

Estudio morfológico del intestino en un modelo experimental de amnioinfusión en feto de conejo con gastrosquisis*

M.E. Muñoz, A. Albert, V. Juliá, M.A. Sancho, C. Grande, A. Martínez¹, L. Morales

Servicio de Cirugía Pediátrica, Unidad Integrada Hospital Sant Joan de Déu – Clínic. Universidad de Barcelona.

¹*Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Clínic. Universidad de Barcelona.*

RESUMEN: Hemos desarrollado un modelo experimental de amnioinfusión seriada en feto de conejo con gastrosquisis, mediante un catéter intraamniótico conectado a un reservorio subcutáneo; en él hemos realizado un estudio morfológico del intestino. Para ello comparamos los fetos de 4 grupos al cabo de una semana de intervención: grupo A (gastrosquisis y amnioinfusión), grupo C (gastrosquisis y catéter ciego), grupo G (gastrosquisis), grupo O (controles no intervenidos) y determinamos el peso fetal, peso pulmonar, peso y longitud intestinal, y mediante morfometría computarizada el diámetro intestinal, grosor de la pared y longitud de la vellosidad. Se recogieron muestras de líquido amniótico a lo largo del periodo experimental.

El intestino de los fetos con gastrosquisis es significativamente más corto y de pared más gruesa que el de los controles, pero sin otras diferencias morfométricas. No se halló diferencia entre las gastrosquisis tratadas con amnioinfusión y el resto de gastrosquisis.

La amnioinfusión no ha disminuido la supervivencia fetal en nuestro estudio. El catéter intraamniótico no ha producido pérdida de líquido amniótico capaz de provocar hipoplasia pulmonar y no ha modificado la disminución fisiológica de líquido amniótico al final de la gestación.

PALABRAS CLAVE: Amnioinfusión; Gastrosquisis; Defecto congénito de pared abdominal; Cirugía fetal; Cirugía experimental.

A MORPHOLOGIC STUDY OF FETAL GASTROSCHISIS INTESTINE AFTER SERIAL AMNIOINFUSION IN THE RABBIT MODEL

ABSTRACT: An experimental model of serial amnioinfusion has been developed in fetal rabbits with gastroschisis, using an intraamniotic catheter connected to a subcutaneous port. Fetuses of 4 groups were compared 7 days after surgery: group A: gastroschisis and daily amnioinfusion through an implanted catheter; group C: gastroschisis and blind amniotic catheter; group G: gastroschisis without catheter; group

Correspondencia: M^a. E. Muñoz Fernández, Servicio de Cirugía Pediátrica, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu, 2, 08950, Barcelona, España.

**Trabajo presentado en XL Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica. Sevilla, Mayo 2001. Trabajo financiado por la Beca de Investigación del Hospital Sant Joan de Déu y la Beca n° 99/1141 del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social.*

Recibido: Mayo 2001

Aceptado: Octubre 2001

O: nonoperated fetuses. Survival rate, fetal body weight, lung weight, intestinal weight and length were determined. Computer aided morphometric analysis was performed, in which intestinal diameter, thickness and villi length were measured. Amniotic fluid samples were recovered along the experimental period.

Intestinal length was significantly shorter and had a significantly thicker wall than nonoperated fetuses; we found no other morphometric differences between gastroschisis treated with amnioinfusion (group A) and the other gastroschisis groups (C and G).

Amnioinfusion did not affect fetal survival rate; the amniotic catheter alone did not cause pulmonary hypoplasia due to significant amniotic leak. The physiological decrease in amniotic volume towards the end of gestation has not been modified by this regime of amnioinfusion.

KEY WORDS: Amnioinfusion; Gastroschisis; Abdominal wall defect; Fetal surgery; Experimental surgery.

INTRODUCCIÓN

El líquido amniótico tiene un importante papel en la fisiopatología de diferentes malformaciones congénitas. Hay evidencias experimentales que lo demuestran en la lesión intestinal de la gastrosquisis^(1,2) y en afectación neurológica del mielomeningocele⁽³⁾.

El diagnóstico prenatal, además de facilitar el conocimiento de la fisiopatología de algunas malformaciones congénitas, permite la intervención terapéutica intraútero. Un ejemplo de ello es la amnioinfusión, práctica médica corriente desde el año 1990, con la que es posible modificar el volumen, la presión o los componentes del líquido amniótico.

