

Malformaciones esqueléticas en la atresia de esófago: estudio clínico y experimental.

Dres. S. Montedonico, H.M. Xia, J.A. Diez-Pardo, J.A. Tovar

Departamento de Cirugía y Laboratorio Experimental, Hospital Infantil "La Paz". Madrid, España.

Resumen

Las asociaciones malformativas nos dan la clave para comprender la embriogénesis de sus componentes. El objetivo de nuestro trabajo es comparar las malformaciones esqueléticas (ME) de un modelo teratogénico de atresia de esófago (AE), en fetos de rata con las ME de la AE clínica y esbozar un posible mecanismo patogénico común. Para ello revisamos las historias y radiografías de 443 niños con AE tratados entre los años 1965 y 1996. Se indujo la aparición de AE en las camadas de 16 ratas mediante la inyección de adriamicina en los días 8 y 9 de la gestación. A los embriones recuperados se les tiñó el esqueleto con azul alcian y rojo alizarina para evidenciar la presencia de anomalías. De los 443 pacientes estudiados, 239 (53,9%) tenían una o más malformaciones esqueléticas asociadas, siendo las más frecuentes: hipersegmentación vertebral (n=102), hipoplasia sacra (n=42), vértebras malformadas principalmente torácicas (n=47) e hipoplasia radial y del pulgar (n=57). De 52 embriones de rata con atresia de esófago, todos ellos (100%) tenían alguna anomalía esquelética, siendo frecuentes las vértebras torácicas malformadas (n=52) y la hipoplasia sacra (n=27). La asociación de malformaciones esofágicas, vertebrales y de los miembros en el mismo individuo, sugiere que estas anomalías se deben a un mecanismo patogénico común tanto en la rata, como en el humano, capaces de alterar tanto la segmentación como la organización del mesodermo paraxial durante la organogénesis. La naturaleza de las malformaciones encontradas sugiere que los genes Hox podrían estar involucrados en la etiología de la AE.

Palabras clave: Atresia de esófago – Malformaciones asociadas – Vértebras – Columna – Costilla – Miembros – Rata – Etiopatogenia.

Summary

Clusters of malformations are the clue to understanding their embryogenesis. The purpose of this study is to compare skeletal malformations (SM) in the adriamycin fetal rat model of esophageal atresia (EA) with SM in human EA in a search for a common pathogenic mechanism. We reviewed the medical records of 443 children with EA from 1965 to 1996. Time-mated female rats were given either 2 mg/kg i.p. adriamycin on gestational days 8 and 9 to induce EA (experimental group, n=10) or no treatment (control group, n=2) and the fetuses recovered near term. Skeletal anatomy was studied after alcian blue and alizarin red staining. Among 443 patients with EA, 239 (53,9%) had one or more skeletal anomalies; the most frequent were: vertebral hypersegmentation (n=102), sacral hypoplasia (n=42), vertebral anomalies (n=47) and radial and thumb hypoplasia (n=57). Among 52 rat fetuses with EA, vertebral anomalies, mainly thoracic, were observed in 100% of animals. The association of vertebral, limb and esophageal defects in both the clinical and the experimental model suggests that these anomalies are due to a common pathogenetic mechanism capable of disturbing segmentation and organization of the paraxial mesoderm during organogenesis. The nature of skeletal defects supports the hypothesis that Hox genes may be involved in EA etiology.

Index words: Esophageal atresia – Associated malformations – Vertebrae – Spine – Rib – Limbs – Rat – Pathogenesis.

