



Correlació entre l'hemodinàmica, la morfometria, la histoquímica i l'estat neonatal en un model d'hipoplàsia pulmonar per hèrnia diafragmàtica congènita

Xavier Tarrado i Castellarnau

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA**

**Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Pediatria,
Radiologia i Anatomia**

Correlació entre l'hemodinàmica, la morfometria, la histoquímica i l'estat neonatal en un model d'hipoplàsia pulmonar per hèrnia diafragmàtica congènita.

Treball per a optar al títol de Doctor en Medicina realitzat per:

Xavier Tarrado i Castellarnau

Sota la direcció de:

**Dra. Asteria Albert Cazalla
Prof. Dr. Lluís Morales Fochs**

Barcelona, Febrer de 2014

AGRAÏMENTS

A la Dra. Astèria Albert pel seu estímul, consell, revisió crítica i entusiasme indestructible. La seva implicació ha estat essencial per a portar aquest projecte a bon port.

Als Drs. Jordi Prat i Lucas Krauel per la seva amistat, col·laboració i ajut durant el desenvolupament d'aquest treball. Per totes les hores compartides i l'esforç invertit en tirar aquest projecte endavant.

Als Drs. Alfons Nadal i Victòria Fusté del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic per la seva experta col·laboració en l'estudi histològic i immunohistoquímic

A la Dra. Victòria Cusí del Servei d'Anatomia Patològica per facilitar-nos l'ús de les seves instal·lacions per a la realització de l'estudi histopatològic.

Al Dr. Rogelio Cruz per la seva fonamental i imprescindible participació en la part hemodinàmica d'aquest treball

A la Srta. Raquel Iniesta de la Unitat de Recerca i Desenvolupament del Parc Sanitari Sant Joan de Déu per la seva col·laboració en el tractament estadístic de les dades.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social pel seu finançament. Beca FIS PI 06/0585

A tots membres del Servei de Cirurgia Pediàtrica de l'Hospital Sant Joan de Déu, en especial als Drs. Josep Maria Ribó i Vicky Julià, pel seu suport durant la realització d'aquest treball.

Al Prof. Dr. Lluís Morales per la seva direcció en aquest treball i pel seu mestratge des dels meus inicis en la cirurgia pediàtrica.

A la Pilar i el Joan Maria per totes les estones invertides en aquest treball gràcies al seu suport logístic.

A la meva dona Montse, pel seu incondicional suport, comprensió i recolzament durant tot el temps manllevat a ella i a la resta de la meva família per la realització d'aquesta tesi.

A la meva dona

Als meus fills

Als meus pares i germans

I. SIGLES UTILITZADES

CHAOS *Congenital High Airway Obstruction Syndrome* (Obstrucció congènita de la via aèria)

DE Diàmetre extern de l'arteriola

DI Diàmetre intern de l'arteriola

ECMO *Extracorporeal membrane oxygenation* (Oxigenació extracorpòria de membrana)

eNOS *Endothelial nitric oxide synthase* (Sintetasa endotelial d'òxid nítric)

FC Freqüència cardíaca

FETENDO PLUG *Fetal Endoscopic PLUG*

FLV *Fetal lung volume* (Volum pulmonar fetal)

FMBV *Fractional moving blood volume* (Fracció sanguínia en moviment)

FOP Foramen oval persistent

GPA Gruix de la paret arteriolar= $\frac{DE-DI}{DE} \times 100$

HD Hèrnia diafragmàtica

HDC Hèrnia diafragmàtica congènita

HH Herniació hepàtica (per ecografia)

HP Hipoplàsia pulmonar

HTP Hipertensió pulmonar

HTPP Hipertensió pulmonar persistent

IHQ Immunohistoquímica

iNO Òxid nítric inhalat

iNOS *Induced nitric oxide synthase* (Sintetasa induïda d'òxid nítric)

LBWR *Lung-to-body weight ratio* (Raó pes pulmó/pes corporal)

LHR *Lung-to-head ratio* (Raó pulmó-perímetre cefàlic)

o/e **LHR** *Observed-to-expected LHR* (LHR observat-esperat)

NO *Nitric oxide* (Òxid nítric)

OT Oclusió traqueal

PDA Persistència de *ductus* arteriós

PDGF-A *Platelet derived growth factor* (Factor de creixement derivat de plaquetes-A)

PEDRF *Peak of early diastolic reversed flow* (Pic màxim de flux revers diastòlic)

PEEP *Positive end-expiratory pressure* (Pressió positiva teleespiratòria)

PI *Pulsatility Index* (Índex de pulsatilitat)

PLUG *Plug-the-Lung-Until-it-Grows* ("Oclusió traqueal fins que el pulmó creixi")

PMP Placa mesenquimàtica posthepàtica

PPF *Pleuroperitoneal folds* (Plecs pleuroperitoneals)

PSV *Peak of maximum systolic speed flow* (Velocitat sistòlica màxima)

RAC *Radial alveolar count* (Recompte alveolar radial)

RBP *Retinol binding protein* (Proteïna d'unió al retinol)

RGE Reflux gastroesofàgic

SaO₂ Saturació d'oxigen

TGF-β3 *Transforming growth factor β3* (Factor de creixement transformador)

TTF1 *Thyroid transcription factor 1* (Factor de transcripció tiroïdal 1)

VAFO Ventilació d'alta freqüència oscil·latòria

VEGF *Vascular endothelial growth factor* (Factor de creixement vascular endotelial)

Wb Western blot

σ desviació estàndard

mitjana aritmètica

R rang

II. ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Síndromes genètiques associades a HDC.....	24
Taula 2. Resum de les fases de desenvolupament pulmonar.....	29
Taula 3. Factors implicats en HDC humana o murina	32
Taula 4. Indicadors ecogràfics utilitzats amb finalitat pronòstica.....	63
Taula 5. Resultats de l'oximetria i freqüència cardíaca.....	101

III. ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Radiografia d'un pacient amb hèrnia diafragmàtica esquerra.....	20
Figura 2. Esquema dels diferents tipus de Defectes Diafragmàtics Congènits	21
Figura 3. Regions cromosòmiques i gens candidats per l'HDC.....	25
Figura 4. Components embriològics clàssics del diafragma	26
Figura 5. Arborització bronquial i fases del desenvolupament pulmonar.....	30
Figura 6. Interaccions cel·lulars en models animals d'HDC	34
Figura 7. Llei de Poiseuille.....	36
Figura 8. Fisiopatologia de la HTP associada a la HDC	38
Figura 9. Bronquíol respiratori amb la representació de la mesura del RAC.....	40
Figura 10. Traçat d'ona arterial amb doppler pulsat	47
Figura 11. Doppler pulsat sobre l'artèria pulmonar	47
Figura 12. RX neonatal d'un pacient amb HDC esquerra.....	49
Figura 13. Evolució del paradigma quirúrgic al mèdic	52
Figura 14. Taxes de supervivència en HDC esquerres aïllades.....	65
Figura 15. Desenvolupament pulmonar en els diferents models animals	74
Figura 16. Conilla gestant neozelandesa blanca i quiròfan experimental	83
Figura 17. Exteriorització de les banyes uterines	84
Figura 18. Localització del cap i coll del fetus.....	85
Figura 19. Exteriorització del cap, el tòrax i l'extremitat superior esquerra.....	85
Figura 20. Toracotomia, exposició del diafragma i apertura.....	86
Figura 21. Aspecte del fetus postextracció, amb la toracotomia suturada	87
Figura 22. Orifici diafragmàtic amb lòbul hepàtic esquerra herniat.....	88
Figura 23. Doppler pulsat sobre l'artèria intrapulmonar	87
Figura 24. Power-doppler de l'àrea d'interès on s'estima la perfusió pulmonar	87
Figura 25. Morfometria bronquioloalveolar. Recompte alveolar radial (I).....	89
Figura 26. Morfometria bronquioloalveolar. Recompte alveolar radial (II)	89
Figura 27. Morfometria arteriolar pulmonar (I)	93
Figura 28. Morfometria arteriolar pulmonar (II)	93
Figura 29. Evolució dels fetus intervinguts quirúrgicament	97
Figura 30. Diagrama de caixes de la variable PI	99
Figura 31. Diagrama de caixes de la variable FMBV	100
Figura 32. Diagrama de caixes de la variable Pes fetus	102
Figura 33. Diagrama de caixes de la variable Pes pulmó.....	103
Figura 34. Diagrama de caixes de la variable Pes pulmó / Pes fetus	104
Figura 35. Diagrama de caixes de la variable RAC	105
Figura 36. Diagrama de caixes de la variable GPA.....	106
Figura 37. Distribució de les mesures de GPA.....	107

Figura 38. Western blot de TGF- β 3	108
Figura 39. Correlació significativa entre PI i pes pulmó.....	109
Figura 40. Correlació significativa entre PI i LBWR.....	110
Figura 41. Correlació significativa entre PI i RAC	110
Figura 42. Correlació significativa entre FMBV i PI.....	111
Figura 43. Correlació significativa entre RAC i LBWR	112
Figura 44. Correlació significativa entre GPA i DI.....	112
Figura 45. Correlació significativa entre GPA i DE.....	113
Figura 46. Correlació no significativa entre RAC i SaO ₂	113
Figura 47. Correlació no significativa entre GPA i SaO ₂	114
Figura 48. Correlació no significativa entre LBWR i FC.....	114
Figura 49. Comparació entre el desenvolupament pulmonar humà i del conill.....	115
Figura 50. Teoria “ <i>dual-hit</i> ” en la patogènia de la HP de la HDC.....	117
Figura 51. Distribució proporcional de les mesures de morfometria arteriolar.....	121

IV. ÍNDEX GENERAL

I. SIGLES UTILITZADES	7
II. ÍNDEX DE TAULES	9
III. ÍNDEX DE FIGURES	9
IV. ÍNDEX GENERAL	11

1. JUSTIFICACIÓ	15
-----------------------	----

2. INTRODUCCIÓ	17
----------------------	----

2.1. L'HÈRNIA DIAFRAGMÀTICA CONGÈNITA EN L'ÉSSER HUMÀ	20
---	----

2.1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.1.2. ETIOLOGIA.....	23
2.1.3. EMBRIOLOGIA.....	25
2.1.3.1. EMBRIOLOGIA DEL DIAFRAGMA.....	25
2.1.3.2. EMBRIOLOGIA DEL PULMÓ	27
2.1.4. ETIOPATOGÈNIA DE L'HDC.....	31
2.1.5. FISIOPATOGÈNIA DE L'HDC.....	34
2.1.5.1. HIPOPLÀSIA PULMONAR (HP).....	34
2.1.5.2. HIPERTENSIÓ PULMONAR (HTP)	36
2.1.6. HISTOPATOLOGIA.....	39
2.1.6.1. HISTOPATOLOGIA DE LA HP	39
2.1.6.2. HISTOPATOLOGIA DE LA HTP.....	41
2.1.7. DIAGNÒSTIC PRENATAL.....	41
2.1.7.1. DIAGNÒSTIC PRENATAL D'HDC.....	41
2.1.7.2. DIAGNÒSTIC PRENATAL D'HP	43
2.1.7.3. DIAGNÒSTIC PRENATAL D'HTP	45
2.1.7.3.1. Hemodinàmica pulmonar	46
2.1.8. EVOLUCIÓ CLÍNICA POSTNATAL.....	49
2.1.9. TRACTAMENT	50
2.1.9.1. PERSPECTIVA HISTÒRICA.....	50
2.1.9.2. PERSPECTIVA ACTUAL	52
2.1.9.3. TRACTAMENT PRENATAL	54
2.1.9.4. TRACTAMENT POSTNATAL.....	57
2.1.9.4.1. Tractament postnatal mèdic	57
2.1.9.4.2. Tractament postanatal quirúrgic	60
2.1.10. PRONÒSTIC.....	62
2.1.10.1. PARÀMETRES PRONÒSTICS ECOGRÀFICS	62
2.1.10.2. SEGUIMENT I SEQÜELES	67

2.2. MODELS ANIMALS EXPERIMENTALS D'HDC	70
---	----

2.2.1. MODEL TERATOGENIC: NITROFÈN	70
2.2.2. MODELS GENÈTICS	72
2.2.3. MODELS QUIRÚRGICS	73
2.2.3.1. MODEL QUIRÚRGIC EN OVELLA	74
2.2.3.2. MODEL QUIRÚRGIC EN CONILL.....	76

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	79
3.1. HIPÒTESI.....	79
3.2. OBJECTIUS	79
4. MATERIAL I MÈTODE.....	81
4.1. MATERIAL.....	81
4.1.1. SUBJECTES D'ESTUDI.....	81
4.1.2. GRUPS D'ESTUDI	81
4.1.3. CRITERIS D'INCLUSIÓ I EXCLUSIÓ.....	82
4.1.4. INFRAESTRUCTURA I PERSONAL	82
4.2. MÈTODE.....	82
4.2.1. DISSENY EXPERIMENTAL.....	82
4.2.2. METODOLOGIA.....	83
4.2.2.1. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	83
4.2.2.1.1. Primer procediment.....	83
4.2.2.1.2. Segon procediment	86
4.2.2.1.3. Tercer procediment.....	87
4.2.2.2. RECOLLIDA DE MOSTRES.....	87
4.2.2.3. VARIABLES D'ESTUDI.....	88
4.2.2.4. MESURA DE LES VARIABLES.....	89
4.2.2.4.1. Estudis hemodinàmics	89
4.2.2.4.2. Estudis clínics neonatals	90
4.2.2.4.3. Estudis histopatològics	91
4.2.2.4.3.1. Generals	91
4.2.2.4.3.2. Morfometria bronquioloalveolar.....	91
4.2.2.4.3.3. Morfometria arteriolar pulmonar	92
4.2.2.4.4. Estudis immunohistoquímics	94
4.2.2.5. CRITERIS D'EXCLUSIÓ DE LES MOSTRES	95
4.2.2.6. ANÀLISI ESTADÍSTICA	95
5. RESULTATS	97
5.1. RENDIMENT	97
5.2. ESTUDI HEMODINÀMIC	98
5.2.1. INDICADORS DE RESISTÈNCIA PULMONAR.....	98
5.2.1.1. ÍNDEX DE PULSATILITAT (PI).....	98
5.2.1.2. PIC MÀXIM DE FLUX REVERS DISTÒLIC (PERDF).....	99
5.2.1.3. VELOCITAT SISTÒLICA MÀXIMA (PSV)	99
5.2.2. INDICADOR DE PERFUSIÓ PULMONAR.....	99
5.2.2.1. FRACCIÓ SANGUÍNIA EN MOVIMENT (FMBV).....	99
5.3. ESTUDI CLÍNIC	100
5.3.1. EXPLORACIÓ DE LA VITALITAT NEONATAL	100

5.3.2. OXIGENACIÓ NEONATAL I FREQUÈNCIA CARDÍACA.....	100
5.3.3. MORTALITAT NEONATAL.....	101
5.4. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC	101
5.4.1. GENERAL.....	102
5.4.1.1. PES FETUS	102
5.4.1.2. PES PULMÓ.....	102
5.4.1.3. RAÓ PES PULMÓ/PES FETUS (LBWR).....	103
5.4.2. MORFOMETRIA	104
5.4.2.1. RECOMPTE ALVEOLAR RADIAL (RAC)	104
5.4.2.2. MORFOMETRIA ARTERIOLAR.....	105
5.5. ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC	107
5.6. ESTUDI DE L'ASSOCIACIÓ ENTRE VARIABLES.....	109
6. DISCUSSIÓ.....	115
6.1. DISCUSSIÓ DEL MATERIAL I DEL MÈTODE.....	115
6.1.1. DISCUSSIÓ DEL MODEL.....	115
6.1.2. DISCUSSIÓ DE LES VARIABLES D'ESTUDI.....	118
6.2. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS	122
6.2.1. RENDIMENT	122
6.2.2. ESTUDI HEMODINÀMIC.....	124
6.2.3. ESTUDI CLÍNIC	125
6.2.4. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC.....	127
6.2.5. ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC.....	128
6.2.6. CORRELACIONS ENTRE VARIABLES.....	130
7. CONCLUSIONS.....	133
8. RELLEVÀNCIA I PERSPECTIVES FUTURES	135
8.1. RELLEVÀNCIA	135
8.2. PERSPECTIVES FUTURES.....	135
9. BIBLIOGRAFIA	137

1. JUSTIFICACIÓ

JUSTIFICACIÓ DE L'INTERÈS I RELLEVÀNCIA DEL TEMA

Actualment, ja de ple en el segle XXI, l'evolució de la supervivència de les patologies quirúrgiques congènites greus ha experimentat una millora molt important respecte a dècades anteriors. Patologies com l'atrèsia d'esòfag i la gastròsquisi, amb mortalitats elevades fa 50 anys, tenen actualment supervivències que arriben virtualment al 100% dels casos, amb una morbiditat que ha disminuït radicalment amb els tractaments i el seguiment que podem oferir a aquests pacients avui dia.

L'hèrnia diafragmàtica congènita (HDC), però, és l'excepció a aquesta tendència i la seva mortalitat està estabilitzada al voltant del 40-50%. Tot i que fa uns anys semblava que es començaven a aconseguir xifres més baixes (fins a 17% que va reportar el grup de Boston) gràcies a les millores en teràpia neonatal, ara aquestes diferències tan grans finalment s'han atribuït a biaixos de selecció i a no tenir en compte la mortalitat oculta (avortaments espontanis o voluntaris, i mortalitat perinatal). Quan es mira d'evitar aquest biaix i es fan estudis poblacionals la mortalitat global arriba fins al 60%.^{1,2} I arriba al 68% si comptem la mortalitat fins a l'any postnatal.³

Els principals factors relacionats amb la mortalitat postnatal són les malformacions associades i el grau d'hipoplàsia pulmonar.⁴

Atesa la incidència d'aquesta malformació (1/2500-5000) i les limitacions per a l'estudi *in vivo*, la investigació fonamental en l'HDC es centra en models experimentals en animals. Tot i els nombrosos grups que hi estan treballant en els darrers anys i els notables avenços en l'estudi de l'HDC, fins al moment els mecanismes involucrats en els canvis histològics i funcionals del pulmó hipoplàstic no han estat plenament identificats.