Se han desarrollado diversos modelos experimentales de amnioinfusión para el tratamiento prenatal del retraso de crecimiento intrauterino en feto de conejo⁽⁴⁾, para prevenir la lesión intestinal en la gastrosquisis en embrión de pollo⁽⁵⁾ y en feto de cordero⁽⁶⁾, y la lesión neurológica en el mielomeningocele en embrión de pollo⁽⁷⁾.

El efecto de la amnioinfusión en el embarazo humano es transitorio debido al alto recambio del líquido amniótico y al

riesgo de infección y aborto por las punciones repetidas. Estas desventajas podrían paliarse con la implantación de un catéter de amnioinfusión conectado a un reservorio subcutáneo tipo port-a-cath.

Nos hemos propuesto desarrollar un modelo de amnioinfusión seriada en la coneja preñada a través de un dispositivo de acceso a la cavidad amniótica implantado subcutáneamente, y evaluar el efecto de esta técnica en la afectación intestinal de fetos con gastrosquisis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Se han intervenido fetos de conejo Neozelandés blanco de 23 días de gestación y se han recogido 7 días después de la intervención.

Para la amnioinfusión se ha utilizado un catéter de poliuretano de 3,5 mm. de diámetro externo con una longitud de unos 55 cm., con un extremo deformado por calor hasta obtener una dilatación ampular. El otro extremo se conectaba a un reservorio subcutáneo tipo port-a-cath en la región cervical posterior de la coneja. La capacidad del sistema era de 1,6 ml.

Grupos de estudio

La figura 1 muestra un esquema de los mismos.

Grupo A (amnioinfusión): gastrosquisis y amnioinfusión seriada a través de catéter con reservorio subcutáneo (n=7).

Grupo C (catéter): gastrosquisis y catéter amniótico ciego; sin amnioinfusión (n=8).

Grupo G (gastrosquisis): gastrosquisis sin catéter (n=7).

Grupo O (control): fetos hermanos no intervenidos (n=13).

Método

La coneja de 23 días de gestación se premedica con 10 mg/kg de ketamina y 2,5 mg/kg de clorpromacina, vía intramuscular. Se administra una dosis profiláctica de cefazolina 100 mg/kg intramuscular. En el preoperatorio inmediato se administra también 0,1 mg/kg medroxiprogevera para disminuir la contracción uterina durante la intervención. La técnica anestésica y quirúrgica para intervenciones de gastrosquisis en el feto de conejo ha sido publicada anteriormente⁽⁸⁾.

Técnica de colocación del catéter de amnioinfusión

A través de una laparotomía media se expone el segmento uterino a intervenir. Se fijan las membranas amnióticas al miometrio mediante una bolsa de tabaco y se incide el útero y las membranas en su centro. Una vez practicada la gastrosquisis, se introduce el extremo ampular del catéter purgado y se cierra la bolsa de tabaco. Se practica una segunda ligadura para asegurar la estanqueidad.

En los fetos del grupo A se tuneliza el otro extremo del catéter hasta un bolsillo subcutáneo en la parte posterior cer-

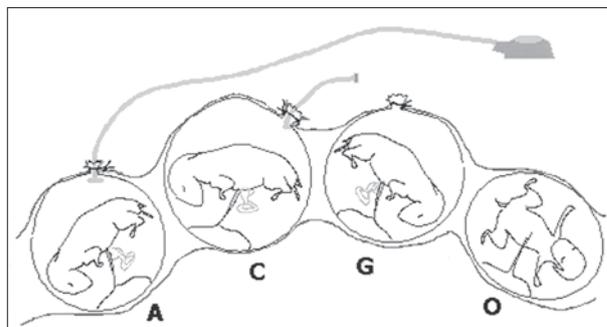


Figura 1. Esquema de los grupos de estudio: A (gastrosquisis con catéter y reservorio para amnioinfusión), C (gastrosquisis con catéter ciego), G (gastrosquisis) y O (no operados).

vical donde se conecta y se fija el reservorio. También se fija a la aponeurosis del recto anterior abdominal.

En el grupo C el catéter es corto y acaba ciego en la cavidad peritoneal materna.