Resumo

As associações de malformações nos dão a chave para compreender a embriogênese de seus componentes. O Objetivo do nosso trabalho é comparar as malformações esqueléticas (ME) de um modelo teratogênico de atresia do esôfago (AE) em fetos de rato com as ME da AE clínica e esboçar um possível mecanismo patogênico comm. Para tal revisamos as histórias e radiografias de 443 crianças com AE tratadas entre os anos de 1965 e 1996. Se induziu o aparecimento de AE nas ninhadas de 16 ratos mediante a injeção de adriamicina nos dias 8 e 9 da gestação. Aos embriões recuperados se fíngiu o esqueleto com azul e vermelho para evidenciar a presença de anomalias. Dos 443 pacientes estudados, 239 (53,9%) tinham uma ou mais ME associadas, sendo as mais frequentes: hipersegmentação vertebral (n=102), hipoplasia sacra (n=42), vértebras malformadas principalmente torácicas (n=47) e hipoplasia radial e do polegar (n=57). De 52 embriões de rato com AE, todos eles (100%) tinham alguma anomalia esquelética, sendo frequentes as vértebras torácicas malformadas (n=52) e a hipoplasia sacra (n=27). A associação de malformações esofágicas, vertebrais, e dos membros em um mesmo indivíduo, sugere que essas anomalias se devem a um mecanismo patogênico comum, tanto no rato como no humano, capazes de alterar tanto a segmentação como a organização do mesoderma paraxial durante a organogênese. A natureza das malformações encontradas sugere que os genes *Hox* poderiam estar envolvidos na etiologia da AE.

Palavras chave: Atresia do esôfago - Malformações associadas - Vértebras - Coluna - Costelas - Membros - Rato - Etiopatogenia.

Introducción

La atresia de esôfago se asocia con frecuencia a malformaciones osteoarticulares, situándose su incidencia entre un 10% y un 50% según la rigurosidad empleada en su diagnóstico¹⁻¹⁰. Recientemente hemos descrito un modelo animal de atresia de esôfago y fístula traqueoesofágica inducida en el feto de rata mediante exposición prenatal a un teratogéno, adriamicina, que reproduce fielmente muchas malformaciones que se asocian a ella¹¹. Es sabido que cuando coexisten diversas malformaciones en un mismo individuo, éstas muchas veces dan la clave para comprender mejor la embriogénesis de cada uno de sus componentes. El objetivo de nuestro trabajo es comparar las malformaciones esqueléticas que se encuentran en los niños con atresia de esôfago y aquellas de nuestro modelo animal, en un intento de esbozar un posible mecanismo patogénico común.

Material y método

Revisamos en forma retrospectiva las historias clínicas y radiografías de 443 pacientes con atresia de esôfago ingresados en nuestro hospital entre los años 1965 y 1996, prestando especial cuidado en identificar las malformaciones del esqueleto axial, costales y de los miembros presentes en ellos.

Veinte ratas Sprague-Dawley preñadas con pesos entre 200 y 220 g y con un período gestacional conocido, fueron distribuidas al azar en dos grupos. El grupo control (n=4) no recibió ningún tratamiento y a cada rata del grupo experimental (n=16) se le inyectó por vía intraperitoneal 2,0 mg/kg de adriamicina diluida en solución salina estéril (50 mg/ml) los días 8 y 9 de gestación. Los fetos se recuperaron por cesárea el día 21 de gestación (24 horas antes de término), se sacrificaron, y se utilizaron para estudiar el esqueleto axial (2 ratas control y 10 expuestas a adriamicina). Después de eviscerarlos y quitarles la piel, las carcasas se procesaron para transparentar sus tejidos blandos y teñir el esqueleto, de acuerdo a una técnica descripta, levemente modificada^{12, 13}. Para ello los fetos se sumergieron en una solución conteniendo una mezcla de alcohol 96%, ácido acético y azul alcian por 24 horas. A continuación se deshidrataron en alcohol puro por 5 días y luego se maceraron en una solución de KOH al 2% y rojo alizarina (12 horas los fetos a estudiar el esqueleto y 24 horas los fetos a estudiar los miembros) hasta que el esqueleto fue claramente visible a través de las partes blandas. Después, los esqueletos se fueron sumergiendo en una solución de glicerol al 20% y KOH, que fue progresivamente cambiándose por una de glicerol puro a lo largo de dos días. De este modo, el cartilago se

tiño de azul y el hueso de rojo. Los esqueletos ya teñidos se observaron por transiluminación bajo un microscopio quirúrgico (Wild M-650, Herrbrugg, Suiza). El esqueleto de cada individuo fue cuidadosamente examinado, se contó cada pieza ósea y se individualizó cada anomalía.