L'estratègia d'aprofundir en el coneixement dels canvis que produeix l'HDC en el pulmó en un model animal, tant a nivell histològic com en l'expressió dels factors de creixement que participen en les diferents etapes del desenvolupament pulmonar, pretén contribuir a inferir els mecanismes que intervenen en el creixement i el desenvolupament pulmonar alterat que presenten els fetus humans amb HDC.

Fora dels estudis amb mostres *ex vivo*, l'estudi prenatal de l'HDC es basa en les tècniques d'imatge com l'ecografia convencional i l'ecografia-doppler. L'ús d'aquestes tècniques tant

en fetus humans com en animals té la seva aplicació fonamental en la validació d'índexs pronòstics a partir de mesures morfològiques. Recentment s'han descrit indicadors hemodinàmics obtinguts amb ecografia prenatal amb el mateix objectiu. Fins ara, però, no s'han correlacionat aquests indicadors hemodinàmics prenatals que avaluen els canvis de resistència de la circulació pulmonar en situació d'HDC amb la resta de dades d'hipoplàsia pulmonar. Creiem que aquestes correlacions tindrien un interès clínic rellevant per a la classificació pronòstica i eventual tractament prenatal que se'n pugui derivar.

Per últim, tres fets han estat importants en la decisió d'iniciar aquest estudi experimental. Un ha estat la construcció d'un edifici docent i d'investigació al nostre centre, dotat d'un estabulari ben equipat i amb total disponibilitat. El segon ha estat la plena participació de l'Hospital Sant Joan de Déu en la implementació de la teràpia fetal en col·laboració amb l'Institut Clínic d'Obstetrícia, Ginecologia i Neonatologia de l'Hospital Clínic-IDIBAPS. I tercer, l'experiència del nostre grup en cirurgia fetal en conill. Aquests tres fets han suposat una oportunitat i alhora un estímul per a iniciar aquest estudi.

2. INTRODUCCIÓ

L'hèrnia diafragmàtica consisteix en una solució de continuïtat en el diafragma, ja sigui de causa congènita (HDC) o adquirida, que permet el desplaçament de vísceres abdominals cap al tòrax.

El diafragma o múscul diafragmàtic és el principal múscul respiratori, presenta dues meitats en forma de cúpula a cada costat de la línia mitjana i és l'estructura anatòmica que separa les vísceres abdominals de les toràciques.

Existeixen diferents tipus de defectes diafragmàtics congènits. El més freqüent i que origina major morbimortalitat és l'orifici posterolateral o de Bochdalek, descrit al 1679 per Riverius i caracteritzat amb precisió per Bochdalek al segle XIX. Aquest orifici permet el pas de les vísceres abdominals cap al tòrax des de fases precoces de la gestació i s'associa amb un inadequat creixement i desenvolupament del pulmó que és el principal determinant del pronòstic. És per això que quan es parla d'HDC, es parla de la combinació del defecte muscular amb la presència d'hipoplàsia pulmonar.^{5,6}

Es tracta d'una patologia molt greu, amb una mortalitat encara molt elevada (40-62%), tot i els avenços en el seu tractament.^{1,2}

La hipoplàsia pulmonar (HP) és un desenvolupament insuficient del pulmó, consistent en una reducció del nombre de vies respiratòries, alvèols i vasos sanguinis.

L'associació de la HP a la HDC es coneix des de mitjans del segle passat.⁷ Poc després es va proposar com a agent causal de l'elevada mortalitat que presentaven els pacients amb HDC.⁸

En condicions normals, el diàmetre de les arterioles pulmonars en aproximar-se al terme de la gestació es redueix, i ho fa a expenses d'un aprimament del gruix muscular. Tot i que no es coneix la base molecular d'aquest fenomen, el que s'ha observat és que els pacients amb HDC experimenten una menor reducció del gruix de les capes muscular i adventícia i, per tant, del gruix total. Aquestes troballes també s'han observat en models experimentals.⁹

Les arterioles són les principals responsables de les resistències vasculars pulmonars. En els pacients amb HDC, a més de l'engruiximent de la paret i una disminució en el nombre

d'arterioles, s'hi afegeix una expressió alterada de factors de regulació del to vascular, que té globalment com a conseqüència la hipertensió pulmonar (HTP).¹⁰

La clínica de l'HDC és fonamentalment respiratòria i es presenta ja des del període neonatal immediat. Consisteix en un destret respiratori progressiu i sever amb un abdomen excavat i un hemitòrax ocupat per les vísceres abdominals. El tub digestiu herniat pot distendre's més amb les maniobres de reanimació, desplaçant el mediastí cap al costat contrari de l'HDC, cosa que empitjora encara més el destret.

En els pacients amb HDC després de néixer no es produeix la caiguda fisiològica de la pressió pulmonar, cosa que provoca una persistència de la circulació fetal. Hemodinàmicament es tradueix en unes pressions pulmonars altes, un flux pulmonar baix i un *shunt* dreta-esquerra pel *foramen* oval i pel *ductus* arteriós. Com passa sang no oxigenada a territori sistèmic, hi ha hipoxèmia que estimula la vasoconstricció pulmonar i tanca el cercle viciós. Per això, la insuficiència respiratòria dependrà sobretot del grau de HP i HTP. La HTP, com veurem, és una de les principals causes de morbimortalitat de l'HDC, fins i tot temps després del període neonatal.

Abans de la dècada dels 80 es creia que la reducció del contingut herniat i el tancament del diafragma eren una urgència quirúrgica per tal d'aconseguir una re-expansió pulmonar el més ràpidament possible. La demostració que el destret respiratori es deu fonamentalment a la HP i la HTP, i no a la compressió pulmonar, va canviar els conceptes fisiopatològics i els plantejaments terapèutics. Actualment la prioritat és l'estabilització ventilatòria amb el menor barotrauma possible i el tancament de l'hèrnia un cop estabilitzat el pacient.

Ateses les limitacions del tractament postnatal per aconseguir una bona oxigenació, va sorgir la idea d'intentar millorar el desenvolupament pulmonar prenatalment. Harrison, el 1980, va demostrar en un model animal d'HDC que la HP és reversible en el període prenatal.¹¹ Això va crear unes grans expectatives en el tractament quirúrgic prenatal de l'HDC. En base als resultats del seu model oví, que demostrava la millora de la HP amb la reparació quirúrgica prenatal,¹² Harrison va iniciar el tractament fetal de l'HDC en humans amb cirurgia fetal oberta per tal de tancar el defecte diafragmàtic.¹³ Posteriorment, atesa la significativa morbimortalitat fetal d'aquest procediment, es va acabar descartant l'abordatge.¹⁴ Gràcies a aquests estudis, avui dia sembla clar que per a millorar el pronòstic cal modificar la

fisiopatologia prenatalment, abans que els pulmons siguin afectats de forma irreversible. Per això calen tant models experimentals animals com estudis *in vivo* en humans per avaluar factors pronòstics i noves teràpies fetals més enllà de la cirurgia de l'hèrnia.

La demostració que l'oclusió de la tràquea fetal indueix creixement pulmonar,¹⁵ ha conduït aquestes dues darreres dècades a la realització d'assajos clínics per tal d'avaluar l'eficàcia d'aquesta mesura globalment,¹⁶ i de definir els grups de risc en els quals es justificaria un tractament prenatal.¹⁷ Actualment aquests assajos continuen i no està ben establert encara quins pacients se'n beneficien clarament.

El 90% de les HDC es diagnostiquen actualment abans del naixement per mitjà de les ecografies d'*screening* prenatal. Per predir el grau d'hipoplàsia pulmonar, actualment s'utilitzen mesures ecogràfiques del pulmó que es comparen amb controls sans de la mateixa edat gestacional. La predicció pronòstica dels pacients amb HDC es basa en la correlació d'aquestes mesures amb les conseqüències clíniques observades postnatalment. La definició dels paràmetres prenatals que es correlacionin millor amb el grau d'HP, i per tant amb el pronòstic, és fonamental per a l'estratificació del risc i l'adequació dels tractaments. Fins ara s'han establert dos factors ecogràfics de mal pronòstic, independents l'un de l'altre, que són la hipoplàsia pulmonar intrauterina i la presència de fetge intratoràcic.¹⁸ Tot i la seva utilitat, el valor predictiu d'aquests paràmetres no sempre és fiable. És necessari doncs, continuar buscant millors paràmetres ecogràfics que es correlacionin millor amb el pronòstic dels pacients. Fins fa poc no disposàvem de paràmetres que també avaluessin la HTP. L'obtenció de dades hemodinàmiques fetals amb l'ecografia-doppler pot resultar molt prometedora en aquest sentit.

En la recerca bàsica en HDC s'han utilitzat i es continuen utilitzant diversos models experimentals animals d'hèrnia diafragmàtica. Per a induir el defecte i la hipoplàsia pulmonar en rates i ratolins s'utilitzen teratògens, mentre que en conill i ovella el defecte es crea quirúrgicament. Aquests models continuen sent el principal vehicle en la recerca i la principal font de dades en la investigació de l'HDC, ateses les limitacions de l'estudi en l'espècie humana.

2.1. L'HÈRNIA DIAFRAGMÀTICA CONGÈNITA EN L'ÉSSER HUMÀ

L'HDC és una greu malformació diafragmàtica en la que les vísceres abdominals ocupen el tòrax ascendint a través d'un orifici diafragmàtic, causant un estancament del desenvolupament pulmonar o hipoplàsia pulmonar, que és la responsable de l'elevada morbimortalitat d'aquesta patologia.

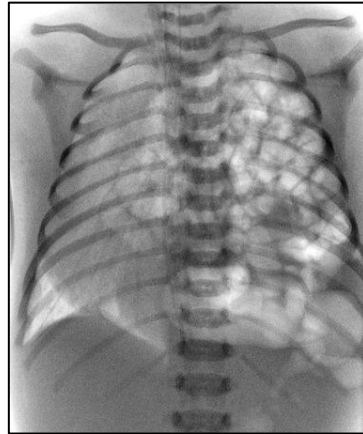


Figura 1. Radiografia d'un pacient amb una hèrnia diafragmàtica esquerra. Mostra l'ascens de les vísceres abdominals (fonamentalment intestí) que ocupen tot l'hemitòrax esquerre, desplaçant el mediastí cap a la dreta.

L'HDC té moltes facetes i ha estat extensament estudiada des de tots els punts de vista (etirològic, histològic, fisiopatològic, terapèutic, etc), però són encara molts els aspectes que se'n desconeixen. Per això, anem a revisar-ne en profunditat els coneixements actuals.

2.1.1. EPIDEMIOLOGIA

La seva incidència estimada és de 1/2500-5000 nounats vius. Es considera, però, que la malformació té una incidència major oculta en els freqüents casos d'avortament espontani que s'han observat amb aquest defecte.¹⁹

Es tracta d'una patologia molt greu, amb una mortalitat encara molt elevada (40-62%), que sembla no haver millorat tot i els avenços en el tractament prenatal i neonatal.^{1, 2} Les sèries amb una mortalitat més baixa s'han atribuït a l'augment de la taxa d'avortaments electius i a la mortalitat oculta (morts fetals, mortinats i morts neonatals prèvies al trasllat a un centre de referència).² Aquesta mortalitat oculta s'ha quantificat, en una metaanàlisi sobre 51 treballs al llarg de 23 anys, en al voltant del 35% dels casos poblacionals.²⁰ En estudis poblacionals,

la mortalitat a l'any de vida arriba al 68% dels casos globalment, al 70% si considerem només aquells que tenen diagnòstic prenatal, al 39% si només comptem els que han nascut, però només el 29% dels que es diagnostiquen postnatalment.³ Aquestes diferències es deuen al fet que els casos de pitjor pronòstic poden conduir a morts fetals, avortaments espontanis o electius que no es comptabilitzen en la mortalitat dels casos nascuts, i que aquells que es diagnostiquen postnatalment solen tenir defectes petits que condicionen una supervivència molt major.

La forma més freqüent (75-85%) i més greu d'HDC és la descrita per Vincent Alexander Bochdalek el 1848, que es localitza en la part posterior del diafragma i duu el seu nom com a epònim. Tots els defectes laterals, posterolaterals i posteromedials s'etiqueten habitualment d'hèrnia de Bochdalek i es pensa que es produeixen a través del canal de Bochdalek en la zona del triangle lumbocostal.²¹ S'ha proposat una nova classificació basada en la localització del defecte per tal d'unificar la nomenclatura, adequar-la a les troballes, i extraure'n conclusions en estudis ulteriors (Fig. 2).²² Mentre que sol haver-hi sempre un romanent diafragmàtic anterior de major o menor mida, en la zona posterolateral el diafragma pot ser completament absent.

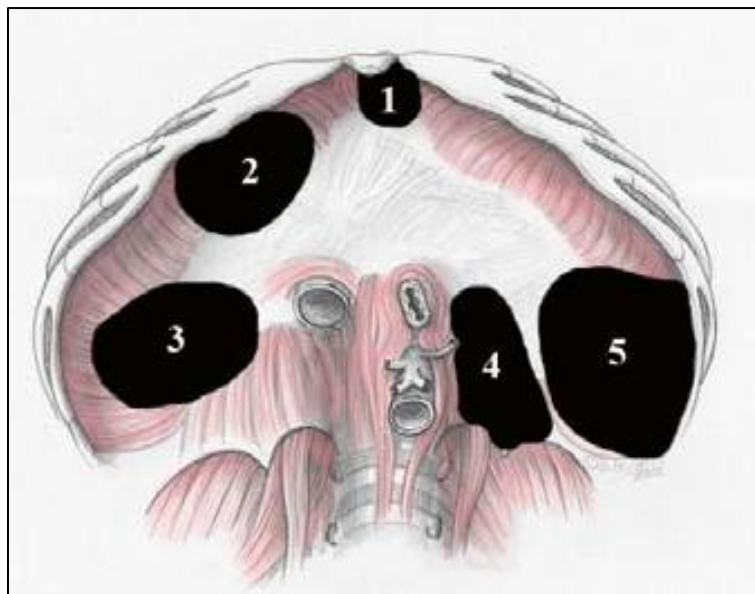


Figura 2. Esquema dels diferents tipus de Defectes Diafragmàtics Congènits en la nova classificació proposada per Ackerman:²² 1. Anterior; 2. Anterolateral; 3. Posterolateral; 4. Posteromedial; 5. Posterolateral sense llavi posterior. (Els tipus 3, 4 i 5 ara s'inclouen en la definició d'hèrnia de Bochdalek).

L'HDC és unilateral en >95% dels casos. Aproximadament un 80% dels defectes són al costat esquerre, i un 20% al dret. Es tracta d'una malformació habitualment esporàdica i aïllada, tot i que s'han descrit casos familiars i en síndromes polimalformatives.²³ En l'apartat 2.1.2. es desenvolupen aquests aspectes etiològics.

L'HDC no sol tenir sac herniari. Només un 10% dels casos en presenta i es creu que deriva del teixit mesotelial parietal o del teixit connectiu del diafragma. No es coneix quina és la causa de la presència o no de sac. A diferència de les HDC posteriors, les anteriors, centrals i anterolaterals, si que solen tenir sac.²¹ El pronòstic d'aquestes hèrnies anteriors és excel·lent a diferència de l'HDC posterior.

Malformacions associades

Malgrat que sol ser una malformació en general aïllada, entre un 30-50% dels casos nascuts presenten alguna malformació associada. Les més freqüents són les cardíques (60% tot i excloent el *foramen* oval permeable i el *ductus* arteriós persistent).²⁴ Es troben també malformacions associades al sistema nerviós, genitourinàries, gastrointestinals, esquelètiques i pulmonars. La presència d'anomalies associades majors (defectes de tub neural, cardiovasculars, atrèsies intestinals i cromosomopaties) comporta una major mortalitat. De fet, en casos de mort fetal amb HDC, la presència de malformacions associades és virtualment del 100%. Altres anomalies associades influeixen poc en la mortalitat, com són les malformacions genitourinàries, el diverticle de Meckel i les anomalies neurològiques menors.^{1, 24}

Només un 10% es presenten en el context d'una síndrome coneguda.²⁰

Patologia derivada de l'HDC

La pròpia HDC és l'element fonamental en l'etiopatogènia d'algunes patologies associades. Aquestes solen afectar els pulmons i el tub digestiu.

- Hipoplàsia pulmonar (HP)

És la patologia associada més greu. És la principal responsable de l'elevada morbimortalitat de l'HDC. Per això, aquesta és desenvolupa de forma extensa en l'apartat 2.1.5.1.

- Reflux gastroesofàgic (RGE)

Es tracta d'una de les comorbiditats més freqüents de l'HDC. Segons algunes sèries aquest es presenta fins en un 70% dels casos d'HDC (quan s'estudien sistemàticament tots els pacients), si bé només un 16% són simptomàtics. El RGE es pot presentar de forma precoç o tardana i, per tant, es recomana un seguiment a llarg termini per tal de descartar-ne l'aparició. Més enllà del període preescolar s'ha detectat una incidència del 12%.²⁵ Entre els factors predictius independents de RGE, s'han identificat la presència d'estómac intratoràcic i la mida de l'orifici herniari valorada segons la necessitat o no d'un pegat per a la seva reparació.²⁵

Tot i que no es coneix amb certesa l'etiopatogènia del RGE en l'HDC, s'ha suggerit la seva relació amb:^{6, 25}

- Una malformació anatòmica de la unió esofagògica (sobretot en els casos d'estómac intratoràcic).
- Una hipoplàsia del pilar diafragmàtic esquerre i una manca d'esòfag intraabdominal.
- Una alteració del desenvolupament esofàgic que en provocaria èctasi i dilatació intrínseca.
- Un augment de pressió intraabdominal resultant de reintroduir el contingut herniat a dins l'abdomen.