Técnica de amnioinfusión

El reservorio subcutáneo se punciona en condiciones estériles una vez al día. En primer lugar se extrae una muestra para bioquímica y cultivo. A continuación se infunden 3 ml. de suero fisiológico a 35°C.

Recogida de muestras

En los días 23 y 30 de gestación, durante la intervención, se recogieron muestras de líquido amniótico para análisis bioquímico. Durante la amnioinfusión los días 3, 5 y 7 postintervención se obtuvieron muestras del líquido amniótico para estudio microbiológico.

En el día 30 de gestación (gestación completa 31 días), se anestesió a la coneja nuevamente y por cesárea se extrajeron los fetos operados viables y un hermano no operado como control y se pesaron. Después se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital intracardíaco. Se pesó el pulmón de cada feto. Se separó el intestino eviscerado del abdominal, se disecaron ambos de su mesenterio, se midieron y se pesaron en fresco.

Se tomó una muestra de 5 cm del intestino ileon, del centímetro 5 al 10 de la válvula ileocecal, que se fijó en formol al 10%, se incluyó en parafina y se cortó y tiñó con hematoxilina-eosina. El análisis morfométrico se ha llevado a cabo con el programa informático Olympus Micro Image. Se determinaron el diámetro intestinal, el grosor de la pared intestinal desde la serosa hasta el seno de una cripta y la longitud de las vellosidades. En el líquido amniótico de 23 y 30 días de gestación se determinaron: osmolaridad, sodio, cloro, potasio, glucosa, urea, creatinina y proteínas.

Método estadístico

El estudio estadístico utilizado ha sido el análisis de la varianza para la comparación de datos cuantitativos no pare-

Tabla I Resultados generales de la amnioinfusión

	Grupo A (n=7)	Grupo C (n=8)	Grupo G (n=7)	Grupo O (n=13)	
Supervivencia	51,8 %	45,5 %	47,1 %	100 %	*
Peso fetal (gr.)	31,3	32,4	35,7	34,5	ns
Peso pulm.(mg.)	796	861	825	839	ns

NS: no significativo.
*: $p < 0,05$ entre grupo O y el resto de los grupos.

ados, considerando significancia estadística una $p < 0,05$. Los datos se han descrito en las tablas calculando la media aritmética en cada grupo.

RESULTADOS

En 18 conejas gestantes se han intervenido un total de 47 fetos: 14 del grupo A, 18 del C y 15 del G. Se han recogido 22 fetos operados viables: 7 con amnioinfusión, 8 con catéter ciego y 7 gastrosquisis simples. Además se han estudiado 13 fetos como control.

La supervivencia materna ha sido del 100%. La supervivencia fetal global ha sido de un 46,85% en los fetos operados.

La tabla I resume los resultados generales de la amnioinfusión.

La tabla II detalla los hallazgos intestinales en los diferentes grupos.

La figura 2 muestra los hallazgos histológicos en la preparación para morfometría

El cultivo del líquido amniótico obtenido por aspiración a los 3, 5 y 7 días de la intervención fue negativo. El análisis bioquímico en el día 23 de gestación mostró: osmolaridad 295 mosm/L; sodio 140,7 mosm/L; potasio 3,62 mosm/L; cloro 112 mosm/L; glucosa 2,54 mosm/L; urea 5,35 mosm/L; creatinina 104 mosm/L. El volumen de líquido amniótico en el día 30 fue insuficiente para practicar análisis bioquímicos, incluso en el grupo A.

DISCUSIÓN

El desarrollo del diagnóstico prenatal ha aportado numerosos conocimientos de la fisiopatología de diferentes malformaciones congénitas en el período fetal. Al final de los años 70 se crearon modelos animales para el estudio de la patología fetal. Lógicamente el siguiente paso es el planteamiento de diferentes opciones terapéuticas para evitar la progresión de una anomalía o cambiar en sentido favorable su evolución.

Un buen ejemplo de ello es la amnioinfusión, procedimiento introducido en la práctica obstétrica a principios de los años 90⁽⁹⁾. Su indicación más clara está en el parto, para disminuir las desaceleraciones cardíacas fetales asociadas a oligoamnios.