Resultados

Serie clínica: De los 443 pacientes con atresia de esófago estudiados, 239 (53,9%), tenían una o más malformaciones esqueléticas asociadas. La Tabla 1 muestra el detalle de las más frecuentes. La hipersegmentación vertebral, es decir, una o más vértebras supernumerarias, fue el defecto de más frecuente presentación (20,8%). La hiposegmentación vertebral fue mucho menos frecuente, encontrándose sólo en el 2,3%. Alteraciones estructurales de las vértebras, especialmente hemivértebras y vértebras en mariposa, se encontraron en el 10,6% de los pacientes con atresia de esófago. De los 47 niños con estas anomalías, 40 tenían cuerpos vertebrales torácicos malformados; 18 lumbares y 3 cervicales. Todos los casos de hipoplasia sacra estaban asociados a atresia anorrectal. Hubo un caso de escoliosis marcada, otro de hiperlordosis lumbar y un caso de espina bifida asociados a atresia de esófago. El 16,5% de

los niños tenían una o más costillas supernumerarias que en 56/73 casos se asociaban a vértebras supernumerarias. Las costillas infranumerarias fueron menos frecuentes, encontrándose en el 7,4% de ellos. De los 15 casos en que había fusiones costales, dos eran múltiples, comprometiendo toda la parrilla costal. Cinco niños tenían pectus carinatum y uno, pectus excavatum. En dos recién nacidos encontramos una falta de fusión esternal. Las alteraciones longitudinales preaxiales de los miembros superiores fueron las más frecuentes; en todos los casos de aplasia o hipoplasia radial se asociaba además, aplasia o hipoplasia del pulgar. También hubo casos de hipoplasia del primer dedo del pie (n=4), agenesia de peroné (n=2), agenesia de cúbito (n=1) e hipoplasia del húmero (n=1). Otras malformaciones de las extremidades encontradas fueron: clinodactilia (n=16), sindactilia (n=9), polidactilia (n=7) y mano en pinza (n=5).

Serie experimental: En condiciones normales, los fetos de rata tienen una columna con 7 vértebras cervicales (C1-C7), 13 torácicas (T1-T13), 6 lumbares (L1-L6), 4 vértebras sacras (S1-S4) y 5 a 7 elementos caudales en vez de los 31 que se ven en la rata adulta. De los 13 pares de costillas, las 6 últimas son flotantes. El cráneo y los miembros son iguales a los humanos salvo que las manos tienen 4 metacarpianos y 4 dedos.

La Tabla 2 muestra que no había ninguna anomalía esquelética en los fetos controles examinados. De los 134 fetos expuestos a adriamicina, 83 (62%) tenían una atresia de esófago con fistula traqueoesofágica distal. En este grupo, los huesos de la cara y

Localización del defecto	n(%)
Anomalías espinales	
Hipersegmentación vertebral	92 (20,8%)
Hiposegmentación vertebral	10 (2,3%)
Cuerpos vertebrales malformados	47 (10,6%)
Hipoplasia sacra	42 (9,5%)
Anomalías costales	
Costilla supernumeraria	73 (16,5%)
Costilla infranumeraria	33 (7,4%)
Fusiones costales	15 (3,4%)
Anomalías miembro	
Aplasia o hipoplasia radial	18 (4,1%)
Aplasia o hipoplasia del pulgar	39 (8,8%)

Tabla 1: malformaciones esqueléticas más frecuentes en niños con atresia de esófago (n=443).