- Malrotació intestinal

La malrotació intestinal en l'HDC es produeix per l'alteració del procés normal de rotació intestinal de 270° i dels fenòmens de coalescència al retroperitoneu, degut a que el budell està desplaçat al tòrax. Això macroscòpicament es tradueix en bandes colohepatoduodenals que poden ser obstructives i/o per una arrel mesentèrica estreta que podria teòricament permetre un vòlvul de l'intestí mig.⁴

2.1.2. ETIOLOGIA

Encara es desconeixen els mecanismes etiològics profunds de l'HDC. Entre un 50-70% dels casos presenten l'HDC de forma aïllada. Tot i que no es coneixen encara les alteracions

genètiques responsables de l'HDC, si que hi ha síndromes a les quals s'ha trobat associada, encara que esporàdicament, i que tenen un gen responsable conegut (p. ex. Sd. de Beckwith-Wiedemann, Sd. de Denys-Drash, Sd. de Pearlman, Sd. de Fryns, Sd. de Pallister-Killian). En la Taula 1, es resumeixen les síndromes descrites que poden associar HDC, el gen i el cromosoma afectat, el tipus d'herència i el fenotip.

Taula 1. Síndromes genètiques associades a HDC²⁶

Syndrome Name	Chromosome(s)	Gene(s)	Brief Description
Beckwith-Wiedemann (MIM 130650)	11p15, 5q35	<i>CDKN1C</i> (MIM 600856), <i>NSD1</i> (MIM 606681)	Autosomal dominant inheritance, macroglossia, hypoglycemia, visceromegaly, abdominal-wall defects, and overgrowth
CHARGE (MIM 214800)	8q12.1	<i>CHD7</i> (MIM 608892)	Autosomal dominant inheritance, coloboma, cardiac abnormalities, choanal atresia, growth retardation, genital abnormalities, ear abnormalities, and hearing loss
Cornelia de Lange (MIM 122470 and 300590)	5p13.1, Xp11.22-p11.21	<i>NIPBL</i> (MIM 608667), <i>SMC1A</i> (MIM 300040)	Autosomal dominant inheritance, distinctive facial features, microcephaly, hirsutism, malformations of the upper limbs, and growth retardation
Craniofrontonasal (MIM 304110)	Xq12	<i>EFNB1</i> (MIM 300035)	X-linked dominant inheritance, females more severely affected, craniosynostosis, hypertelorism, broad nasal tip, grooved nails of the hallux and thumb, syndactyly, and skeletal abnormalities
Denys-Drash (MIM 194080)	11p13	<i>WT1</i> (MIM 607102)	Autosomal dominant inheritance, male pseudohermaphroditism, genital abnormalities, and increased risk of Wilms tumor
Donnai-Barrow (MIM 222448)	2q23-q31 ²⁰	...	Autosomal recessive inheritance, CDH, omphalocele, agenesis of the corpus callosum, hypertelorism, and hearing loss
Fryns (MIM 229850)	Fryns-like phenotype has been seen with duplication of 1q24-q31.2; deletion of the terminal portion of 6q, 8p23.1, and 15q26; and partial trisomy 22 ^{24,26-29}	...	Autosomal recessive inheritance, CDH, coarse facial features, cleft lip/palate, cardiac malformations, cerebral abnormalities, and hypoplastic finger/toenails
Pallister-Killian (MIM 601803)	Mosaic tetrasomy 12p	...	Coarse facial features with broad forehead and hypertelorism, sparse temporal hair, hypopigmentations, and mental retardation
Simpson-Golabi-Behmel (MIM 312870 and 300209)	Xq26, Xp22.3-p22.2	<i>GPC3</i> (MIM 300037), <i>CXORF5</i> (MIM 300170)	X-linked recessive inheritance, macrosomia, coarse facial features, hypertelorism, macroglossia, skeletal abnormalities, abdominal-wall defects, and renal abnormalities
Thoracoabdominal (MIM 313850)	Xq25-q26.1	...	X-linked dominant inheritance, diaphragmatic and ventral hernias, hypoplastic lungs, and cardiac anomalies
Wolf-Hirschhorn (MIM 194190)	4p16	...	"Greek helmet" facial appearance, mental and growth retardation, cleft lip/palate, cardiac defects, and epilepsy

L'estudi de les mutacions d'aquests gens relacionats amb formes sindròmiques d'HDC, com el gen del tumor de Wilms 1 (WT1) respecte de les síndromes WAGR (Síndrome tumor de Wilms-anirídia) i Denys-Drash, ha resultat normal en les formes esporàdiques d'HDC. Altres casos tenen connectivopaties com a causa subjacent (p. ex. Sd. de Marfan). L'HDC també s'associa en un 10-15% dels casos a cromosomopaties (Sds. d'Edwards, Turner, Down, Patau). Finalment, de forma excepcional, s'ha pogut relacionar amb fàrmacs com la quinina, la talidomida i els anticòmics sense haver-se identificat de forma consistent teratògens ni factors epidemiològics de risc.^{27, 28, 29}

Per bé que la base genètica de la HDC s'ha estudiat abastament, no s'ha pogut establir que les alteracions genètiques en siguin la causa última. Els estudis genètics en casos d'HDC han trobat múltiples mutacions en tots els cromosomes, inclosos els sexuals, sense poder concloure quin paper juguen en la etiopatogènia de la malformació.²⁶

Aquelles regions cromosòmiques i gens més freqüentment afectats s'han postulat amb major força com a substrat de la HDC. A la Figura 3 es resumeixen aquestes regions, els gens coneguts i el tipus d'alteració.

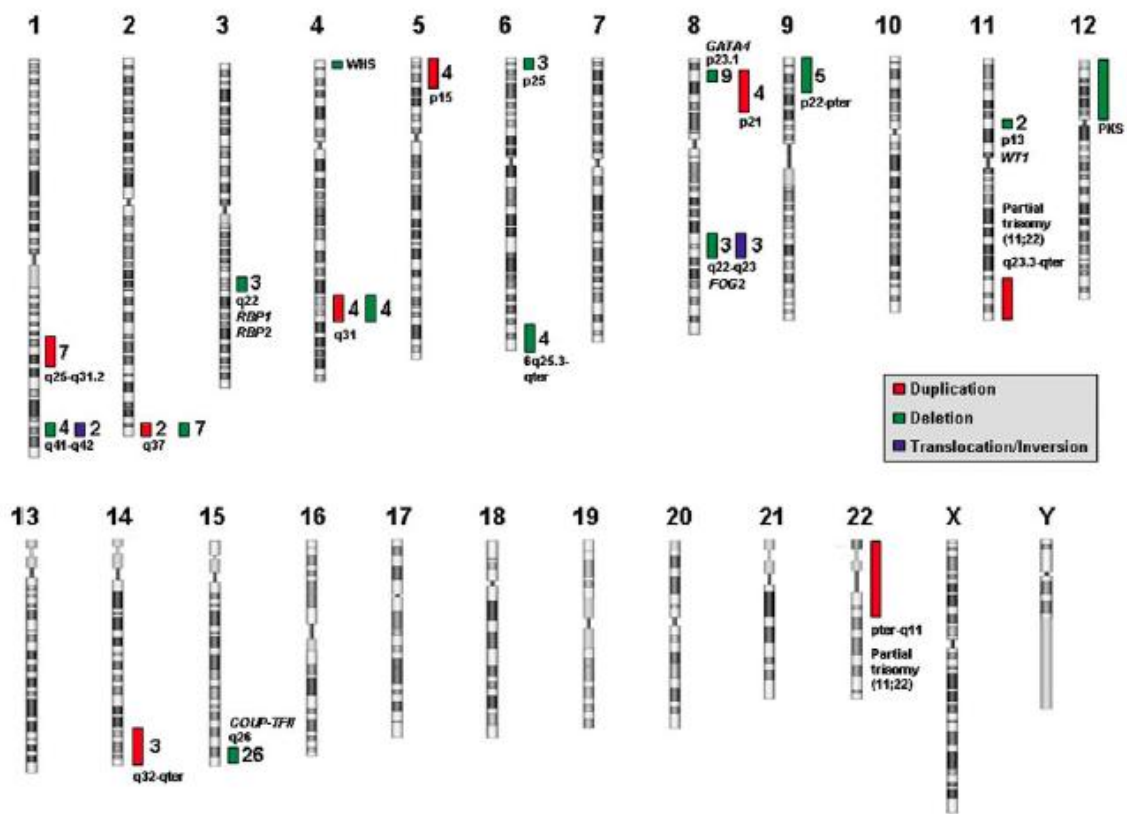


Figura 3. Regions cromosòmiques i gens candidats per l'HDC. Aquelles anomalies recurrents estan representades per les barres de color i el nombre de pacients en què s'ha descrit una duplicació (vermell), una deleció (verd) o una translocació/inversió (blau). PKS: Sd. Pallister-Killian; WHS: Sd. Wolf-Hirschorn.²⁶

2.1.3. EMBRIOLOGIA

2.1.3.1. EMBRIOLOGIA DEL DIAFRAGMA

Clàssicament s'han descrit 4 components embriològics diferents al diafragma:^{6, 30}

1. Porcions esternal i costal del diafragma. Es formen a partir del *septum transversum*. Alguns mioblasts migren des d'aquí als plects pleuroperitoneals (PPF: *pleuroperitoneal folds*) arrossegant els axons dels nervis frènics. El centre frènic tendinós es forma per la diferenciació de mioblasts d'aquesta zona en fibres tendinoses.

2. Porcions posterolaterals derivades de les membranes pleuroperitoneals i del mesènquima somatopleural (darrere les glàndules suprarenals, crestes nefrogèniques i gònades)
3. Mesoderm paraaxial de la paret que es correspon a la musculatura intercostal dels nivells T7-T12.
4. Pilars diafragmàtics procedents del mesènquima de l'intestí anterior (esòfag) i periaòrtic en el nivell L1-L3.

Hi ha un cinquè component que s'ha implicat en el desenvolupament diafragmàtic, i també en la patogènia de l'HDC com a precursor mesenquimàtic anomenat placa mesenquimàtica posthepàtica (PMP) que a través dels PPF arriba a fusionar-se amb el mesènquima costal.³¹

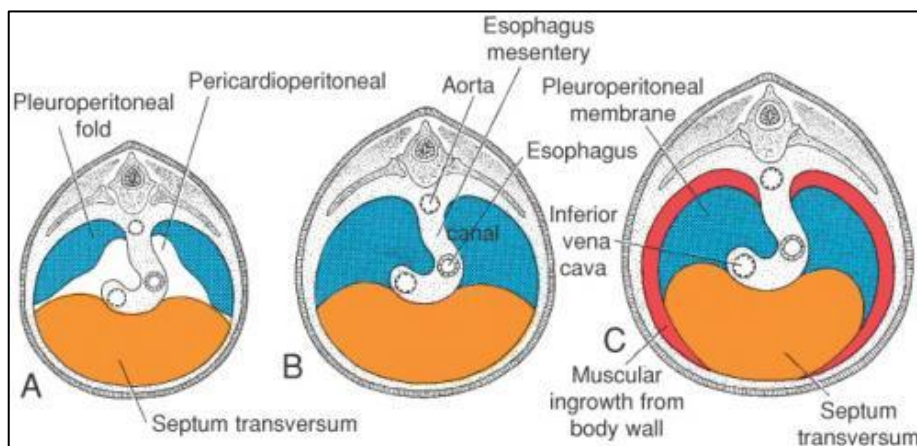


Figura 4. Components embriològics clàssics del diafragma. (www.surgicalnotes.co.uk/node/224)

Als trígons esternocostals i lumbocostals no hi ha múscul i es corresponen amb les zones on es localitzen les hèrnies diafragmàtiques.

Les fases del desenvolupament diafragmàtic són les següents:³⁰

1. Primordi diafragmàtic: 3a-4a setmanes. El diafragma és un teixit mesenquimàtic envoltat per pericardi amunt i peritoneu avall. A la part dorsal presenta els canals pleuroperitoneals que comuniquen aquestes dues cavitats. A la part anterior, el *septum transversum* comença a expandir-se enrere des de la zona anterior i lateral de

la paret del cos on està fixat, cap als canals pleuroperitoneals i el mesènquima de l'intestí anterior.

2. 4a-8a setmanes. Tancament dels canals pleuroperitoneals. Es forma la cavitat pleural. Invasió de les membranes pleuroperitoneals a partir dels plec pleuroperitoneals per mioblasts dels somites cervicals (derivats del mesoderm paraaxial) seguint els nervis frènics. Els nervis intercostals innerven la part derivada de la paret. Els mioblasts arriben més tard a la regió posterolateral que va descriure Bochdalek.

La hipòtesi de que la musculatura diafragmàtica prové del mesenterí esofàgic o de la paret toràcica actualment està descartada i s'accepta que la part muscular prové de poblacions de precursors que migren des dels somites cervicals fins al diafragma.^{21, 32}

2.1.3.2. EMBRIOLOGIA DEL PULMÓ

Totes les estructures broncopulmonars tenen un origen mesodèrmic llevat de l'epiteli respiratori que és d'origen endodèrmic. El procés embriològic del desenvolupament pulmonar es divideix clàssicament en 5 etapes que no són estanques, sinó que es solapen en el temps.^{18,30} S'han identificat diferents factors de creixement que tenen una implicació rellevant en cadascuna d'aquestes etapes.⁶ Aquestes fases es resumeixen a la Taula 2, i l'arborització broncoalveolar respecte a aquestes fases es representa esquemàticament a la Figura 5.

1. Fase embrionària (4a-8a setmanes)

L'arbre respiratori comença a formar-se la 4a setmana a partir del primordi respiratori que és una evaginació de l'intestí anterior (endoderma). Aquest primordi es dilata formant la gemma pulmonar que, ja en aquesta 4a setmana, es divideix i incorpora parènquima circumdant formant dos esbossos pulmonars. Aquests s'introdueixen pels canals pericardioperitoneals (futurs espais pleurals). El bronqui principal es divideix en dos al costat esquerre i tres al dret donant lloc als bronquis lobars. S'ha pogut reconèixer el paper que juguen en aquesta fase diferents factors de creixement (Shh: *Sonic hedgehog*, FGF: Factor de creixement de fibroblasts), de transcripció (HNF-3 β : Factor 3 β nuclear

d'hepatòcits) i gens específics (Hox, Gli). El FGF-10 sembla tenir la funció més important com a encarregat d'iniciar el desenvolupament del pulmó.

2. Fase pseudoglandular (6a-16a setmanes)

La 6ena setmana continua l'arborització bronquial segmentària i es formen els bronquíols terminals. Comença igualment la formació del sistema vascular derivat del 6è arc aòrtic (artèries pulmonars). S'ha implicat en aquesta etapa el TGF- β (factor de creixement transformador β). També s'ha detectat un pic d'expressió del Shh al final d'aquesta fase.³³

3. Fase canalicular (16a-24a setmanes)

Es completa la ramificació terminal (en acabar aquesta etapa els ordres de ramificació són 17). Els bronquíols terminals es divideixen en bronquíols respiratoris i conductes alveolars i apareix algun sàcul terminal. L'epiteli distal es transforma en cuboïdal. S'inicia també la diferenciació pulmonar. El factor més rellevant d'aquesta fase és el VEGF (factor de creixement vascular endotelial) que, entre d'altres efectes, promou l'alliberament per l'endoteli de l'enzim que participa en les síntesis d'òxid nítric (NO).

4. Fase sacular (24a-36a setmanes/naixement)

Es produeix una proliferació important de sàculs terminals i vasos limfàtics. L'epiteli cuboïdal s'aprima i apareixen les cèl·lules alveolars o pneumòcits tipus II (que sintetitzen i secreten surfactant) i a partir d'ells els de tipus I (pneumòcits responsables de l'intercanvi gasós). El surfactant es comença a produir la setmana 20 i va augmentant en endavant. Els capil·lars pulmonars proliferen fins als sàculs i s'aprima el teixit connectiu perquè contactin amb l'epiteli. El nombre de receptors a glucocorticoides augmenta en aquest període. Els principals factors involucrats són els que participen en l'apoptosi, mitjançant la qual es produeix l'aprimament del teixit connectiu. Entre ells es troba novament el TGF- β (implicat en la síntesi de proteïnes de la matriu extracel·lular i en l'angiogènesi); el IGF-1 (factor de creixement similar a la insulina-1, que regula el creixement i l'activació de les proteïnes del surfactant) i el EGF (factor de creixement epidèrmic, que augmenta la distensibilitat, l'alveolització, la diferenciació del pneumòcits i la síntesi de proteïnes pulmonars SP-A).