Tabla II Datos macroscópicos y morfométricos del intestino

	Grupo A (n=7)	Grupo C (n=8)	Grupo G (n=7)	Grupo O (n=13)	
Peso intestinal (mg).	909,24	805,2	885,32	963,25	ns
Longitud intestinal(cm).	39,61	39,75	41,42	62,65	*
Peso/longitud	24	20,16	17,7	15,34	*
Diámetro intestinal (m).	305,5	288,42	306,13	282,56	ns
Grosor de la pared (m).	18,35	16,98	15,96	11,34	*
Longitud de vellosidad (m).	57,67	40,7	54,8	50,73	ns

NS: no significativo.
*: $p < 0,05$ entre grupo O y el resto de los grupos.

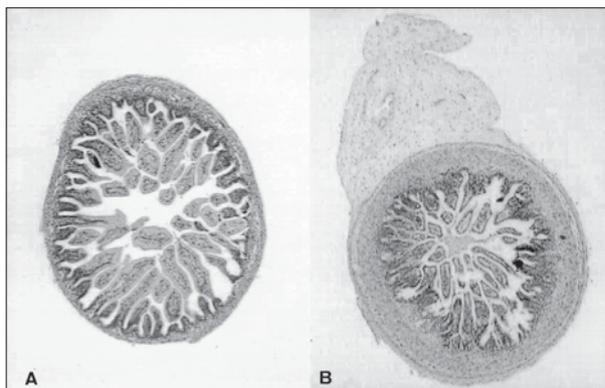


Figura 2. A: Imagen microscópica de intestino del grupo control. B: En el grupo amnioinfusión destaca un engrosamiento de la pared, con marcado infiltrado inflamatorio.

Otras indicaciones durante la gestación son la prevención de la hipoplasia pulmonar en el oligoamnios, facilitar la visión ecográfica en maniobras de fetoscopia y la cordocentesis, facilitar la versión externa en caso de presentación de nalgas. Se ha publicado el uso de la amnioinfusión para la infusión de hormonas tiroideas en el hipotiroidismo congénito⁽¹⁰⁾ y para prevenir el daño intestinal en la gastrosquisis⁽¹¹⁻¹⁴⁾. La amnioinfusión repetida no es un procedimiento exento de riesgos y complicaciones (infección, rotura de membranas, desprendimiento de placenta) por lo que todas las indicaciones han de ser rigurosamente evaluadas. La morbilidad aumenta con punciones seriadas por lo que puede ser interesante desde el punto de vista clínico disponer de un procedimiento más seguro para amnioinfusiones repetidas y así podría extenderse el uso y ampliarse sus indicaciones. La colocación de un catéter intraamniótico conectado a un reservorio subcutáneo podría disminuir el riesgo de las amniocentesis repetidas.

Se ha comprobado que el recambio de líquido amnio-alantoideo en embrión de pollo⁽⁵⁾ puede prevenir las lesiones del

intestino en la gastrosquisis. Se ha estudiado la posibilidad de tratar el retraso de crecimiento intrauterino mediante un sistema de infusión continua de Ringer Lactato en feto de conejo, utilizando catéteres de polietileno intraamnióticos conectados a una bomba de infusión externa⁽⁴⁾.

Nuestro modelo se basa en el sistema de amnioinfusión de Harrison pero conectado a un reservorio subcutáneo. La amnioinfusión a través del catéter amniótico es factible técnicamente en el feto de conejo. La coneja tolera muy bien el reservorio subcutáneo, se puede puncionar con facilidad y siguiendo un método estéril de punción no se contamina.

Utilizamos un catéter semirrígido para evitar acodaduras y sujeto al útero, a la aponeurosis abdominal y al reservorio para prevenir su salida de la cavidad amniótica y la desconexión del reservorio.

La mortalidad de los fetos amnioinfundidos no es diferente de la de los otros fetos intervenidos por lo que la amnioinfusión no ha disminuido la supervivencia fetal.

En nuestro estudio no hemos conseguido recoger muestra de líquido amniótico en el día 30 de gestación, lo que indica que la disminución fisiológica del volumen del líquido amniótico hacia el final de la gestación no se modifica con la pauta de infusión utilizada en este modelo.

Askenazi sugiere que el índice peso pulmonar / peso feto (PP/PF) es un buen indicador del desarrollo pulmonar⁽¹⁵⁾. Así un $PP/PF \leq 0,012$ pondría de manifiesto una hipoplasia pulmonar. En todos nuestros grupos el PP/PF es de 0,02.