	Control (n=15)	Atresia de esófago (n=52)
Anomalías vertebrales		
Malf. cuerpos vertebrales	0	52
Lordosis	0	11
Malf. sacrocaudales	0	27
Anomalías pélvicas		
Anomalías costales	0	3
Anomalías esternales		
	0	3

Tabla 2: tipos de malformaciones esqueléticas en fetos de rata control y con atresia de esófago.

Vértebra anormal	Control (n=15)	Atresia de esófago (n=52)
T1	0	0
T2	0	13
T3	0	6
T4	0	0
T5	0	3
T6	0	1
T7	0	0
T8	0	2
T9	0	8
T10	0	20
T11	0	45
T12	0	39
T13	0	33
L1	0	27
L2	0	22
L3	0	18
L4	0	11
L5	0	7
L6	0	2

Tabla 3: nivel del defecto vertebral en fetos control y con atresia de esófago*.

*No había anomalías cervicales apreciables y la región sacrocaudal fue difícil de valorar por el escaso grado de osificación en esta edad gestacional.

del cráneo eran en todos los casos normales; así como también la columna cervical, a pesar de que no podemos descartar la presencia de anomalías menores debido a la falta de osificación a este nivel en fetos de esta edad. Se encontraron defectos vertebrales en todos los casos examinados (n=52), especialmente de las vértebras torácicas en que destacaba la presencia de dos núcleos de osificación independientes (vértebra en mariposa) y hemivértebras. La distribución de estos defectos vertebrales a lo largo de la columna era asimétrica, observándose con mayor frecuencia a dos niveles claramente identificables de la columna torácica: a nivel de T2 y de T11 (Tabla 3 y Figura 1). La pelvis era estrecha y con mucha frecuencia encontramos hipoplasia sacra (Tabla 2 y Figura 2). No pudimos identificar claramente el número de elementos caudales debido a su escaso grado de osificación a esta edad, pero sin duda había me-

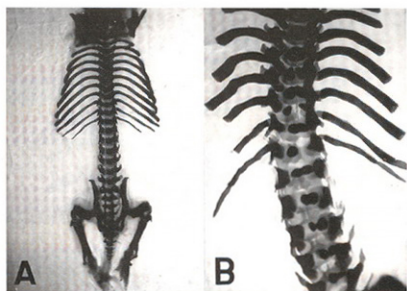


Fig. 1: columna vertebral de un feto de rata control (A) y de uno con atresia de esófago (B). En esta última, se ve una osificación anormal de las vértebras toracolumbares.

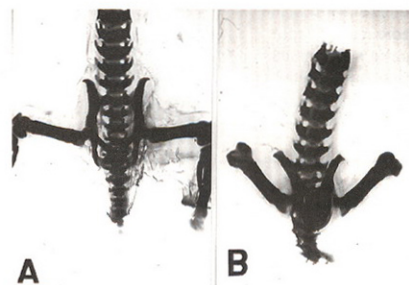


Fig. 2: pelvis y región sacrocaudal en un feto control (A) y en uno con atresia de esófago (B); en este último la pelvis es estrecha y las ramas isquiopúbicas se funden en la línea media. El sacro y las vértebras de la cola son hipoplásicas.

nos en los fetos con atresia de esófago que en los fetos control; especialmente en aquellos en que se asociaba una malformación anorrectal, en que había siempre menos de 5. Dos de los fetos con atresia de esófago tenían 7 costillas flotantes en vez de 6 y un feto tenía una fusión de dos costillas (Tabla 2). En tres casos se encontró una falta de fusión esternal (Tabla 2 y Figura 3). En relación a los miembros, encontramos un retraso en la calcificación ósea en to-

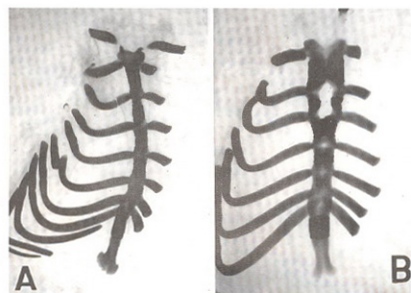


Fig. 3: esternón y parte de la parrilla costal en un feto control (A) y en uno con atresia de esófago (B); en este último se ve un gran defecto de cierre esternal.

