Obstet Gynecol*. 1982; Sep;60(3):294-6.
79. Morrison J, Klein N, Chitty L, Kocjan G, Walshe D, Goulding M, Geary M, Pierro A, Rodeck: Intra-amniotic inflammation in human gastroschisis: possible aetiology of postnatal bowel dysfunction, *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105 1200-1204.
80. Guo W, Swaniker F, Fonkalsrud EW, Vo K, Karamanoukian R. Effect of intraamniotic dexamethasone administration on intestinal absorption in a rabbit gastroschisis model. *J Pediatr Surg*. 1995; Jul 30(7):983-6.
81. Bealer J, Graf J, Bruch S, Adzick S, Harrison M: Gastroschisis increases small bowel nitric oxide synthase activity. *J Pediatr Surg* 1996; 31 1043-1046.
82. Deans KJ, Mooney DP, Meyer MM, Shorter NA. Prolonged intestinal exposure to amniotic fluid does not result in peel formation in gastroschisis. *J Pediatr Surg* 1999; 34 (6): 975-976.
83. Streinbrecher HÁ, Hanna M, Burge DM: Gastroschisis bowel in a intact exophalos: Implication for etiology and possible prevention. *J Pediatr Surg*, vol 31, No 3(march), 1996; 342-343.

84. Amoury RA, Beatty EC, Wood WG, Holder TM, Aschcraft KW, Sharp RJ, Murphy JP. Histology of the intestine in human gastroschisis – relationship to intestinal malfunction: dissolution of the “peel” and its ultrastructural characteristics. *J Pediatr Surg* 1988; 23(10): 950-956.
85. Santos, MM. Alterações na maturação dos plexos nervosos entéricos na gastrosquise: Estudo experimental. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2000.
86. Albert A, Sancho MA, Julia V, Diaz F, Bombi JA, Morales L. Intestinal damage in gastroschisis is independent of the size of the abdominal defect. *Pediatr Surg Int.* 2001; Mar;17(2-3):116-9.
87. Hoffman DJ, Moore JM. Teratogenic effects of external egg applications of methyl mercury in the mallard, *Anas platyrhynchos*. *Teratology.* 1979; Dec;20(3):453-61.
88. Chang KS, Chang JHT. Animal models of pediatric surgical diseases. *Pediatr Surg Int.* 1994; 9: 307-322.
89. Sherman NJ, Asch MJ, Isaacs Jr H, Rosenkrantz JG. Experimental gastroschisis in the fetal rabbit. *J Pediatr Surg* 1973; 2(4): 165-169.
90. Aoki Y, Ohshio T, Komi N. An experimental study on gastroschisis using fetal surgery. *J Pediatr Surg* 1980; 15(3): 252-256.
91. Phillips D, Kelly Jr, RE, Fonkalsrud EW, Mirzayan A, Kim AS. An improved model of experimental gastroschisis in fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 1991; 26(7): 784-787.
92. Kubaski F: Modelo experimental para o estudo da gastrosquise em fetos de coelho. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994.

93. Haller JA Jr, Kehrer BH, Shaker IJ, Shermeta DW, Wyllie RG. Studies of the pathophysiology of gastroschisis in fetal sheep. *J Pediatr Surg.* 1974; Oct;9(5):627-32.
94. Srinathan S, Langer J, Blennerhassett M, Harrison M, Pelletier G, Lagunoff D: Etiology of intestinal damage in gastroschisis III, morphometric analysis of the smooth muscle and submucosa. *J Pediatr Surg* 1995; 30 379-383.
95. 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. *Pediatr Surg.* 2001; Jan;36(1):213-6.
96. Moreng RE, Avens JS. *Ciência e Produção de aves.* São Paulo: Roca 1990.
97. Baião NC. Estrutura do Ovo. In: Campos EJ, Silva JML, Silva EN, *Produção e qualidade de pintos de um dia.* Belo Horizonte, Embrapa-DTC, 1981 p. 15-31.
98. Morris RH, Hessels DF, Bishop RJ. The relationship between hatching egg weight and subsequent performance of broiler chickens. *Br Poult Sci* 9(3): 305-315, 1968.
99. Baião NC. Pré-incubação: cuidados com os ovos para incubação, transporte e armazenamento. In: Campos EJ, Silva JML, Silva EN, *Produção e qualidade de pintos de um dia.* Belo Horizonte, Embrapa-DTC, 1981 p. 31-46.
100. Molenaar JC, Meijers JHC, Tibboel D. The chick embryo model of fetal malformation. In: Harrison MR, Golbus MS, Filly RA. *The unborn patient – Prenatal diagnosis and treatment.* 2nd ed. 1991. W.B. Saunders co. Philadelphia. p 537-47.
101. Fanguy RC. Embriologia – O início da vida. In: Campos EJ, Silva JML, Silva EN, *Produção e qualidade de pintos de um dia.* Belo Horizonte, Embrapa-DTC, 1981 p. 113-119.