No hemos encontrado diferencias significativas en el peso de los fetos ni en el peso de sus pulmones en los diferentes grupos, lo que demuestra que el catéter intramniótico no produce pérdida de líquido amniótico capaz de provocar hipoplasia pulmonar.

Nuestro modelo prueba la viabilidad de un acceso amniótico permanente en el animal de experimentación, por el cual es posible modificar el líquido amniótico. En el corto plazo que permite la gestación de la coneja, no disminuye la supervivencia y no se produce infección fetal. Desde el punto de vista morfológico no se identifican diferencias entre gastrosquisis y gastrosquisis con amnioinfusión seriada. Sin embargo queda por investigar cual es la variación bioquímica efectiva conseguida en el líquido amniótico, y si ésta es suficiente para mejorar la alteración intestinal en la gastrosquisis. Estas cuestiones tienen un interés inmediato, porque a nivel clínico ya se están realizando las primeras experiencias terapéuticas con amnioinfusión en fetos afectados de gastrosquisis con resultados alentadores⁽¹¹⁻¹⁴⁾.

Con este modelo podríamos determinar el efecto de diferentes volúmenes y tipos de líquido amnioinfundido en casos de enfermedades fetales que cursen con oligoamnios. También sería factible la infusión de fármacos deglutidos, aspirados o absorbidos por la piel para tratar diversas patologías.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albert A, Juliá V, Morales L, Parri F. Gastroschisis in the partially extraamniotic fetus: experimental study. *J Pediatr Surg* 1993;**28**: 656-659.
2. 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 in a fetal lamb model. *J Pediatr Surg* 1989; **24**:992-997.
3. Meuli M, Meuli-Simmen C, Yingling CD, Hutchins GM, Hoffman KM, Harrison MR, Adzick NS. Creation of myelomeningocele in utero: a model of functional damage from spinal cord exposure in fetal sheep. *J Pediatr Surg* 1995;**30**:1028-1033.
4. Harrison MR, Villa RL. Trans-amniotic fetal feeding I. Development of an animal model: Continuous amniotic infusion in rabbits. *J Pediatr Surg* 1982;**17**:376-380.
5. Aktug T, Erdag G, Kargi A, Akgür FM, Tibboel D. Amnio-allantoic fluid exchange for the prevention of intestinal damage in gastroschisis: an experimental study on chick embryos *J Pediatr Surg* 1995;**30**:384-387.
6. Luton D, de Lagausie P, Guibourdenche J, Peuchmaur M, Sibony O, Aigrain Y, Oury JF, Blot P. Influence of amnioinfusion in a model of in utero created gastroschisis in the pregnant ewe. *Fetal Diagn Ther* 2000;**15**:224-228.
7. 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;**33**:252-256.
8. Albert A, Juliá V, Morales L, Rovira J, Sancho A, Bombi JA. Papel del líquido amniótico en la gastrosquisis. Estudio experimental. *Cir Ped* 1992;**5**:12-16.
9. Luton D, Oury JF, Sibony O, Vuillard E, Braig S, Benzakine Y, Blot P. Amnioinfusion: indications et résultats. *Presse Med* 1996;**25**:1881-1884.
10. Sagot P, David A, Yvinec M. Intrauterine treatment of fetal goiter. *Fetal Diagn Ther* 1991;**6**:28-33.
11. Dommergues M, Ansker Y, Aubry MC, Mac Aleese J, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fékété C, Dumez Y. Serial transabdominal amnioinfusion in the management of gastroschisis with severe oligohydramnios. *J Pediatr Surg* 1996;**31**:1297-1299.
12. Aktug T, Demir N, Akgür FM, Olguner M. Pretreatment of gastroschisis with transabdominal amniotic fluid exchange. *Obstet Gynecol* 1998;**91**:821-823.
13. 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;**35**:598-600.
14. Luton D, de Lagausie P, Guibourdenche J, Oury JF, Sibony O, Vuillard E, Boissinot C, Aigrain Y, Beaufilets F, Navarro J, Blot P. Effect of amnioinfusion on the outcome of prenatally diagnosed gastroschisis. *Fetal Diagn Ther* 1999;**14**:152-154.
15. Askenazi SS, Perlman M. Pulmonary hypoplasia: lung weight and radial alveolar count as criteria of diagnosis. *Arch Disease Childhood* 1979;**54**:614-618.