5. Fase alveolar (29a setmanes-8 anys)

És l'única etapa que en condicions normals es completa en la vida postnatal. Aquesta alveolització té un ritme notable entre les 29 setmanes de gestació i 3 anys d'edat, si bé continua a un ritme més lent fins als 8 anys, quan es considera conclosa aquesta etapa.³⁴ Continua la ramificació i després del naixement completa 7 ordres més. L'aprimament tant de l'epiteli com del teixit connectiu subjacent es fa més marcat, de forma que la superfície de contacte entre els alvèols i els capil·lars és major. Com hem dit, encara es continuen formant sàculs, i en aquests comencen a formar-se alvèols immadurs (sense envans). Posteriorment maduren formant envans entre els alvèols que es van aprimant progressivament per permetre l'intercanvi gasós. Un 95% dels alvèols madurs (uns 300 milions als 8 anys) es formen després del naixement. L'augment de mida pulmonar postnatal és deu principalment a un increment del nombre de bronquíols respiratoris i alvèols. Els següents factors de creixement hi tenen implicació: Factor A derivat de plaquetes (PDGF-A); Receptor de l'àcid retinoic (RAR); Factor de transcripció tiroïdal (TTF-1: involucrat en la diferenciació a pneumòcit tipus II i en la producció de les proteïnes del surfactant: SP-B i SP-C); i el FGF que també estimula el creixement dels pneumòcits II.^{35, 36}

Taula 2. Resum de les fases de desenvolupament pulmonar

Fase	EG	Principals processos	Factors
<i>Embrionària</i>	4-8	Organogènesi; Arborització de tràquea i bronquis principals i lobars	Shh, FGF-10, HNF-3β
<i>Pseudoglandular</i>	6-16	Arborització fins bronquíols terminals; vascularització preacinar; diferenciació epiteli respiratori	Shh, TGF-β
<i>Canalicular</i>	16-24	Arborització fins acini; vasculogènesi acini, aprimament epiteli, diferenciació pneumòcits I i II, síntesi surfactant	VEGF
<i>Sacular</i>	24-36	Saculació terminal, disminució espai interstici, doble xarxa vascular capil·lar	TGF-β, IGF-1, EGF
<i>Alveolar</i>	29-8anys	Saculació, alveolització per septació, fusió capil·lars	PDGF-A, TTF-1, FGF

EG: Edat gestacional (setmanes)

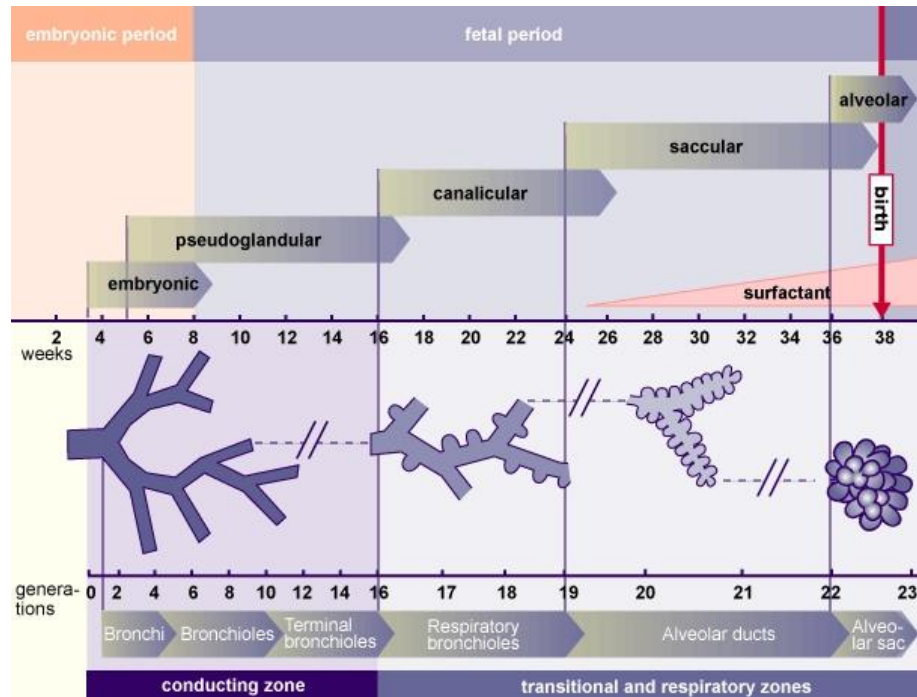


Figura 5. Arborització bronquial i fases del desenvolupament pulmonar.

(<http://www.embryology.ch/anglais/rrespiratory/phasen07.html>)

Pel que fa a l'arbre vascular pulmonar, es desenvolupa de forma simultània i paral·lela a l'arbre broncoalveolar. Aquest procés s'inicia a la 8a setmana de gestació. El *truncus arteriosus* dona origen al tronc de l'artèria pulmonar i a l'aorta separant-se pel *septum* aortopulmonar. Les branques pulmonars dreta i esquerra es formaran a partir de les artèries del 6è arc, i els fenòmens de vasculogènesi i angiogènesi acabaran de completar l'arborització vascular pulmonar. Entre els factors de creixement implicats en aquests processos, s'han identificat el factor de creixement vascular endotelial (VEGF), el factor de creixement derivat de plaquetes-A (PDGF-A) i el factor de creixement de fibroblasts (FGF). La formació mateixa d'aquest arbre vascular, permetent l'arribada de sang a tot l'arbre respiratori, és també imprescindible per a completar el desenvolupament i maduració broncopulmonar.

A més dels mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament pulmonar i de l'adequada perfusió pulmonar, també hi ha factors mecànics rellevants. Aquests inclouen:

- Moviments respiratoris. Ja es poden observar la 10a setmana però són especialment importants en les fases sacular i alveolar. Aquests fan circular el líquid amniòtic entrant i sortint dels pulmons, cosa que sembla que els ajudaria en el procés de

maduració. La hiperglucèmia, la hipercàpnia i l'acidosi poden induir un augment d'aquests moviments.

- Gradient de pressió líquid pulmonar-líquid amniòtic. En condicions normals hi ha un gradient de pressió entre el líquid de l'espai amniòtic (10-14mmHg) i el líquid intratraqueal (4-6mmHg).
- Espai intratoràctic. El pulmó en desenvolupament ha de tenir espai per a poder distendre's i contraure's.

2.1.4. ETIOPATOGENIA DE L'HDC

Es coneix relativament en detall el desenvolupament embriològic del diafragma a partir de seccions histològiques d'embrions, com s'ha explicat. El que es desconeix és el procés pel qual s'estroneja aquest desenvolupament i es produeix l'HDC. Diferents estudis histopatològics en humans i models animals han proposat hipòtesis per explicar-ho.

L'HDC es produeix al voltant de les setmanes 9-10 per una falta de fusió de les membranes pleuroperitoneals, el *septum transversum* i el mesènquima dorsal de l'intestí anterior. Es creu que la predominança esquerra de l'HDC és deguda a que aquesta fusió és més tardana en condicions normals en aquest costat.

Tot i que clàssicament s'havia cregut que l'HDC era deguda a una falta de tancament dels canals pleuroperitoneals, i s'hi havien implicat diferents estructures com el nervi frènic, els miotubs, i el propi pulmó hipoplàstic, aquestes teories s'han descartat en base a les troballes en el model animal de rata amb nitrofèn.^{35, 37, 38}

Actualment es postula que l'HDC és fonamentalment deguda a una alteració dels plec pleuroperitoneals (PPF), ja siguin absents o malformats. Diferents estudis experimentals en models animals, tant nutricionals com teratogènics o genètics, abonen aquesta teoria.^{38, 39}

També s'ha postulat que l'HDC no es deu a un defecte de la miogènesi en els plec pleuroperitoneals, sinó del seu substrat mesenquimàtic.³² Usant ratolins homozigots amb la mutació *c-met* que no formen el múscul perifèric per absència de migració dels precursors miogènics, es demostra que el substrat amuscular diafragmàtic es forma igualment, però que en administrar nitrofèn a les gestants, apareixen defectes en la part amuscular.

Coincidint en aquest origen mesenquimàtic, altres estudis però radicaren l'alteració en el desenvolupament de un altre precursor del diafragma, l'anomenada placa mesenquimàtica

posthepàtica (PMP) descrita per Iritani el 1984.³¹ En concret, Mayer i cols,⁴⁰ utilitzant el mateix model d'HDC en rata amb nitrofèn usat per Iritani en la seva descripció, li atribueix l'etiopatogènia de l'HDC.

L'etiopatogènia exacta de l'HDC continua en el terreny de les hipòtesis, i cal més recerca que ens permeti comprendre els mecanismes normals i anormals del desenvolupament diafragmàtic. Una possible limitació és l'ús sistemàtic del model de nitrofèn com a base dels estudis patogènics, quan hi ha importants dubtes sobre el seu paral·lelisme amb l'HDC en humans: no s'ha demostrat cap relació entre teratògens i HDC en humans, el fetge s'hernia de forma habitual en el model de nitrofèn mentre que rarament ho fa en humans, el nitrofèn produeix un espectre malformatiu que no sol trobar-se en humans, etc.

A la recerca de la causa última de l'HDC, s'ha aprofundit en els estudis genètics i moleculars tant en animals com en humans i s'han identificat diferents factors de transcripció i proteïnes relacionades amb el desenvolupament diafragmàtic (Pax3, Lbx1, Fog2, Gab1, COUP-TFII, GATA4, FRM-factors reguladors miogènics, etc)⁴¹ Aquestes múltiples molècules postulades, tant en humans com en murins, es resumeixen a la següent taula.

Taula 3. Factors implicats en HDC humana o murina⁴²

Transcription factors

WT1
FOG2
GATA4
COUP-TFII
Capsulin + MyoR
MyoD on an *mdx* background
RAR- α + RAR- β

Molecules involved in cell migration, mesodermal patterning, or ECM biosynthesis

HGF, its receptor c-Met, and the docking protein Grab1
Slit3 and its receptor Robo1
Ephrin-B1
Glypican-3
Delta-like 3, Lunatic Fringe, and others factors in the Notch signaling pathway
Elastin
Type III collagen and other collagen types
Lysyl oxidase
ATP7A
Fibulin-4
Fibulin-5

Pel que fa al desenvolupament pulmonar s'hi han relacionat les proteïnes Shh (*Sonic hedgehog*) i Gli2, Gli3, que estan implicades en l'organogènesi, particularment de l'esòfag i de la ramificació pulmonar. S'ha observat una disminució de l'expressió de Shh en els pulmons hipoplàstics tant de rates en el model de nitrofèn com de pacients amb HDC.³³

Després d'haver observat la implicació de l'àcid retinoic en la patogènia de l'hèrnia diafragmàtica en fetus d'animals amb dèficit de Vitamina A, s'han publicat dades que reforcen aquesta hipòtesi en humans. Des del punt de vista analític, s'han observat disminucions dels nivells plasmàtics de retinol en un estudi en 11 nounats amb HDC respecte a controls.⁴³ Recentment en un estudi de casos-contròls en 22 pacients amb HDC i les seves mares, s'ha trobat associació entre uns nivells plasmàtics baixos de retinol i de la proteïna d'unió al retinol (RBP: *retinol binding-protein*) del nounat i l'HDC; no s'ha observat, però, associació amb els nivells materns.⁴⁴ També assenyala cap a aquesta patogènia el fet d'haver observat en casos d'HDC delecions del braç llarg del cromosoma 15, que conté el gen codificant de la RBP. Aquesta mutació, però, no s'ha observat en casos de HDC aïllada.⁴⁵ Per això, actualment, es creu que la base etiopatogènica de l'HDC es troba en múltiples mutacions coincidents més que pas en una de sola.⁴⁶

Tot i que s'han identificat tot aquest seguit de gens i proteïnes implicades en el desenvolupament diafragmàtic i pulmonar, no estan ben establertes quines són les causes de les alteracions en la seva expressió. Els successius estudis experimentals van dibuixant les vies per les quals aquesta expressió alterada arriba a causar l'HDC, amb la via de l'àcid retinoic a la base de l'etiopatogènia (Fig. 6).

La HP associada a la HDC es coneix des de mitjans del segle passat.⁷ Aviat es va proposar com a agent causal de l'elevada mortalitat que presentaven els pacients amb HDC, situant el seu inici durant el desenvolupament prenatal del pulmó.⁸ Després es van estudiar les alteracions de la pressió d'oxigen alveoloarterial i de la morfologia pulmonar en la hipoplàsia de l'HDC i es va evidenciar una disminució del nombre de ramificacions bronquials i vasculars i un engruiximent arteriolar per hiperplàsia de la capa muscular.^{50, 51}

A la patogènia de la hipoplàsia pulmonar, depenent de la causa, s'hi poden trobar alterats alguns o tots els factors mecànics que hem exposat a l'apartat anterior d'embriologia pulmonar. En el cas de l'HDC, s'afecten tots: el contingut herniat al tòrax disminueix l'espai intratoràctic; disminueix el gradient de pressió líquid pulmonar-líquid amniòtic per augment de pressió intratoràctica; i els moviments respiratoris estan alterats pel defecte diafragmàtic. Tots aquests factors físics, podrien tenir una traducció molecular que acabaria afectant també el desenvolupament. Els factors de creixement implicats i els mecanismes moleculars subjacents s'han intentat identificar en múltiples estudis experimentals. Aquests són desenvolupats en el següent punt i més endavant en l'apartat de models experimentals.

L'oligohidramni *per se* també causa hipoplàsia pulmonar per alteració dels citats factors mecànics, però el seu efecte dependrà del moment en que s'instauri. Si ho fa després de les 16 setmanes, afectarà sobretot els acini i la maduració pulmonar però no l'arborització principal. Quan ho fa precoçment, els pulmons seran més petits, menys madurs i produiran menys surfactant, com s'ha demostrat experimentalment.⁵²

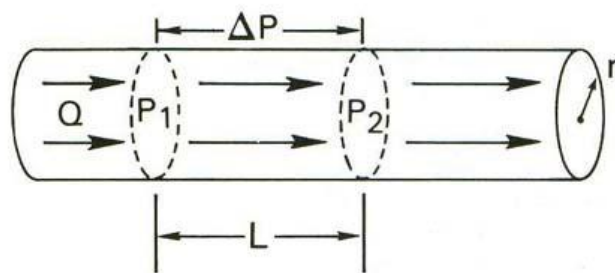
S'ha demostrat que la HP dels pacients amb HDC afecta també al pulmó contralateral, tant l'arbre bronquioloalveolar com la vascularització pulmonar.⁵¹ Tot i que tampoc es coneix la patogènia d'aquesta HP contralateral, els factors mecànics no semblen tant rellevants com en el costat ipsilateral, i s'apunta més a un component d'HP primària.⁵³ Etiopatogènicament, aquesta hipòtesi es veu reforçada per la troballa de gens reguladors comuns del desenvolupament diafragmàtic i pulmonar i per la reproducció d'aquest desenvolupament alterat simultani en models animals teratogènics.^{41,53}

Un segon resultat del desenvolupament broncoalveolar i vascular alterat és la hipertensió pulmonar (HTP), responsable principal junt a la pròpia HP de la morbimortalitat d'aquests pacients.^{53, 54}

2.1.5.2. HIPERTENSIÓ PULMONAR (HTP)

La circulació pulmonar és un sistema d'alt flux, baixa resistència i baixa pressió, que transporta la sang des del cor a la microcirculació per a l'intercanvi gasós de l'O₂ i el CO₂. Prenatalment, aquesta circulació és un sistema d'alta resistència que només acull el 10% del cabal cardíac. A mesura que s'aproxima el final de la gestació, es produeix una remodelació vascular per tal de preparar-se per acollir el 100% del cabal cardíac, i ho fa reduint el gruix vascular, convertint-se en un sistema de baixa pressió.⁵⁴ La pressió arterial pulmonar (PAP) depèn del cabal cardíac i de les resistències vasculars pulmonars (RVP), i no sol superar els 20mmHg. En els pacients amb HDC, es produeix un augment de les RVP i per tant de la PAP. En condicions normals, el diàmetre de les artèries pulmonars en aproximar-se al terme de la gestació s'aprima, i ho fa a expenses d'una reducció de gruix muscular. Tot i que no es coneix la base molecular d'aquest fenomen, el que s'ha observat és que els pacients amb HDC no experimenten aquesta reducció de gruix arterial, i presenten un major gruix de les capes muscular i adventícia i, per tant, del gruix total. Aquestes troballes també s'han observat en models experimentals.⁹

Segons la Llei de Poiseuille, que relaciona el cabal a través de un conducte amb el radi i la longitud del mateix, la resistència al flux és inversament proporcional al radi elevat a la quarta potència. Per tant, una reducció a la meitat del calibre d'un vas disminueix el cabal o eleva la resistència vascular 16 vegades.



$$Q = \frac{\Delta P \ r^4 \ \pi}{\eta L \ 8}$$

Figura 7. Llei de Poiseuille. Q: Cabal; P1/P2: Pressió en dos punts del vas; L: Longitud entre aquests punts; ΔP : Diferència de pressions P2-P1; η: Viscositat (Esquema de <http://cai.md.chula.ac.th/lesson/lesson4711/html/pic1.html>)

La vascularització pulmonar dels pacients amb HDC presenta alteracions tant quantitatives com qualitatives. El nombre d'artèries per unitat de volum està disminuït,⁵¹ tenen la capa muscular i adventícia hipertrofiades i la muscularització s'estén fins a arterioles més distals.⁵⁵ La remodelació pre i postnatal tendeix a disminuir aquesta muscularització alhora que les artèries creixen, fins i tot en pacients amb HDC.⁵⁶ Mentre aquesta remodelació no ocorre, les resistències pulmonars estan elevades, cosa que es tradueix en HTP.

Les arterioles pulmonars (pel fet de constituir la gran majoria del llit vascular) són les principals responsables de les resistències vasculars pulmonars. En el pacient amb HDC trobem un engruiximent de la paret arteriolar que causa un augment d'aquestes resistències pulmonars i, a més, una expressió alterada de factors de regulació del to vascular. La conseqüència resultant d'aquests dos fets és la HTP.¹⁰

Clínicament, en els pacients amb HDC no es produeix la caiguda fisiològica de la pressió pulmonar després de néixer, sinó que tenen una persistència de la circulació fetal. Hemodinàmicament es tradueix en unes pressions pulmonars altes, un flux pulmonar baix i un *shunt* dreta-esquerra pel *foramen* oval persistent (FOP) o per la persistència del *ductus* arteriós (PDA). Com passa sang no oxigenada a territori sistèmic, hi ha hipoxèmia que estimula la vasoconstricció pulmonar i tanca el cercle viciós. L'acidosi, la hipotèrmia i l'estrès també contribueixen a aquesta vasoconstricció pulmonar.⁵⁷

El mecanisme pel qual s'arriba a la HTP respon a la confluència de quatre factors predisposants interrelacionats:

- Labilitat vascular pulmonar del nounat

En tot nounat, la vascularització pulmonar és molt sensible als canvis metabòlics com la hipòxia, la hipo/hipercàpnia i l'acidosi que desencadenen canvis del to vascular molt acusats.

- Hipoplàsia pulmonar

Com hem vist la HP característica de l'HDC provoca hipoxèmia i, per tant, vasoconstricció pulmonar secundària.

- Resistències vasculars pulmonars augmentades

Anatòmicament per l'engruiximent de la muscular i l'adventícia de l'arbre arteriolar pulmonar, i funcionalment en resposta a la HP i a la labilitat pròpia del nounat.

- Persistència de la circulació fetal

Amb *shunt* dreta-esquerra per PDA i FOP secundària a la HTP.

D'aquesta manera s'entra en el cercle viciós de la HTP, que es fa persistent (HTPP). Sovint no hi ha sortida possible i el desenllaç és fatal (Fig. 8).