102. Hutson JM, Fallat ME, Donahoe PK. The fate of the grafted quail Mullerian duct in the chick embryonic coelom. *Pediatr Surg*. 1984; Aug;19(4):345-52.
103. Kleckner SC, Pringle KC, Clark EB. The effect of chick embryo hyperflexion on tracheoesophageal development. *Pediatr Surg*. 1984; Aug;19(4):340-4.
104. Kluth D, Steding G, Seidl W. The embryology of foregut malformations. *J Pediatr Surg*. 1987; May;22(5):389-93.
105. Tovar JA, Sunol M, Lopez de Torre B, Camarero C, Torrado J. Mucosal morphology in experimental intestinal atresia: studies in the chick embryo. *J Pediatr Surg*. 1991; Feb;26(2):184-9.
106. Olguner M, Akgur FM, Ozdemir T, Aktug T, Ozer E. Amniotic fluid exchange for the prevention of neural tissue damage in myelomeningocele: an alternative minimally invasive method to open in utero surgery. *Pediatr Neurosurg*. 2000; Nov;33(5):252-256.
107. Gheri G, Bryk SG. Computerized morphometric analysis of chick embryo ileum organogenesis. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1987; 101(6): 1011-1022.
108. Gheri G, Bryk G S. Computadorized morphometric analysis of the chick embryo duodenum organogenesis. *Z Microsk Anat Forsch* – 1989 103(2) 273-288.
109. Sapin E, Mahieu D, Borgnon J, Douvier S, Carricaburu E, Sagot P. Transabdominal amnioinfusion to avoid fetal demise and intestinal damage in fetuses with gastroschisis and severe oligohydramnios. *J Pediatr Surg*. 2000; Apr;35(4):598-600.

110. Luton D, de Lagausie P, Guibourdenche J, Oury J, Sibony O, Vuillard E, Boissinot C, Aigrain Y, Beaufiles F, Navarro J, Blot P. Effect of amnioinfusion on the outcome of prenatally diagnosed gastroschisis. *Fetal Diagn Ther.* 1999; May-Jun;14(3):152-5.
111. Kanmaz T, Yagmurlu A, Aktug T, Gokcora H. The effect of amnio-allantoic fluid pH on the intestines: an experimental study in the chick embryo gastroschisis model. *J Pediatr Surg.* 2001; Sep;36(9):1341-5.
112. Davis Jr. JE, Garrison NE. Mean Weights of chick embryos correlated with the stages of Hamburger and Hamilton. *J Morph* 1968; 124: 79-82.
113. Goldim JR. *Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais.* Porto Alegre: Hospital de clínicas de Porto Alegre; 1995.
114. Salvesen, KA. Fetal abdominal wall defects – easy to diagnose- and then what? *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 301-304.
115. Kimble RM, Blakelock R, Cass D. Vanishing gut in infants with gastroschisis. *Pediatr Surg Int.* 1999; 15(7):483-5.
116. Johnson N, Lilford RJ, Irving H, Crabbe D, Cartmill R. The vanishing bowel. Case report of bowel atresia following gastroschisis. *Br J Obstet Gynaecol.* 1991; Feb;98(2):214-5.
117. Krummel TM, Longaker MT. Fetal Wound Healing. In: Harrison MR, Golbus MS, Filly RA. *The unborn patient – Prenatal diagnosis and treatment.* 2nd ed. 1991. W.B. Saunders co. Philadelphia. p 526-36.
118. Somasundaram K, Prathap K. The effect of exclusion of amniotic fluid on intra-uterine healing of skin wounds in rabbit foetuses. *J Pathol* 1972; 107(2): 127-30.