	Control (n=9)	Atresia de esófago (n=31)
Húmero malformado	0	4
Radio malformado	0	2
Cúbito malformado	0	2
Tibia malformada	0	3
Peroné malformado	0	2
Hipodactilia	0	1
Sirenomelia	0	2

Tabla 4: malformaciones de los miembros en fetos de rata control y con atresia de esófago.

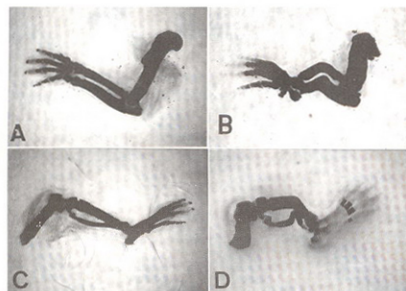


Fig. 4: A: extremidad superior en feto de rata control. B: extremidad superior en feto de rata con atresia de esófago. Notar que los huesos son más cortos, gruesos y toscos. C: extremidad inferior en feto de rata control. D: extremidad inferior en feto con atresia de esófago. En este caso también los huesos son más cortos y están torsionados.

dos los fetos del grupo experimental y en 61% de ellos se encontraron miembros malformados, principalmente el húmero, el radio y el cúbito y con menor frecuencia las extremidades inferiores (Tabla 4 y Figura 4). En este grupo los huesos eran cortos, gruesos y toscos.

Discusión

La atresia de esófago se asocia con frecuencia a otras malformaciones. En la literatura existen datos dispares respecto a la incidencia de anomalías esqueléticas en esta enfermedad. La mayoría de los autores la sitúan alrededor de un 10%¹⁻⁶, probablemente debido a que al considerarlas de poca trascendencia clínica, estas malformaciones pasan muchas veces desapercibidas. Por otra parte, estudios en los que se han examinado con cuidado todas las radiografías de niños portadores de una atresia de esófago, demuestran que más del 50% de ellos tiene alguna anomalía esquelética asociada⁷⁻¹⁰. Nuestros resultados concuerdan con los anteriormente mencionados ya que uno de cada dos niños con atresia de esófago tiene al menos una malformación del sistema osteoarticular.

Los tipos de malformaciones esqueléticas encontradas en nuestra serie clínica concuerdan con aquellas aportadas por la literatura: alteraciones de la segmentación vertebral, y principalmente la hipersegmentación, seguidas de malformaciones estructurales de las vértebras torácicas¹⁻¹⁰. Las anomalías de los miembros que más se asocian a atresia de esófago son los defectos longitudinales preaxiales de los miembros superiores, es decir, la hipoplasia o aplasia del radio y del pulgar¹⁻¹⁰. A pesar de que algunos autores han encontrado una proporción considerable de escoliosis en niños con atresia de esófago¹⁴, en nuestra serie sólo la encontramos en un caso.

La naturaleza de las malformaciones esqueléticas de nuestra serie clínica se relaciona estrechamente (excepto por los casos de alteraciones de la segmentación vertebral) con aquellas encontradas en el modelo animal, en el que la atresia de esófago se acompañaba, en todos los casos examinados, de alteraciones estructurales de las vértebras, principalmente torácicas. Había también, al igual que en el humano, alteraciones sacras, costales y de los miembros.

El hecho de que se asocien defectos vertebrales, de las extremidades y del esófago en el mismo individuo, nos sugiere que estas anomalías, en apariencia independientes, podrían estar relacionadas a través de un mecanismo patogénico común.