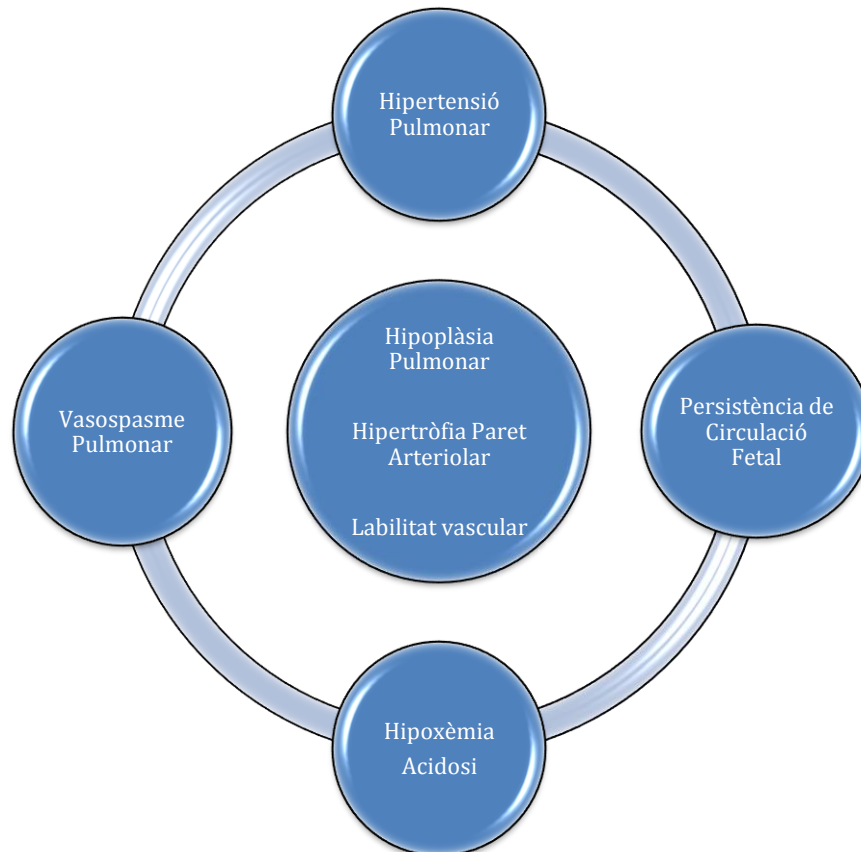


Figura 8. Fisiopatologia de la HTP associada a la HDC

Bases moleculars de l'HTP

Les anomalies estructurals de la vascularització pulmonar en l'HDC inclouen un menor nombre d'arterioles per unitat de volum, amb un augment de la seva muscularització (engruiximent de la muscular i la adventícia). L'endoteli vascular també juga un paper important en la regulació del to vascular sintetitzant substàncies vasoactives, fonamentalment el NO. Es tracta d'un potent vasodilatador produït per la conversió de L-arginina en L-citrulina que realitza la NOS (sintetasa d'òxid nítric), encarregat de disminuir

les resistències pulmonars, especialment en situacions d'hipòxia. La síntesi endotelial d'aquest vasodilatador s'ha trobat disminuïda en els pacients amb HDC.⁵⁸

Des del punt de vista molecular, s'han identificat diferents factors de creixement associats al desenvolupament vascular pulmonar. Entre ells els més importants semblen ser el VEGF (factor de creixement vascular endotelial) i els seus receptors (Flt-1 i Flk-1: *Fetal liver kinase-1*), l'EMAP II (polipèptid activador dels monòcits endotelials), el TGF- β (factor de creixement transformador- β), el IGF-I i II (factor de creixement semblant a la insulina-I i II) i l'ET-1 (endotelina-1) amb els seus receptors (ETA i ETB). També s'hi han implicat altres factors com el HIF- α (*hipoxia-inducible factor- α*), pVHL (proteïna von Hippel-Lindau), Wnt, Fox i l'Eph.¹⁰

L'expressió d'alguns d'aquests factors de creixement ha estat estudiada en pulmons hipoplàstics de pacients amb HDC. Alguns estudis han trobat sobreexpressió de VEGF a l'endoteli i la muscular,^{58, 59} mentre que en altres no hi ha hagut diferències en l'expressió de VEGF ni de Flk-1, iNOS (*induced nitric oxide synthase*) i eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) respecte als controls i suggereixen que aquesta diferència de resultats es podria deure a la variabilitat en la sensibilitat de la tècnica immunohistoquímica utilitzada.⁶⁰ Aquest darrer estudi si que ha trobat diferències en l'expressió de la pVHL i el HIF- α , estant la primera sobreexpressada i la segona infraexpressada en els pacients amb HDC.⁶⁰

S'ha trobat també una disminució de l'expressió de la iNOS en les artèries de petit calibre de pacients amb HP per HDC sotmesos a ECMO.⁵⁸ Aquest subgrup de pacients tindrien menor capacitat de sintetitzar NO i per tant menor capacitat de vasodilatació pulmonar en resposta a la hipòxia.

2.1.6. HISTOPATOLOGIA

2.1.6.1. HISTOPATOLOGIA DE LA HP

Els nounats amb HDC tenen característicament pulmons més petits del normal i amb una alteració de l'arquitectura del pulmó. S'ha observat en estudis histopatològics que aquests pulmons presenten una disminució del nombre tant de divisions bronquials com de ramificacions vasculars. Per tant, l'HDC associa un retràs en el desenvolupament del pulmó i alteracions de l'estructura vascular pulmonar que són les responsables de l'elevada

mortalitat; a través de la insuficiència respiratòria per la hipoplàsia pulmonar i la hipertensió pulmonar que es manifesten en néixer.

Les troballes característiques són la reducció del nombre de bronquíols i d'alvèols, principalment al pulmó ipsilateral però també al contralateral. Com s'ha comentat en l'apartat d'embriologia pulmonar (2.1.3.2), com que la ramificació bronquial es produeix abans de les 16 setmanes, el nombre de bronquis no podrà augmentar posteriorment.⁶¹ El nombre d'alvèols també està disminuït però atès que la fase alveolar continua postnatalment, aquests si que podran augmentar. Això s'ha demostrat en autòpsies de pacients amb HDC morts al llarg del primer mes de vida. A més de poder augmentar en nombre, els alvèols ho poden fer en mida i acabar omplint l'hemitòrax afectat.⁶²

El nombre i la diferenciació dels pneumòcits tipus II també està alterat en els pacients amb HDC. Això condueix a una síntesi inadequada de surfactant pulmonar.⁵⁶

El paràmetre més utilitzat *post mortem* per a l'avaluació del desenvolupament pulmonar és la raó pes pulmonar/pes corporal. Té com a principal problema que l'edema pot alterar-lo, per això es sol combinar amb el recompte alveolar radial (RAC) que comptabilitza els alvèols corresponents a un bronquíol respiratori (veure l'apartat 4.2.2.4.3.2). Quant més desenvolupat està el pulmó, major és el RAC, atès que la línia que tracem entre un bronquíol respiratori i la pleura més propera per calcular-lo travessarà més envans.

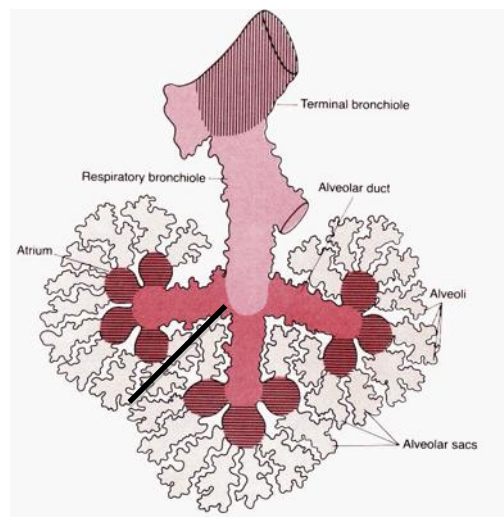


Figura 9. Bronquíol respiratori amb la representació de la mesura del RAC (línia negra). (Modificat de <http://www.cram.com/flashcards/physiology-respiratory-1660522>)

Des del punt de vista morfològic, es parla d'hipoplàsia pulmonar quan el valor del RAC és inferior al 75% de la normalitat i la raó pes pulmó/pes corporal és inferior a 2/3 del valor normal.⁶³

La HP es correlaciona amb la clínica neonatal i el pronòstic de forma qualitativa, es a dir, a més HP, més mortalitat. Quantitativament, aquesta relació és més difícil d'establir, tot i que alguns autors ho han intentat. Per exemple, Thibeault et al⁶⁴ van determinar en un estudi en pacients d'HDC sotmesos a ECMO, que cal un volum pulmonar mínim >45% del que correspon per edat per tal de sobreviure.

2.1.6.2. HISTOPATOLOGIA DE LA HTP

En els pulmons de l'HDC s'observa una reducció de la vascularització i una hiperplàsia muscular arteriolar (veure l'apartat d'Hipertensió Pulmonar 2.1.5.2). La muscularització arteriolar s'estén també en excés distalment arribant fins a l'*acinus* respiratori.⁵⁴

Estudis morfomètrics vasculars pulmonars en necròpsies de pacients amb HDC han demostrat que el gruix de la capa mitjana i adventícia de les artèries pulmonars s'incrementa prenatalment, just al contrari que en el fetus sa, mentre que el gruix de les venes és normal en el nouat i només s'altera posteriorment, presumiblement per la HTP persistent.⁶⁵

Aquesta disminució de la llum i augment de gruix és proporcional al grau d'hipoplàsia pulmonar.⁵¹ Això respon a dues possibles hipòtesis: o bé es tracta d'una troballa més de la HP; o bé la reducció de la vascularització i l'engruiximent vascular impedeix el bon desenvolupament broncoalveolar. Aquesta segona hipòtesi ha estat abonada pel fet de trobar alteracions en el calibre de les artèries pulmonars ecogràficament abans de que es pugui apreciar hipoplàsia del pulmó.⁶⁶

2.1.7. DIAGNÒSTIC PRENATAL

2.1.7.1. DIAGNÒSTIC PRENATAL D'HDC

En el nostre àmbit europeu, el diagnòstic de l'HDC es sol fer en un 90% dels casos abans del naixement per mitjà de les ecografies d'*screening* prenatal. Generalment es reconeix la malformació a l'ecografia morfològica del segon trimestre.

El diafragma s'avalua de forma indirecta en un tall transversal sobre les quatre cambres cardíaques alhora que s'inspeccionen els pulmons. Les troballes ecogràfiques més

característiques de l'HDC són l'asimetria de mida i ecogenicitat entre ambdós hemitòrax (pèrdua d'ecogenicitat en un costat substituïda per un contingut heterogeni, amb desviació mediastínica), la presència d'alguna víscera sòlida al tòrax i l'absència de cambra gàstrica a l'abdomen. El budell es troba herniat en el 90% dels casos, l'estómac en el 60-70%, i el fetge en el 15-20%.¹⁸

En el costat dret, el diagnòstic resulta més difícil per l'ecogenicitat semblant de fetge i pulmó. En aquest costat el fetge s'hi troba herniat per definició en els casos que debuten clínicament durant el període neonatal.

Es troba un augment del volum de líquid amniòtic (75% dels casos), que apareix generalment al tercer trimestre i que no sol arribar al grau de polihidramni, sinó que es manté en el límit alt de la normalitat. S'ha relacionat amb la situació de la unió esofagogàstrica que impediria la deglució del líquid amniòtic i també amb la dificultat de buidament gàstric. Si apareix, el polihidramni és conseqüència de la presència al tòrax d'un estómac molt distès (no aconsegueix buidar-se), que també causa un desplaçament mediastínic marcat; és un signe de mal pronòstic que informa de l'existència d'un greu problema d'espai intratoràctic.^{18, 29}

Dins del protocol d'estudi quan es diagnostica una HDC, igual que es fa amb qualsevol malformació greu, cal avaluar la presència d'altres malformacions associades, especialment les cardiovasculars i del sistema nerviós central (mitjançant ecografia) i les cromosòmiques (mitjançant amniocentesi/biòpsia corial i cariotip).¹⁸

La conseqüència lògica del diagnòstic prenatal és que els pares poden prendre les decisions més adients de manera informada. El fet d'afrontar un diagnòstic com el de l'HDC és molt dur i difícil per als pares, per això cal que l'avaluació fetal de l'HDC i de les malformacions associades sigui el més acurada possible i que la informació sigui donada de la forma més objectiva per professionals experts en el maneig d'aquests pacients. D'aquesta manera, la difícil decisió de seguir amb la gestació o finalitzar-la, o realitzar una teràpia fetal, pot recolzar-se de forma més sòlida. Tot i així, en un estudi recent s'observen variacions notables en el suport del metge que informa a la decisió presa pels pares de finalitzar la gestació per causa d'una HDC. Segons sigui un obstetra o un especialista pediàtric en medicina fetal, el suport a la decisió inicial d'avortar és del 49 i 35% respectivament, i la decisió final dels pares d'avortar és del 28 i 17% respectivament.⁶⁷ Queda ben palesa doncs la influència de la informació que es dona i qui la dona, així com la variabilitat en les opcions recomanades pels diferents professionals.

Actualment, s'interrompen voluntàriament el 20% de les gestacions de fetus amb HDC aïllada, i el 40% si es tracta d'una HDC amb d'altres malformacions.³

2.1.7.2. DIAGNÒSTIC PRENATAL D'HP

La majoria de les tècniques prenatales per a avaluar el grau d'hipoplàsia pulmonar, es basen en mesures morfològiques del pulmó que són comparades amb controls sans d'edat gestacional equivalent. La correlació d'aquestes mesures amb les conseqüències clíniques observades postnatalment, és la base actual de la predicció pronòstica dels pacients amb HDC per tal de decidir la teràpia que cal aplicar. A continuació veurem quins són els paràmetres que s'utilitzen actualment, si bé encara s'observen discrepàncies d'aquests respecte al desenllaç clínic. Per això, es continua estudiant per a la definició de paràmetres prenatales millor correlacionats al grau d'hipoplàsia i sobretot amb el pronòstic vital, que han de millorar la selecció dels casos susceptibles de rebre tractament prenatal de l'HDC.

ECOGRAFIA

En totes les HDC es pot visualitzar el pulmó contralateral que es troba per darrera el cor en el tall axial sobre les quatre cambres cardíques. S'utilitza el pulmó contralateral per a les mesures perquè el mesurament dels límits del pulmó ipsilateral és difícil ecogràficament.

El principal paràmetre ecogràfic d'HP és la raó entre la mida del pulmó i el perímetre cefàlic o ***Lung-to-Head Ratio (LHR)***. Només ha estat validat per a HDC esquerres. És el paràmetre que inicialment utilitzà el grup europeu d'hèrnia diafragmàtica-Eurofoetus. S'obté a partir de la mesura de l'àrea pulmonar contralateral a l'hèrnia diafragmàtica (calculada a partir del producte de les dos mesures lineals de major longitud i perpendiculars o, més recentment, dibuixant manualment el contorn pulmonar), dividida per la circumferència cefàlica. Aquesta mesura es realitza entre les setmanes 22 i 28 i es repeteix en el nouat. Actualment s'utilitza només com a indicador pronòstic en pacients amb herniació del fetge al tòrax, atès que no s'han observat diferències de supervivència si es pren aïlladament el LHR en pacients sense herniació hepàtica.⁶⁸ Els LHR d'entre 0,6 i 1 s'han associat amb mortalitats fins del 100%.⁶⁸ Recentment, però, una metaanàlisi conclou que l'evidència actual no dona suport al valor pronòstic d'aquesta mesura respecte a la supervivència.⁶⁹

Amb finalitat de millorar-ne la sensibilitat pronòstica, i que no quedi esbiaixat per l'edat

gestacional, actualment es compara aquest índex, LHR observat (o) amb l'índex LHR esperat (e) que li correspondria per edat gestacional; és l'anomenat **o/e LHR (observed-to-expected LHR)**. Així s'han definit 4 grups de gravetat que es detallen més endavant (Vegeu l'apartat de Pronòstic: 2.1.10)

El LHR es correlaciona lògicament amb el volum pulmonar calculat per ecografia-3D.⁷⁰ Això indica que la **volumetria pulmonar (FLV-fetal lung volumetry)** podria ser un bon paràmetre de creixement pulmonar i tenir utilitat en el futur.⁷¹ Teòricament aquesta volumetria hauria de ser més sensible que la mesura de diàmetres pulmonars (LHR en eco en dues dimensions), però això encara no ha estat demostrat consistentment.⁷² Sembla, però, com apunta algun treball recent, que la volumetria bipulmonar tindria un major valor predictiu positiu de mortalitat que la volumetria del pulmó contralateral, que obtindria uns resultats semblants al LHR.⁷⁰ Igualment no s'ha establert si és millor o no que la volumetria per RM.⁷²

RESSONÀNCIA MAGNÈTICA

La ressonància magnètica (RM) pot quantificar un volum pulmonar i relacionar-lo amb l'esperat per l'edat gestacional, expressant-lo en percentatge, o en forma de raó relativa al volum d'un altre òrgan. Comparant aquestes estimacions amb el volum real obtingut d'autòpsies, les diferències són menors del 10%. És una tècnica que sembla prometedora. Una altra possible aplicació futura que s'està avaluant és correlacionar la intensitat del senyal amb la maduració pulmonar.¹⁸

El volum pulmonar estimat per RM es correlaciona bé amb l'àrea pulmonar contralateral determinada per ecografia independentment de l'edat gestacional, herniació hepàtica o lateralitat.⁷³

Els índexs volumètrics principals utilitzats fins ara són el volum pulmonar total (**TFLV-Total Fetal Lung Volume**) i el percentatge predit de volum pulmonar (**PPLV-Predicted Percentage of Lung Volume**).⁷⁴ De forma semblant a com s'ha fet amb el LHR, s'ha definit una nova variable de TFLV relacionant-la amb el volum pulmonar esperat per edat gestacional o per volum fetal (**FBV-Fetal Body Volume**). És l'anomenat **o/e TFLV**, que s'està avaluant com a predictor de supervivència. S'ha descrit una associació de la supervivència i un major o/e TFLV (sobretot respecte al FBV)⁷⁵ i així ho confirma una recent metaanàlisi tant pel TFLV com pel o/e TFLV.⁷⁶

La principal limitació de la RM respecte a l'ecografia és el cost i la menor disponibilitat per a fer exploracions seriades. A l'espera de que pugui aportar mesures o índexs que superin els que es poden obtenir per ecografia, aquesta última continua sent la tècnica d'elecció tant diagnòstica com pronòstica en l'estudi de l'HDC.