119. Harrison MR. The fetus with a diaphragmatic hernia: pathophysiology, natural history and surgical management. In: Harrison MR, Golbus MS, Filly RA. The unborn patient – Prenatal diagnosis and treatment. 2nd ed. 1991. W.B. Saunders co. Philadelphia. P 295-313.
120. Cusick E, Spicer RD, Beck JM. Small-bowel continuity: a crucial factor in determining survival in gastroschisis. *Pediatr Surg Int*. 1997;12(1):34-7.
121. Romero Borbón JM, Corrales JC. Onfalocele y gastrosquisis en Costa Rica: revisión de 5 años. *Acta pediatr costarric* 1995; 9(1), 33-36.
122. Sharp M, Bulsara M, Gollow I, Pemberton P. Gastroschisis: early enteral feeds may improve outcome. *J Paediatr Child Health* 2000; 36(5) 472-6 .
123. Mulvihill SJ, Stone MM, Fonkalsrud EW, Debas HT. Trophic effect of amniotic fluid on fetal gastrointestinal development. *J Surg Res* 1985; 40(4): 291-296.
124. Moore T, Nur K. An international survey of gastroschisis and onphalocele (409 cases). *Pediatr Surg Int* (1986) 1: 105-109.
125. Blakelock RT, Upadhyay V, Pease PW, Harding JE. Are babies with gastroschisis small for gestational age? *Pediatr Surg Int*. 1997;12(8):580-2.
126. Blakelock R, Upadhyay V, Kimble R, Pease P, Kolbe A, Harding J. Is a normally functioning gastrointestinal tract necessary for normal growth in late gestation? *Pediatr Surg Int*. 1998 Jan;13(1):17-20.
127. Crawford RA, Ryan G, Wright VM, Rodeck CH. The importance of serial biophysical assessment of fetal wellbeing in gastroschisis. *Br J Obstet Gynaecol*. 1992; Nov;99(11):899-902.
128. Multivor RA, Mennutti MT, Harris H. Origin of the alkaline phosphatases in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135:77-81.

129. Morin PR, Potier M, Dallaire L, et al. Prenatal detection of intestinal obstruction: Deficient amniotic fluid disaccharidases in affected fetuses. Clin Genet 1980; 18:217-222.

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo de Pesquisa

Embrião de galinha como modelo para gastrosquise	
Protocolo de Pesquisa	Número do Ovo Número do Lote
Grupo em Estudo:	<input type="checkbox"/> Gastrosquise <input type="checkbox"/> Mistura <input type="checkbox"/> Controle
13 ^º dia de desenvolvimento	Peso do ovo <input type="text"/> gramas
Data:	Comprimento do ovo <input type="text"/> mm
	Largura do ovo <input type="text"/> mm
Acidentes no procedimento	<input type="text"/>
19 ^º dia de desenvolvimento	Peso do ovo <input type="text"/> gramas
Data:	Peso do embrião <input type="text"/> gramas
Embrião	<input type="checkbox"/> Vivo <input type="checkbox"/> Morto
Estruturas evisceradas:	<input type="checkbox"/> Nenhuma <input type="checkbox"/> Intestino <input type="checkbox"/> Outra, qual ?