En todas las especies animales, incluidos el hombre y la rata, durante la embriogénesis se produce un desarrollo segmentario del organismo que se evidencia, entre otras cosas, por la estructura segmentaria de la columna vertebral, cuyos segmentos se diferencian enormemente de uno a otro a lo largo de su eje longitudinal¹⁵. Tanto la forma como la identidad específicas de cada vértebra del organismo requiere la normal expresión de una familia de genes llamados Hox¹⁵. Boulet y col.¹⁶ En un estudio en el cual han obtenido un ratón homocigoto con el gen Hox c-4 no funcional, han demostrado defectos vertebrales torácicos, específica y únicamente desde T2 hasta T11, además de ausencia del esófago torácico. El estudio de nuestra extensa serie clínica demuestra que las anomalías que con mayor frecuencia se asocian a atresia de esófago son una hipersegmentación vertebral y también cuerpos vertebrales torácicos malformados. Por otro lado, en nuestro modelo animal hemos encontrado que las vértebras torácicas malformadas son con mayor frecuencia T2 y T11, coincidiendo exactamente con lo encontrado por Boulet y col. Estas evidencias indican que en la etiología de la atresia de esófago podría participar un defecto de los genes Hox.

Bibliografía

- Holder T, Cloud D, Lewis E et al: Esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. *Pediatrics* 34:542-549, 1964.
- German J, Mahour H, Woolley M: Esophageal atresia and associated anomalies. *J Pediatr Surg* 11:299-306, 1976.
- Louhimo I, Lindahl H: Esophageal atresia: primary results of 500 consecutively treated patients. *J Pediatr Surg* 18:217-229, 1983.
- Ein S, Shandling B, Wesson D et al: Esophageal atresia with distal tracheoesophageal fistula: associated anomalies and prognosis in the 1980s. *J Pediatr Surg* 24:1055-1059, 1989.
- Chittmittrapap S, Spitz L, Kiely M et al: Esophageal atresia and associated anomalies. *Arch Dis Child* 64:364-368, 1989.
- Rokitansky A, Kolankaya A, Bichler B et al: Analysis of 309 cases of esophageal atresia for associated congenital malformations. *Am J Perinatol* 11:123-128, 1994.
- Tovar JA, Rias EG, Martínez A et al: Malformations du rachis et des membres dans 120 cas d'atrésie de l'oesophage et de fistule trachéoesophagienne. *Ann Chir Inf* 15:2-38, 1973.
- Weigel W, Kaufmann H: The frequency and types of other congenital anomalies in association with tracheoesophageal malformations. *Clinical Pediatrics* 15:819-834, 1976.
- Stevenson R: Extra vertebrae associated with esophageal atresias and tracheoesophageal fistulas. *J Pediatr* 81:1123-1129, 1972.
- Dickens DRV, Myers NA: Oesophageal atresia and vertebral anomalies. *Pediatr Surg Int* 2:278-281, 1987.
- Diez-Pardo JA, Qi B, Navarro C et al: A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: Preliminary report. *J Pediatr Surg* 31:498-502, 1996.
- Simons EV, Van Horn JR: A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of chicken embryos, adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide. *Acte Morph Neerl Scand* 8:281-298, 1971.
- Ojeda JL, Barbosa E, Gómez Bosque P: Selective skeletal staining in whole chicken embryos: a rapid alcian blue technique. *Stain Techn* 45:137-138, 1970.
- Myers NA, Beasley SW, Auldirst AW: Associated anomalies, en Beasley SW, Myers NA, Auldirst AW: Oesophageal atresia. Chapman & Hall Medical, 1991, pp 211-262.
- Larsen WJ: Human embryology. 2nd ed. Churchill Livingstone, 1997, pp 73-106.
- Boulet AM, Capecchi MR: Targeted disruption of hox c-4 causes esophageal defects and vertebral transformations. *Dev Biol* 177:232-249, 1996.

Trabajo presentado en el 3º Congreso del CIPESUR, Viña del Mar, Chile, 1988.

Prof. Dr. Juan A. Tovar
Departamento de Cirugía
Hospital Infantil Universitario "La Paz"
P. de la Castellana 261
28046, Madrid España