2.1.7.3. DIAGNÒSTIC PRENATAL D'HTP

La HTP es defineix com l'augment de pressió arterial a la circulació menor (pulmonar) que en condicions normals es situa entre 10-15mmHg. Com que l'única forma de mesurar amb precisió aquesta pressió és mitjançant un cateterisme cardíac, el diagnòstic en el nou-nat es basa en troballes clíniques i ecogràfiques indirectes.

L'oximetria ens demostra la diferència significativa de saturació pre i postductal reflectint el *shunt* dreta-esquerra que es produeix per la HTP, i l'ecografia-doppler pot avaluar la quantitat i direcció d'aquest *shunt* (dreta-esquerra, bidireccional o esquerra-dreta), que característicament és dreta-esquerra en aquests pacients, a través del FOP i la PDA. També es pot avaluar i quantificar la regurgitació tricuspídia per l'augment de pressió de l'artèria pulmonar, el desplaçament del septe interventricular i l'abombament de l'aurícula dreta, però cap d'aquests indicadors ha demostrat utilitat pronòstica.⁷⁷

Entre les determinacions estàtiques de la vascularització pulmonar, s'han utilitzat mesures prenatales del diàmetre arterial pulmonar, observant que el diàmetre de l'artèria pulmonar ipsilateral es correlaciona amb el pes pulmonar *postmortem*, i per tant és una mesura predictora d'HP. A més, un major diàmetre de l'artèria pulmonar contralateral, i del tronc pulmonar, s'han correlacionat amb un pitjor pronòstic. Per últim, una diferència gran del diàmetre entre les dues artèries pulmonars s'ha correlacionat amb una major morbiditat neonatal (majors necessitats d'O₂ i ventilació mecànica).⁶⁶

En base també a mesures de les artèries pulmonars, s'han proposat diversos índex per tal d'identificar postnatalment els pacients en risc de desenvolupar hipertensió pulmonar. S'ha utilitzat l'*índex de McGoon* (quocient entre la suma dels diàmetres de les artèries pulmonars dreta i esquerra, i el diàmetre de l'aorta), trobant una alta sensibilitat i especificitat d'aquest índex en la predicció de mortalitat.⁷⁸ També l'índex de l'artèria pulmonar (*PAI-Pulmonary Artery Index*: quocient entre la suma dels diàmetres de les artèries pulmonars dreta i esquerra, i la superfície corporal) s'ha correlacionat de forma directa amb la supervivència i

també amb la morbiditat respiratòria.⁷⁹ Amb l'objectiu d'aplicar aquests índexs prenatalment, s'ha descrit un **Índex d'Hipertensió Pulmonar Prenatal (PPHI-Prenatal Pulmonary Hypertension Index)** relacionant els diàmetres de les artèries pulmonars amb la longitud del vermis cerebel·lós mesurat per RM. Tots dos índexs han demostrat tenir una correlació negativa amb la HTP.⁸⁰

Tots aquests són índexs estàtics, però darrerament s'estan desenvolupant mesures dinàmiques per tal de correlacionar-les amb altres paràmetres ecogràfics morfomètrics amb una finalitat pronòstica. De forma anàloga, aquest és un dels objectius de la present tesi: a partir de mesures dinàmiques de la circulació pulmonar, establir la correlació amb els estudis histopatològics per tal de demostrar que són una mesura prenatal de la HP i la HTP i en el futur contribuir a implementar-les amb intenció pronòstica en els humans. Aquestes mesures es detallen en l'apartat següent.

2.1.7.3.1. Hemodinàmica pulmonar

Fins fa poc, les alteracions prenatales de la vascularització pulmonar associades a l'HDC només es podien estudiar en les necròpsies d'aquests pacients o en estudis experimentals en models animals. Actualment, però, es poden obtenir dades hemodinàmiques fetals de forma no invasiva a partir de l'ús de l'ecografia-doppler amb la intenció d'objectivar l'evolució de l'HTP.¹⁰ Per exemple, es pot estimar ecogràficament la pressió sistòlica del ventricle dret, i s'ha observat que aquesta es redueix després de l'ús d'ECMO en gairebé el 90% dels casos.⁶⁴

El doppler pulsat permet registrar ones arterials i venoses i estudiar-ne el contorn. No es pot mesurar però ni la pressió ni el volum sanguini amb la instrumentació actual. Amb l'anàlisi de l'ona obtinguda, es poden calcular diferents índexs que són considerats indicadors d'impedància arterial pulmonar.

L'**índex de pulsatilitat (PI: Pulsatility Index)** es basa en l'estudi de les oscil·lacions de l'ona de velocitat arterial. Fou descrit els anys 70 i ara se n'utilitza una versió simplificada. És el quocient entre la diferència de les velocitats sistòlica màxima i diastòlica mínima, i la velocitat mitjana en almenys un cicle cardíac (Fig. 10). S'utilitza per a l'estudi de la circulació placentària analitzant l'artèria umbilical, en l'estudi de les artèries dels òrgans trasplantats per a detectar rebuig, o en l'estudi del flux cerebral en l'artèria cerebral mitjana. En el cas de l'artèria pulmonar fetal es relaciona amb la hipoplàsia pulmonar. S'ha observat una correlació significativa del PI amb l'o/e LHR del pulmó contralateral.⁸¹

El **Pic diastòlic precoç de flux invers (PEDRF: Peak Early-Diastolic Reversed Flow)** ha demostrat correlacionar-se inversament amb l'o/e LHR en tots dos pulmons i ser un millor discriminador pronòstic que el PI en els casos de pronòstic bo i moderat en base a l'o/e LHR.⁸¹

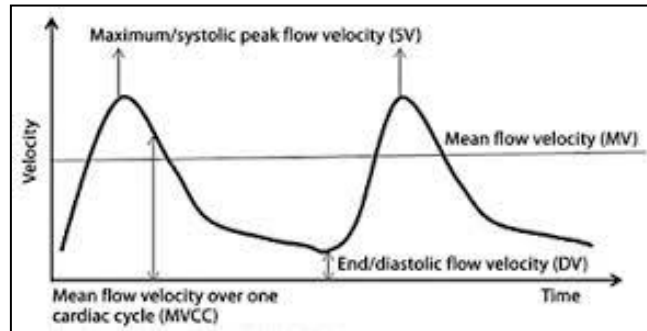


Figura 10. Traçat d'ona arterial amb doppler pulsat. *SV*: Velocitat sistòlica màxima; *DV*: Velocitat diastòlica mínima; *MV*: Velocitat mitjana; *MVCC*: Velocitat mitjana en un cicle cardíac. $PI=(SV-DV)/MVCC$ (http://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/348/3398823/3398823_dee-002-0258-g01.png)

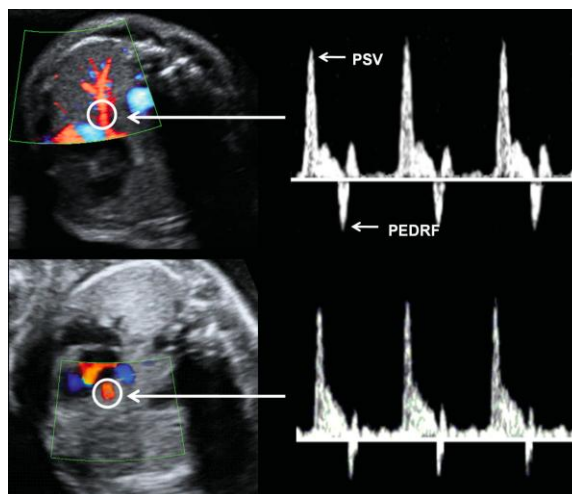


Figura 11. Doppler pulsat sobre l'artèria pulmonar contralateral (dalt) i ipsilateral (baix). *PSV*: Velocitat sistòlica màxima; *PEDRF*: Pic diastòlic precoç de flux invers.⁸¹

En estudis de la vascularització pulmonar en pacients amb oligoamni, aquestes mesures d'impedància arterial s'han correlacionat amb el grau d'hipoplàsia pulmonar. També tenen un elevat valor predictiu positiu de mortalitat quan s'han associat a l'anàlisi de criteris clínics i biomètrics (perímetre abdominal i toràcic), però no quan s'analitzen aïlladament.⁸²

Una altra variable estudiada amb intenció pronòstica ha estat la visualització d'almenys tres branques de l'artèria pulmonar contralateral. S'ha demostrat en un estudi l'associació de la manca de visualització d'aquesta bifurcació amb una major morbiditat, si bé l'estimació del volum pulmonar (amb la raó àrea pulmonar/àrea tòrax en aquest treball) continua sent millor com a predictor de mortalitat.⁸³

També s'han realitzat estudis hemodinàmics en pacients sotmesos a oclusió traqueal fetal, trobant una associació significativa de tres variables de diagnòstic prenatal (o/e LHR, PI i PEDRF) i la supervivència.⁸⁴ El major valor predictiu aïlladament el tindria l'o/e LHR, mentre que el PI i el PEDRF ajudarien a discriminar els de millor pronòstic dins els de baixa supervivència.

Com a indicador de perfusió, s'ha estudiat un altre valor hemodinàmic que és la **Fracció de volum sanguini en moviment (FMBV; fractional moving blood volume)**. Es tracta d'un indicador de la perfusió d'una àrea delimitada amb *power*-doppler, que ha estat validat comparant-ho amb la perfusió estudiada isotòpicament en un model animal d'ovella.⁸⁵ En analitzar la perfusió pulmonar amb aquest índex no s'ha demostrat associació preoperatòria amb la supervivència de pacients sotmesos a oclusió traqueal però si postoperatòria; els augments iguals o superiors al 30% d'FMBV s'associen amb un augment de supervivència. Combinant aquest valor amb l'o/e LHR es poden definir grups pronòstics.⁸⁶

L'anàlisi de l'FMBV, junt amb l'o/e LHR, PI i PEDRF en 95 casos d'HDC i 95 controls mostra que els pacients amb HDC tenen significativament valors menors de FMBV que es correlacionen positivament amb l'o/e LHR i negativament amb el PI i el PEDRF.⁸⁷

Una altra variant del *power*-doppler és l'ecografia-3D, que també s'està començant a avaluar per a l'estudi de l'hemodinàmica pulmonar en pacients amb HDC. S'ha descrit una significativa disminució dels índexs vasculars (índex de vascularització, índex de flux i índex de vascularització-flux) en els casos d'HDC respecte els controls i dins de les HDC, sent més acusada la disminució en els fetus que van morir i en els que presentaven HTP en néixer. El valor predictiu positiu de mortalitat neonatal va ser major en mesurar aquests índex als dos pulmons que quan es mesurava només el contralateral.⁸⁸

2.1.8. EVOLUCIÓ CLÍNICA POSTNATAL

La clínica de l'HDC és fonamentalment respiratòria i es presenta ja des del període neonatal precoç. Dependrà del grau d'hipoplàsia pulmonar i d'hipertensió pulmonar. Es sol presentar com a destret respiratori progressiu i sever, amb un abdomen excavat i l'hemitòrax afectat que pot anar-se hiperinsuflant amb les maniobres de reanimació, per distensió aèria de l'estómac i el budell herniats. Aquells nounats que presenten destret respiratori en les primeres dues hores després del naixement o aquells que tenen diagnòstic prenatal són considerats d'alt risc de mortalitat neonatal.

En l'avaluació diagnòstica inicial, la radiografia (RX) simple de tòrax-abdomen confirma l'HDC i orienta sobre la situació de l'estómac, quantitat de tòrax ocupat i pulmó visible, desplaçament mediastínic i herniació hepàtica. Cal, a més, descartar malformacions associades: cardíques (ecocardiografia), sistema nerviós central (ecografia transfontanel·lar o transcranial), urològiques (ecografia abdominal) i esquelètiques (RX).



Figura 12. RX neonatal d'un pacient amb HDC esquerra. S'observa ocupació de l'hemitòrax esquerre per intestí pneumatitzat i desplaçament mediastínic sense herniació hepàtica.

Si la HP i la HTP ho permeten, les mesures terapèutiques aconsegueixen establir respiratòriament i hemodinàmicament el pacient. La HTP es presenta ja inicialment i és una de les principals causes de morbimortalitat de l'HDC, fins i tot temps després del període neonatal; en tal cas parlem d'hipertensió pulmonar persistent (HTPP). En un estudi centrat específicament en aquest subgrup de pacients, la incidència d'HTPP s'ha situat en el 18% dels casos d'HDC a l'alta hospitalària, i s'ha relacionat estades més llargues, intubació

traqueal i teràpia amb òxid nítric (NO) més prolongades.⁸⁹ A l'any de vida, en un 87% dels casos els paràmetres d'HTPP s'havien normalitzat. En el mateix estudi es van identificar 2 factors amb un valor predictiu positiu del 100% per a presentar HTPP: la presència de HTP als 2 mesos i la necessitat d'oxigen als 3 mesos.⁸⁹ L'índex ecogràfic utilitzat per a diagnosticar la HTP en aquesta sèrie fou la raó entre la pressió sistòlica del ventricle dret (estimada a partir de la regurgitació a través de la vàlvula tricúspide) i la pressió sistòlica sistèmica. Valors superiors a 0,5 foren considerats diagnòstics d'HTP.

L'evolució de la HTP a llarg termini no és ben coneguda. S'ha trobat HTPP per ecografia en el 25% dels pacients seguits per HTP neonatal, entre 2 i 5 anys d'edat, tot i que tots ells estaven asimptomàtics. S'ha especulat que la presència d'àrees hipoperfoses que suposin espai mort i per tant *shunt* intrapulmonar provoqui hipoxèmia i manteniment de la HTP.⁹⁰

L'evolució de la HTP ha demostrat ser determinant de mortalitat. En una revisió del seguiment ecogràfic de la HTP, un 17% tenien HTPP (nivells sistèmics o suprasistèmics de pressió pulmonar) resultant en un 0% de supervivència, mentre que gairebé el 50% dels casos no tenien signes ecogràfics d'HTP i aquests presentaven un 100% de supervivència. Aquells que tenien una HTP en reducció, tenien una supervivència del 75%.⁹¹

Els estudis gammagràfics de la perfusió pulmonar en aquests pacients han demostrat hipoperfusió respecte a controls en ambdós pulmons (especialment a l'ipsilateral) fins i tot anys després.⁹²

Aquestes troballes lliguen la fisiopatologia de la HDC i la clínica a llarg termini. Els problemes derivats del remodelatge vascular dels pulmons dels pacients amb HDC, persisteixen al llarg del temps (almenys fins a 18 anys d'edat), segons s'ha vist en estudis amb cateterisme cardíac i gammagrafies de ventilació/perfusió fins i tot en els pacients que estan asimptomàtics i amb proves funcionals respiratòries normals.^{10, 53} Per això, fins que no estigui ben definida l'evolució natural de la HTPP, no s'aclarirà si cal tractament mèdic o seguiment acurat a llarg termini d'aquests pacients.⁴

2.1.9. TRACTAMENT

2.1.9.1. PERSPECTIVA HISTÒRICA

Els primers intents de reparació de l'HDC es van iniciar fa més d'un segle i, malgrat les millores en el diagnòstic prenatal i la teràpia neonatal, la morbimortalitat continua sent

elevada. La història del tractament de l'HDC corre paral·lela al canvi de paradigma que ha suposat passar de considerar-la una patologia únicament quirúrgica, a considerar-la fonamentalment mèdica (Fig. 13). Aquest trajecte és ple de fites rellevants que es poden agrupar en 5 períodes o eres.^{57, 93, 94}

1a era. 1579-1900: Descripció clínica

1579 Ambroise Paré: 1a descripció d'hèrnia diafragmàtica traumàtica.

1679 Lazarus Riverius: 1a descripció d'hèrnia diafragmàtica congènita.

1761 Giovanni Battista Morgagni: 1a descripció de variants d'HDC.

1847 Bodwitch: 1r recull sistemàtic de tots els casos publicats de 1610 a 1846.

1848 Vincent Aleksander Bochdalek: Descripció de la localització i hipòtesi patogènica atribuïda a una ruptura de les membranes pleuroperitoneals.

2a era. 1900-1940: Intents de reparació quirúrgica

1905 Heidenhain: 1a reparació amb èxit en un nen de 9 anys.

1929 Bettman i Hess: 1a reparació en un lactant de 3,5 mesos.

3a era. 1940-1980: Cirurgia immediata

1940 Ladd i Gross: Preconització de la cirurgia dins les primeres 48h de vida, aconseguint una supervivència del 56% en 16 casos.

1946 Gross: 1a reparació en les primeres 24h de vida. Augura que operant-los en el primer moment pot assolir supervivències del 90%.

4a era. 1980-1990: Cirurgia diferida

1981 Drumond: Demostració que augmentant el pH per sobre de 7,5 i disminuint la PaCO₂ mitjançant la hiperventilació pot revertir-se el *shunt* a través del *ductus*.

1984 Vacanti: Demostració de bons resultats amb l'estratègia d'hiperventilació i alcalinització.

S'introdueix l'ECMO com a teràpia de suport pre- o postoperatòria per a la insuficiència respiratòria.

5a era: 1990- actualitat: Hipercàpnia permissiva + cirurgia diferida

1995 Wung: Demostració de bons resultats de la ventilació amb pressió limitada i la hipercàpnia permissiva (per evitar el barotrauma d'altres estratègies ventilatòries més agressives).

En línies generals, continua sent l'estratègia utilitzada avui dia, però amb millores en quant a ventilació (ventilació oscil·latòria d'alta freqüència,...) i medicació (òxid nítrós,...).