ANEXO 2

Resultados das medidas dos ovos e embriões nos três grupos

Número do ovo	Peso do ovo no 13 ^º dia (g)	Peso do ovo no 19 ^º dia (g)	Comprimento do ovo (mm)	Largura do ovo (mm)	Peso do embrião (g)	Relação PE/PO
G46	50,03	48,05	55	41	17,35	36,11
G71	63,12	61,02	59	45	13,71	22,47
G103	53,14	50,5	53	44	14,41	28,53
G114	60,53	57,21	60	43	21,82	38,14
G126	53,83	52,01	56	43	14,77	28,40
G138	56,98	55,35	59	44	21,32	38,52
G159	51,89	50,11	53	42	24,45	48,79
G173	56,29	54,11	54	44	18,61	34,39
G217	47,67	46,29	53	41	11,48	24,80
G221	43,19	42,03	51	41	13,68	32,55
G242	44,74	43,26	50	41	14,39	33,26
G243	47,78	45,88	53	42	19,75	43,05
G244	48,97	47,25	55	41	12,37	26,18
G259	52,85	51,23	54	42	23,38	45,64
G266	59,53	58,11	57	44	18,06	31,08
G268	55,82	54,25	60	42	17,11	31,54
G269	61,08	59,39	58	45	22,42	37,75
G271	55,73	53,98	58	43	14,61	27,07
M01	57,15	55,52	59	42	23,28	41,93
M02	55,55	53,83	54	44	25,48	47,33
M04	60,78	59,01	59	44	20,42	34,60
M06	57,14	54,89	60	42	23,06	42,01
M07	60,98	58,52	61	43	22,25	38,02
M09	54,8	53,01	58	41	23,4	44,14
M11	58,56	56,4	61	42	21,33	37,82
M12	49,7	47,95	54	42	19,24	40,13
M13	58,2	56,19	59	43	20,92	37,23
M14	62,38	59,69	59	44	19,87	33,29
M16	61,92	59,99	61	44	22,2	37,01
M17	55,32	53,59	54	43	22,34	41,69
C02	56,11	54,06	59	46	27,26	50,43
C03	59,1	55,99	60	43	26,99	48,21
C04	48,7	47,08	54	40	24,18	51,36
C05	58,89	57,21	56	44	27,94	48,84
C06	58,12	56,19	59	42	26,49	47,14
C07	50,45	48,88	54	41	25,05	51,25
C08	54,01	52,66	57	43	24,65	46,81
C11	53,66	52,05	56	43	26,06	50,07
C12	56,21	54,14	56	43	26,35	48,67
C13	46,75	45,77	53	42	19,37	42,32

ANEXO 3

Avaliação Histológica do intestino nos embriões de galinha (Escore da Tabela 5)

	Número	Serosite	Enterite	Necrose	Peel	Total	Gânglios
G	46	2	2	0	1	5	10
G	71	1	2	1	3	7	12
G	103	2	2	1	1	6	8
G	114	1	1	0	0	2	16
G	126	2	1	1	2	6	10
G	138	2	2	0	0	4	14
G	159	3	3	3	0	9	3
G	173	2	1	0	1	4	12
G	217	3	3	1	3	10	–
G	221	1	1	0	0	2	14
G	242	3	3	1	1	8	–
G	243	3	3	2	1	9	–
G	244	3	3	2	2	10	–
G	259	2	2	0	2	6	14
G	266	2	0	1	1	4	12
G	269	3	3	3	2	11	–
G	268	3	1	1	3	8	18
G	271	1	0	0	0	1	16
M	1	0	1	0	0	1	7
M	2	0	0	0	0	0	11
M	4	0	0	0	0	0	8
M	6	1	1	0	0	2	12
M	7	0	0	0	0	0	11
M	9	0	0	0	0	0	18
M	11	0	0	0	0	0	14
M	12	1	0	0	0	1	8
M	13	0	0	0	0	0	12
M	14	0	0	0	0	0	15
M	16	0	0	0	0	0	10
M	17	1	1	0	0	2	12
C	2	0	0	0	0	0	14
C	3	0	0	0	0	0	6
C	4	0	0	0	0	0	9
C	5	0	0	0	0	0	12
C	6	0	0	0	0	0	12
C	7	1	0	0	0	1	12
C	8	1	0	0	0	1	10
C	11	1	1	0	0	2	12
C	12	0	0	0	0	0	12
C	13	0	2	0	0	2	12

ANEXO 4

Valores de espessura intestinal total e de suas diferentes camadas (médias das seis medidas, expressas em micrômetros)

Número	Mucosa	Muscular	Serosa	Total
G46	153	246	103	502
G71	199	100	103	402
G103	182	253	074	509
G114	171	115	090	376
G126	176	193	062	431
G138	190	130	085	406
G159	207	253	091	552
G173	188	174	076	437
G217	205	269	164	638
G221	192	151	079	421
G242	221	009	118	348
G243	182	161	133	476
G244	163	243	132	538
G259	190	102	109	401
G266	183	257	054	493
G268	176	120	078	374
G269	201	212	106	519
G271	190	141	087	418
S01	142	257	086	486
S02	179	106	072	358
S04	172	268	037	477
S06	162	127	066	354
S07	174	209	050	433
S09	181	143	066	391
S11	179	257	046	482
S12	182	190	052	424
S13	186	275	075	535
S14	182	163	059	403
S16	191	169	064	424
S17	173	173	077	423
C02	177	107	063	347
C03	172	271	032	475
C04	163	127	054	344
C05	172	206	043	422
C06	176	144	057	377
C07	179	259	042	479
C08	182	194	047	423
C11	191	170	057	418
C12	172	174	067	412
C13	184	166	055	405