Figura 13. Evolució del paradigma quirúrgic al mèdic (traduït de Golombeck et al⁹³)

2.1.9.2. *PERSPECTIVA ACTUAL*

Com hem vist, la filosofia del tractament al llarg del temps ha passat de considerar l'HDC simplement una urgència quirúrgica per tancar el defecte i permetre que el pulmó ipsilateral s'expandeixi, a una urgència fisiològica per a l'estabilització ventilatòria i de l'hemodinàmica pulmonar.⁵⁷

Globalment, l'abordatge actual de l'HDC consisteix en l'optimització de la ventilació per aconseguir una adequada oxigenació, la prevenció i maneig de la HTP i les seves conseqüències i, en un segon terme, la reducció de les vísceres a l'abdomen i la reconstrucció del diafragma. Per últim, consisteix també en la detecció precoç i el tractament de les possibles seqüeles.

Atès que es tracta d'una patologia amb una elevada mortalitat malgrat un tractament complex i especialitzat, actualment el tractament d'aquests pacients es concentra en centres de tercer nivell, que disposin de: un equip obstètric experimentat i amb capacitat d'efectuar tractaments prenatals; una unitat neonatològica tecnificada que pugui oferir ventilació d'alta freqüència oscil·latòria (VAFO), tractament amb òxid nítrós (NO) endovenós o inhalat (iNO), i ECMO (Oxigenació de Membrana Extracorpòria); un equip de cirurgians pediàtrics experts en la reparació quirúrgica del diafragma en el moment més adequat; i, més enllà de l'etapa neonatal, un equip de pediatres i cirurgians pediàtrics per tal d'efectuar un seguiment prolongat de la morbiditat a llarg termini.

Cal, per tant, remetre les mares dels casos diagnosticats a un d'aquests centres per tal que es dugui a terme el seguiment i s'avaluï la necessitat de tractament prenatal. La gestació es deixa progressar, si és possible, fins al moment més proper al terme. No està indicada la cesària electiva. La inducció del part, per tal que aquest es produeixi en el context organitzatiu més adequat, és utilitzada freqüentment.

S'espera que a partir dels estudis en curs sobre teràpia prenatal de l'HDC s'estableixin les indicacions d'aquestes tècniques i es puguin incloure en el protocol de tractament. Mentrestant, la clau d'un tractament adequat per tal de disminuir la mortalitat, és encara l'abordatge postnatal de la HP i la HTP per aconseguir una bona oxigenació del pacient. La cirurgia per tancar el defecte diafragmàtic i retornar els òrgans a l'interior de la cavitat abdominal no és considerada una urgència, però sí una important font de morbiditat. Per això, cal triar el moment oportú postestabilització i la tècnica més adequada per a la reparació.

2.1.9.3. TRACTAMENT PRENATAL

Tractament prenatal mèdic

L'administració de corticoides a la mare s'utilitza per tal d'induir la maduració pulmonar en fetus amb risc de prematuritat. En el cas dels fetus amb HDC també s'utilitza. S'ha demostrat experimentalment que els efectes de la hipoplàsia sobre l'expressió de les proteïnes de surfactant (SP) pot contrarestar-se amb dexametasona a la rata gestant, i que aquest efecte pot deure's a l'activació del TTF-1, que alhora augmentaria la transcripció de SP.³⁶ Malgrat aquestes troballes i que l'ús de glucocorticoides sigui generalitzat, estudis prospectius randomitzats han demostrat que no millora la supervivència.⁹⁵

No s'utilitza actualment cap altra medicació en el tractament prenatal de l'HDC. En el terreny experimental, se n'han proposat diversos. Alguns sembla que milloren la hipoplàsia pulmonar, com l'àcid retinoic,⁹⁶ factor de creixement epidèrmic (EGF),⁹⁷ antioxidants (Vit A, C, i E i n-acetilcisteïna),^{98, 99} tetrandrina,¹⁰⁰ etc; altres que sembla que no, com les hormones tiroïdals (tot i que s'hagués suggerit abans);¹⁰¹ i altres que podrien millorar la hipertensió pulmonar com els inhibidors de la fosfodiesterasa (sildenafil).¹⁰²

Tractament prenatal quirúrgic

Història de la teràpia fetal en l'HDC

Les primeres teràpies fetals que es van realitzar van ser una transfusió intrauterina (1963) i la instil·lació de glucocorticoides al líquid amniòtic per a estimular la maduració pulmonar (1972).

La frustració pel maneig poc eficaç de la HP de l'HDC en el període neonatal va promoure l'interès per conèixer la fisiopatologia prenatal de la malformació. Harrison, el 1980 va demostrar que la hipoplàsia pulmonar és reversible en el període prenatal. Inflant progressivament un baló de silicona dins el tòrax d'un fetus d'ovella va aconseguir reproduir una HP semblant a la dels humans amb HDC, causant insuficiència respiratòria i mort neonatal.¹⁰³ A continuació, demostrà que desinflant aquest baló la HP millorava fins al punt de permetre sobreviure els anyells nounats.¹¹ Va estudiar després, també en un model oví, les conseqüències de reduir el contingut herniat i tancar el defecte prenatalment mitjançant una

cirurgia intrauterina.¹⁰⁴ Es va posar així en marxa una etapa molt productiva en quant a l'adquisició de coneixements de fisiopatologia prenatal de diverses malformacions congènites, de la tolerància de la gestació animal a la manipulació quirúrgica, i els possibles efectes sobre el fetus i la mare.

La cirurgia fetal en el model oví no només va demostrar prevenir la HP, sinó també revertir la disminució en nombre i engruiximent del calibre de les branques de les artèries pulmonars.¹²

Amb aquestes bones perspectives, el mateix Harrison va realitzar les primeres reparacions d'HDC en pacients humans mitjançant cirurgia fetal oberta a finals dels 80.¹³ Els resultats, però, van ser dolents, principalment per una elevada mortalitat intraoperatòria, morts fetals postquirúrgiques i morts neonatals després d'un part prematur.¹⁰⁵

Finalment, es va fer un estudi prospectiu de 4 casos, que va concloure que la reparació fetal de l'HDC no augmentava la supervivència en el subgrup de pacients sense herniació del fetge i que per tant advocava pel tractament postnatal d'aquests casos.¹⁰⁶ Es va abandonar llavors la cirurgia fetal oberta per a reparar el defecte diafragmàtic.¹⁴

Les evidències clíniques que una obstrucció de la via aèria provocava distensió pulmonar van ser descrites per Potter l'any 1941,¹⁰⁷ quan observà en una necròpsia d'un nadó amb atrèsia bronquial lobar que el lòbul afectat presentava una hiperdistensió. Aquesta troballa era superposable a la distensió broncoalveolar que presentaven els pacients amb la síndrome d'obstrucció congènita de la via aèria (CHAOS). Ja a la dècada dels 60 es van realitzar estudis experimentals que demostraven que la lligadura de la tràquea provocava creixement pulmonar.¹⁰⁸ Aquestes troballes van induir anys després l'inici dels treballs experimentals d'oclusió traqueal prenatal per a tractar la hipoplàsia pulmonar de l'HDC, amb la tècnica anomenada PLUG (*"Plug the Lung Until it Grows"*)¹⁵ i a l'estudi fisiopatològic d'aquests canvis.¹⁰⁹ La millora en la supervivència dels pacients de mal pronòstic en que es va començar a utilitzar, va impulsar els estudis sobre l'oclusió traqueal en molts centres.¹⁴

Durant el desenvolupament de la tècnica d'oclusió traqueal endoscòpica en els anys 90 es van provar diferents mitjans d'oclusió traqueal (clips metàl·lics externs, escumes internes, balons, etc).^{110, 111} Finalment, durant aquesta última dècada, l'Oclusió Traqueal Endoscòpica Fetal (FETO-*FetoEndoscopic Tracheal Occlusion*: col·locació traqueoscòpica fetal d'un baló desprenible intratraqueal), s'ha anat desenvolupant com a estratègia capaç d'aconseguir estimular el desenvolupament pulmonar impedit la sortida del líquid de l'arbre broncopulmonar. Inicialment es dubtava de la tolerància materna i fetal del procediment, el

creixement traqueal en la zona de l'obstrucció, la reversibilitat de la oclusió i els efectes secundaris, però s'ha demostrat que és un procediment eficaç, reproduïble i amb baixa morbiditat. La més important d'aquestes morbiditats és un 20% de parts preterme.¹⁷

La demostració que l'oclusió traqueal (OT) fetal causava a més d'un creixement pulmonar, una disminució dels pneumòcits tipus II¹¹² (i per tant del surfactant), va portar a suggerir una OT transitòria i una retirada de l'obstrucció prenatalment. Aquesta és la tècnica que actualment utilitza el Grup Europeu d'Hèrnia Diafragmàtica (EuroCDH) per als fetus amb més risc de mortalitat.¹⁷ El grup de Jan Deprest a Lovaina (Bèlgica) en va ser pioner, i de seguida van "exportar" la tècnica a uns pocs centres europeus i americans, per tal d'arribar a un nombre major de pacients i compartir els resultats.

La tècnica FETO actualment es realitza en menys de 10 centres europeus agrupats en l'anomenat CDH Euro Consortium. En 5 centres de 4 ciutats europees s'està duent a terme un assaig clínic randomitzat (Lovaina, Barcelona, París i Londres) en casos de pronòstic moderat i greu independentment. El nucli original de l'experiència europea el formen els grups de la Universitat de Lovaina (J. Deprest), de L'Hospital Clínic de Barcelona (E. Gratacós) i del King's College de Londres (K. Nicolaides) que formen l'anomenat CDH European Task Force amb una experiència acumulada de més de 200 casos. L'oclusió traqueal es fa entre les 26 i les 28 setmanes per fetoscòpia percutània amb una cànula de 3,3 mm sota anestèsia local i sedació o amb anestèsia epidural. A través d'ella es fa la traqueoscòpia i s'introdueix un baló que un cop inflat fins ocluir totalment la tràquea es desprèn del catèter portador. L'oclusió es retira a la setmana 34 mitjançant: una punció ecoguiada del globus; amb una segona fetoscòpia i rebentant-lo amb làser; o amb un procediment en EXIT (Ex-Utero Intrapartum Treatment: Cesària modificada en la que es manté la circulació placentària durant el temps necessari per restablir la permeabilitat de la via aèria abans d'extraure el fetus).^{17, 113}

El primer assaig clínic randomitzat que es va realitzar, als EUA, va concloure que els pacients tractats amb OT no tenien major supervivència respecte als controls.¹⁶ Entre els defensors de l'OT, aquest resultat es va atribuir a la biaix en la selecció de casos de pronòstic intermedi i dolent, doncs la impressió clínic dels resultats del procediment era molt favorable. Per això diversos grups han continuat tractant clínicament pacients amb la tècnica FETO a partir d'una selecció més estricta dels casos. Només s'indica actualment en casos de mal pronòstic (herniació hepàtica i o/e LHR menor de 28%) atès que sembla que les supervivències en aquest subgrup són del 50% mentre que l'esperada és del 25%.⁴

Fins fa poc, no hi havia resultats concloents en quant a la millora de la supervivència emprant aquesta tècnica.¹¹⁴ Recentment, però, s'han publicat els resultats d'un segon assaig clínic (després del de Harrison¹⁶), realitzat al Brasil, que obté supervivències del 50% en 21 fetus amb HDC, LHR<1 i HH, tractats amb la tècnica FETO, mentre que entre els 21 casos no tractats la supervivència és del 4,8%.¹¹⁵

El grup europeu EuroCDH encara continua realitzant els seus assaigs clínics randomitzats anomenats TOTAL-trials (Tracheal Occlusion To Accelerate Lung growth) per a avaluar la indicació de FETO per a l'HDC de moderat i alt risc de forma separada, i encara no se n'han publicat els resultats.^{17, 116}

2.1.9.4. TRACTAMENT POSTNATAL

2.1.9.4.1. Tractament postnatal mèdic

L'objectiu inicial amb la reanimació neonatal és l'estabilització clínica amb una oxigenació suficient mirant d'evitar el barotrauma. Cal procedir a la intubació traqueal ja que la ventilació amb mascareta facial i bossa pot resultar contraproductiu (per la distensió de l'estómac i l'intestí herniats al tòrax amb l'aire insuflat). Cal monitorització invasiva venosa i arterial (umbilical), mesura de pressió arterial i saturació preductal (que hauria de mantenir-se entre 80 i 95%) i postductal (per sobre de 70%), sedació, col·locació de sonda nasogàstrica, hidratació i control de temperatura. Totes les mesures actualment aplicades en el maneig neonatal d'aquests pacients han estat estandarditzades i publicades en un recent document de consens del grup CDH Euro Consortium.¹¹⁷

Estratègies ventilatòries

La ventilació mecànica convencional (VMC) només permet modificacions de pressió, volum i freqüència amb una eficàcia limitada en l'HDC. L'estratègia ventilatòria convencional més utilitzada fins fa pocs anys, era hiperventilar per aconseguir una alcalosi respiratòria que reduís les resistències vasculars pulmonars i invertís el *shunt* pel *ductus*. Això sol requerir pressions pic altes que poden causar trauma pulmonar. A més, la ventilació mecànica causa edema i pas de proteïnes a la llum de l'alvèol (que poden causar desnaturalització del surfactant). Tota aquest dany pulmonar per la ventilació mecànica és causa de més dificultat

d'oxigenació, que es tradueix en més mortalitat. D'aquí que la ventilació a pressions altes s'hagi abandonat.⁴ Es recomana actualment, en el consens europeu, no superar pressions pic de 25cm H₂O.¹¹⁷

La hipercàpnia permissiva (permetre l'elevació de la concentració de CO₂ en sang, dins uns límits, per tal de reduir el barotrauma) es va introduir posteriorment i ha augmentat la supervivència d'aquests pacients. Malgrat tot, no és possible evitar el barotrauma en un nadó amb un pulmó insuficient que no es deixa oxigenar, per la qual cosa, la ventilació mecànica continua sent una font important de morbiditat.⁴

Així, l'estratègia de VMC consisteix bàsicament a ventilar amb altes freqüències i baixes pressions (pressió controlada) i no utilitzar PEEP (pressió positiva telespiratòria). Els paràmetres recomanats són: Pressió inspiratòria de 20-25 cmH₂O, PEEP de 2-5 cmH₂O i freqüència de 40-60/min.¹¹⁷

La VAFO (ventilació d'alta freqüència) és una modalitat de ventilació que utilitza volums corrents inferiors a l'espai mort anatòmic, amb una freqüència respiratòria suprafisiològica (>150x') per afavorir el reclutament d'unitats alveolars i el manteniment d'un volum pulmonar òptim. D'aquesta manera s'eviten els cicles repetits de col·lapse-sobredistensió de les unitats alveolars i per això té menys incidència de barotrauma i lesió parenquimatosa (per l'activació de mediadors de la inflamació). S'utilitza de forma majoritària en els pacients més greus des dels anys 90, i els estudis retrospectius semblen indicar una millora en la supervivència, tot i que no s'han realitzat estudis randomitzats per a demostrar-ho.^{117,118}

Una altra teràpia que es va proposar va ser la ventilació líquida (VL). S'utilitzà el perfluorocarboni (PFC), una molècula sintètica amb una elevada solubilitat per l'O₂ i el CO₂, que a temperatura corporal té un estat líquid, i amb una tensió superficial als alvèols inferior a la de l'aire, que fa que aquests tinguin menor tendència a col·lapsar-se tot i la manca de surfactant. Es van descriure dues modalitats de VL: la total (VLT) si el ventilador impulsa el propi PFC, i la parcial (VLP) si s'usa un ventilador convencional que impulsa aire cap als pulmons plens de PFC. Només hi va haver un assaig clínic pilot, randomitzat i multicèntric sobre 13 casos (8 VLP i 5 controls) publicat el 2003,¹¹⁹ en pacients amb HDC mentre estaven en ECMO. Es va trobar un augment de la PaO₂, disminució de la PaCO₂ i millora la distensibilitat pulmonar. La supervivència del grup tractat també va ser major, i en base a aquests resultats es va intentar fer un assaig clínic més ambiciós i definitiu. La FDA,

però, no va aprovar l'ús posterior del PFC per aquesta indicació. Sembla que la pressió dels fabricants de respiradors va pesar en aquesta decisió.

Vasodilatadors pulmonars

Com hem vist, la diferència de saturació pre i postductal, així com l'ecografia del VD i de les artèries pulmonars, són els dos principals indicadors d'HTP en aquests pacients. Quan la saturació preductal cau per sota del 85%, cal assegurar un adequat volum intravascular perfontent cristal·loides o concentrats d'eritròcits per a optimitzar l'intercanvi d'O₂, i utilitzar inotròpics per tal de disminuir el *shunt* dreta-esquerra.¹¹⁷

El següent pas és la utilització de diferents vasodilatadors pulmonars. El de primera elecció en l'actualitat és l'òxid nítric inhalat (iNO), que té un efecte potent i selectiu (té l'avantatge de tenir un efecte local pulmonar en inactivar-se quan s'uneix a l'hemoglobina). En un estudi no randomitzat, s'ha trobat una millora del pronòstic amb la combinació de NO amb la hipercàpnia permissiva.¹²⁰ En un estudi randomitzat si que es va demostrar que la combinació de VAFO i NO millora la PaO₂ en pacients amb HDC en major grau que l'ús d'aquests separadament.¹²¹

Altres fàrmacs utilitzats actualment són els inhibidors de la fosfodiesterasa (sildenafil), antagonistes de l'endotelina-1 (bosentan, sitaxsentan), i vasodilatadors pulmonars com la prostaciclina o els seus anàlegs. Tots ells estan destinats a disminuir la HTP.⁵⁴

ECMO

Des de la seva introducció a principis dels 80, l'Oxigenació de Membrana Extracorpòria (ECMO) va ser la gran esperança per a augmentar la supervivència en pacients amb HTP refractària al tractament convencional. Es considera l'últim graó terapèutic de la insuficiència respiratòria. Teòricament hauria de servir per suplir l'oxigenació deficient (per HP i HTP severes) entre el naixement i el desenvolupament pulmonar suficient per mantenir la vida (pocs dies-setmanes). Hi ha una gran variabilitat entre centres en quan als criteris d'indicació, i cada cop és més usada tot i que no està clar que millori el pronòstic ni la supervivència.¹²² Un punt en contra és l'elevat nombre de seqüeles neurosensorials (fins 40-60% en pacients amb HDC que han rebut ECMO, mentre que en altres patologies respiratòries que l'han requerit és del 10%).⁴

Hi ha dues modalitats d'ECMO segons calgui o no suport hemodinàmic. Si a més de suplir la funció respiratòria cal suport hemodinàmic, s'usa la variant venoarterial que curtcircuita la circulació pulmonar. La sang venosa s'extrau de l'aurícula dreta a través d'una cànula que entra per la vena jugular interna dreta i es retorna un cop oxigenada a la crossa aòrtica a través d'una segona cànula insertada a l'artèria caròtide dreta.

Quan només cal substituir la funció respiratòria perquè el cabal cardíac del pacient és suficient, es pot usar l'ECMO venovenosa. En aquesta modalitat la sang venosa s'extrau igualment de l'aurícula dreta a través d'una cànula a la vena jugular interna dreta i es torna oxigenada a la mateixa aurícula dreta. Habitualment s'utilitza una sola cànula, que pot tenir dues llums per als dos sentits del flux (entrada i sortida) o de llum única amb un sistema de clampatge alternatiu i inversió del flux de forma intermitent. Aquesta darrera variant s'anomena Assistència Respiratòria ExtraCorpòria (AREC).

No s'han trobat diferències significatives en els resultats de morbimortalitat segons s'usi ECMO venoarterial o venovenosa,¹²³ suggerint que suplir la funció del cor dret no és un factor crucial en aquests pacients. Tampoc s'han pogut identificar factors prenatals ni neonatals que puguin predir la necessitat d'ECMO en pacients amb HDC. L'únic factor que s'hi ha associat significativament és el pneumotòrax.¹²⁴

2.1.9.4.2. *Tractament postnatal quirúrgic*

Com hem vist, abans de la dècada dels 80 es creia que la reducció del contingut herniat i el tancament del diafragma eren una urgència quirúrgica per tal d'aconseguir una reexpansió pulmonar el més ràpidament possible. Els nous conceptes fisiopatològics van canviar el plantejament, i tot i que no s'ha demostrat que la supervivència sigui millor en l'abordatge quirúrgic tardà, tampoc no s'ha provat que sigui pitjor.¹²⁵ Actualment, la majoria de centres opten per l'estabilització de la funció respiratòria prequirúrgica.¹²⁶

El que sí que s'ha observat és que els pacients empitjoren amb la intervenció quirúrgica degut a un augment de les resistències pulmonars per múltiples factors (dolor, hipotèrmia, estimulació per l'aspiració endotraqueal, soroll ambient, atelèctasis, etc).

Per això s'ha mirat de diferir el tractament fins que els indicadors d'hipertensió pulmonar millorin ecogràficament (entre 100 i 360 hores després), i sembla que així les artèries pulmonars es van dilatant i a més són menys sensibles als estímuls de vasoconstricció.⁴ El document de consens europeu del 2010 recomana la reparació en el moment que es

produeixi l'estabilització de la HTP basada en els següents paràmetres: normalització de la tensió arterial per a l'edat gestacional i SaO₂ preductal >85% amb FiO₂ <50%.¹¹⁷

El procediment clàssic ha estat la laparotomia subcostal del costat del defecte, la reducció curosa de les vísceres herniades al tòrax i el tancament del defecte diafragmàtic amb punts separats de material irreabsorbible. En cas que presenti un sac herniari, aquest és ressecat igualment de forma curosa. Quan el defecte és massa gran s'utilitza un pegat sintètic per tal de cobrir el defecte, fixant-lo igualment amb material irreabsorbible. En tots dos casos, la sutura en cas de no disposar d'un llavi diafragmàtic posterior suficient, ha d'incloure les costelles per tal de donar un suport suficient a la reparació i disminuir la possibilitat de recidiva de l'HDC.

Cal també corregir la malrotació intestinal, i en cas d'observar una evident alteració de la unió esofagògica, es pot associar un procediment antireflux gastroesofàgic.

Si és possible, es tanca la laparotomia per plans de forma estàndard. Per contra, si en el moment de tancar l'abdomen, la pèrdua del dret de domicili del contingut herniat condueix a una pressió intraabdominal excessiva, es pot optar per deixar la musculatura oberta i tancar només la pell, aplicar un pegat a les vores de la musculatura oberta, o utilitzar una sitja on allotjar el budell i reduir-lo progressivament els dies posteriors.

Altres vies d'abordatge que s'utilitzen són:

- Toracotomia (en particular en HDC dretes per tal d'evitar les dificultats que implica tancar el defecte diafragmàtic darrera el fetge).
- Laparoscòpia. Presenta els avantatges de la cirurgia mínimament invasiva (en teoria podria disminuir l'estímul quirúrgic per la vasoconstricció deguda al dolor i la hipotèrmia) però té la dificultat en la visualització de la part posterior del defecte per la interposició del budell.
- Toracoscòpia. També es tracta d'una tècnica mínimament invasiva que, a més, té l'avantatge d'una millor visualització del defecte diafragmàtic sense la interposició de vísceres intraabdominals. El seu principal inconvenient és la limitació d'espai i moviments en el tòrax d'un nounat, que dificulta el tancament del defecte.

L'ús de tècniques mínimament invasives per a la reparació de l'HDC continua sent controvertit. No s'han demostrat els beneficis d'aquest abordatge més enllà dels genèrics de la cirurgia endoscòpica, però sí que és un abordatge factible, amb resultats semblants a la via oberta (en quant a recidives, temps fins a tolerància digestiva, estada a UCI, etc), tot i un índex de reconversions notable (20-30%) i una major durada del procediment.^{127, 128} Un dels principals inconvenients argumentats és que l'ús d'insuflació de CO₂ causa hipercàpnia. Tot i que aquesta afirmació és inapel·lable, no s'ha demostrat que això es tradueixi en variacions pel que fa a la HTP, hipoxèmia, hipotensió, necessitat de vasodilatadors pulmonars o inotròpics.¹²⁹

2.1.10. PRONÒSTIC

S'han identificat diferents factors relacionats amb la mortalitat postnatal de l'HDC.

Entre els prenatals: l'HDC dreta, l'herniació hepàtica, la presència de malformacions associades (sobretot cardiopatia), el major grau d'hipoplàsia pulmonar, la ruptura prematura de membranes i un diagnòstic prenatal abans de les 24 setmanes.^{4,17,68} Com sembla lògic, tots aquests es poden agrupar en dos conceptes: tenen pitjor pronòstic els pacients amb múltiples malformacions i aquells que tenen defectes grans.

Entre els clínics: el pes al naixement, l'Apgar a 1 i 5 minuts, l'agenèsia diafragmàtica, la necessitat de pegat en la reparació i un pneumotòrax que requereixi drenatge.^{118, 130}

Més enllà de la identificació d'aquests factors qualitius que suposen una major mortalitat, actualment s'utilitzen diferents paràmetres per tal de poder estratificar el risc i, per tant, ajudar a decidir si aplicar teràpies prenatales. Es tracta de paràmetres ecogràfics prenatales que es desenvolupen a l'apartat següent.

Tot i que també s'han proposat índexs neonatals amb valor pronòstic, el seu baix valor predictiu ha fet que caiguessin en desús. Es van proposar l'*índex d'oxigenació* ($IO = PMA \times FiO_2 / PaO_2$) i l'*índex de ventilació modificat* ($IV = RR \times PMA \times PaCO_2 / 1000$) que quan resultaven $<0,08$ i <40 respectivament, s'associaven amb supervivències $>90\%$.^{131,132}

2.1.10.1. PARÀMETRES PRONÒSTICS ECOGRÀFICS

Des de la generalització de l'ecografia prenatal, s'han suggerit diferents indicadors ecogràfics que semblaven associar un pitjor pronòstic (com la presència de polihidramni i la

situació intratoràcica de l'estómac), però no s'han pogut correlacionar amb la mortalitat de forma concloent. A la Taula 4 es recullen els indicadors que diferents autors han proposat.

Taula 4. Indicadors ecogràfics utilitzats amb finalitat pronòstica⁶⁹

Mida pulmonar	Mida de l'hèrnia	Altres indicadors
-Lung-to-head ratio (LHR)	-Estómac intratoràcic	-Diagnòstic <25 setmanes
-Volum pulmonar absolut	-Perímetre abdominal petit	-Anomalies associades
-Raó diàmetre pulmonar/ perímetre toràcic	-Fetge intratoràcic (HH)	-Polihidramni
-Raó àrea transversal pulmó/tòrax	-Raó hèrnia/cor	-Hipoplàsia cavitats esq.
	-Desviació mediastínic	-Vascularització pulmonar (visualització n° de bifurcacions)
	-No herniació visceral visible	

A continuació exposem aquells paràmetres en que sí que s'ha demostrat correlació amb la mortalitat, i quins grups pronòstics que se'n deriven.

- **LHR i HH**

A partir de diversos treballs sobre la utilitat pronòstica de l'eco prenatal s'han establert dos factors predictors d'elevada mortalitat independents l'un de l'altre: la major hipoplàsia pulmonar i la presència de fetge intratoràcic, avaluats per ecografia.¹⁸ Així, s'han pogut realitzar taules de supervivència a partir d'aquests dos paràmetres ecogràfics: la hipoplàsia pulmonar mesurada amb el LHR, i la visualització d'herniació hepàtica (HH) al tòrax. També s'han realitzat taules amb la combinació de tots dos factors.

Agafant com a paràmetre el LHR, les supervivències observades són les següents:⁶⁸

LHR	Supervivència
0,4-0,7	0%
0,8-0,9	15%
1-1,5	65%
>1,6	80%

Quan es combina el LHR amb l'herniació hepàtica, s'obté la següent taula de supervivència:⁶⁸

LHR	HH	Supervivència
<1	Sí	<10%
	No	60%
1-1,4	Sí	65%
	No	75%
>1,4	-	85%

Com veiem, la presència d'HH amb LHR<1 empitjora molt el pronòstic. Tot i que l'herniació del fetge es correlaciona inversament amb la supervivència i és independent del LHR, no està clar que ho sigui d'altres variables. S'espera que la RMN podrà tenir major sensibilitat a l'hora de quantificar el volum de fetge herniat i el de pulmó residual.^{17, 73}

Actualment, el LHR s'utilitza només com a indicador pronòstic en pacients amb HH, atès que no s'han observat diferències de supervivència si es pren aïlladament el LHR en pacients sense herniació hepàtica.⁶⁸ Com ja hem vist, però, una recent metaanàlisi conclou que l'evidència actual no dona suport al valor pronòstic del LHR respecte a la supervivència.⁶⁹ Si que ho ha fet, en canvi, la metaanàlisi que ha analitzat la HH, conclouent la seva correlació amb una major mortalitat.¹³³

- **o/e LHR**

Atès que el LHR augmenta en l'HDC amb l'edat gestacional, i que l'o/e LHR és independent de l'edat gestacional, actualment s'utilitza també aquest segon paràmetre. En aquest cas també s'han fet taules de supervivència ja sigui com a únic indicador o combinat amb l'HH (Fig. 14). Actualment s'usa com a predictor de supervivència per a la indicació de teràpia fetal.¹³⁴

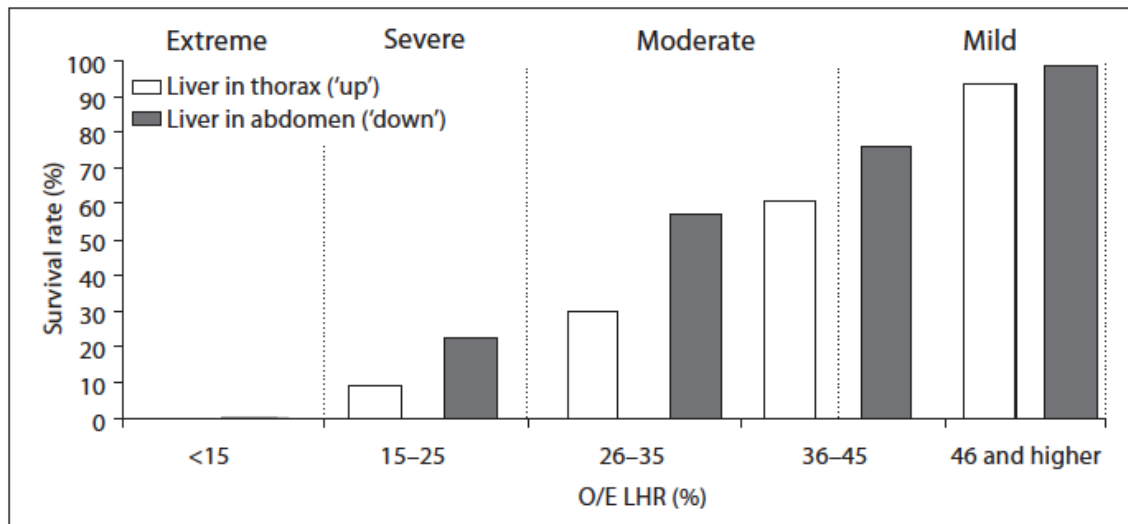


Figura 14. Taxes de supervivència en HDC esquerres aïllades segons l'índex o/e LHR i la situació del fetge intratoràcica.⁷²

L'o/e LHR és el paràmetre més utilitzat ara per predir el pronòstic. Com veiem al gràfic, s'han establert 4 grups pronòstics que són la base per a decidir si un cas determinat és candidat a teràpia fetal. Aquests grups són:

1. HP extrema

- o/e LHR <15%

La supervivència esperada és 0%

2. HP greu

- o/e LHR 15-25%

Supervivència de 20% sense HH i 10% si hi ha HH

3. HP moderada

- o/e LHR 26-35% independentment d'HH
- o/e LHR 36-45% amb HH

Supervivència del 30-60%

4. HP lleu

- o/e LHR 36-45% sense HH
- LHR o/e >45% amb o sense HH

Supervivència >70%

Aquests paràmetres han estat validats només per a HDC esquerres tant a les setmanes 22-23 com a les 32-33. És per tant un paràmetre independent de l'edat gestacional. Per contra, les HDC dretes tenen pitjor pronòstic (supervivència 0% en o/e LHR per sota del 45%).^{134, 135}

L'o/e LHR sembla ser el millor estimador de la supervivència postnatal del fetus amb HDC, i en el subgrup de pitjor pronòstic (LHR o/e <26%: HP greu i extrema) s'ha suggerit que els paràmetres hemodinàmics (PI i PEDFR) poden discriminar els casos de pronòstic infaust dels que tenen major probabilitat de sobreviure.⁸⁴ En aquest sentit, la normalitat dels paràmetres hemodinàmics (PI i PEDRF) ha demostrat associar-se amb una absència de morbiditat, mentre que l'o/e LHR no té aquesta associació.¹³⁶

Igualment, s'espera que aquests paràmetres d'ecografia-doppler podran correlacionar-se amb el grau d'HTP, que alhora és una important causa de mortalitat.^{66, 81, 88}

- **Altres paràmetres**

Com hem vist en els apartats de diagnòstic prenatal d'HP i HTP (2.1.7.2 i 2.1.7.3), diferents mesures ecogràfiques del pulmó i la vascularització pulmonar s'estan estudiant i mirant de relacionar amb el pronòstic. A tall de resum d'aquest aspecte explicat en aquells apartats, citem de nou els paràmetres més estudiats fora del LHR, que continua sent, avui dia, l'índex més acceptat i utilitzat arreu amb aquesta finalitat:

- El volum pulmonar estimat també s'ha correlacionat amb la supervivència. Aquesta correlació és millor prenent la mesura del volum pulmonar fetal (FLV) total o/e (*o/e FLV*) respecte a volum corporal fetal que respecte a l'edat gestacional.⁷⁵
- El *diàmetre de l'artèria pulmonar* es correlaciona amb el pes pulmonar. Una artèria pulmonar contralateral gran es correlaciona amb una major mortalitat. Una discrepància de mida entre les branques principals amb un calibre gran del tronc es correlaciona amb una major morbiditat respiratòria i una mortalitat neonatal major.⁶⁶ L'ús de l'ecografia arterial pulmonar seriada també s'ha utilitzat per a detectar l'evolució cap a HTP.⁹¹

- Uns diàmetres de les artèries pulmonars esquerra i dreta petits i un **índex de McGoon** $\leq 1,3$ es correlacionen amb una major mortalitat.⁷⁸ La combinació de l'índex de McGoon i el baix pes al naixement, tenen un elevat valor predictiu pel que fa a la mortalitat.¹³⁷

2.1.10.2. SEGUIMENT I SEQÜELES

L'augment de supervivència que han suposat els avenços terapèutics en el tractament de l'HDC, s'ha acompanyat d'una major morbiditat d'aquests supervivents que pot afectar diversos sistemes i òrgans. S'han identificat seqüeles respiratòries, cardiovasculars, gastrointestinals, musculoesquelètiques i neurocognitives a més de ser causa d'hipocreixement.⁴

Gastrointestinals

El reflux gastroesofàgic (RGE) és molt freqüent (70%), tot i que sovint asimptomàtic. Ha d'ésser descartat sempre, perquè pot tenir conseqüències patològiques rellevants (p. ex. esofagitis, esòfag de Barret, falta de creixement). La seva patogènia no és evident i probablement és multifactorial; sembla més aviat una comorbiditat que una seqüela i per això és tractat en aquell apartat (vegeu l'apartat Patologia associada dins 2.1.1 Epidemiologia)

Respiratòries

S'han descrit infeccions respiratòries de repetició i tos crònica en el 25-50% dels pacients, sobretot durant el primer any, i la majoria dels pacients necessiten broncodilatadors i corticoides inhalats.¹³⁸ A curt termini, però, no totes les sèries presenten aquestes seqüeles.⁹² Curiosament, en les espirometries d'aquests pacients s'han trobat patrons tant restrictius com obstructius, però sense correlació amb el grau d'hipoplàsia observat en la intervenció i en les radiografies postoperatòries. Sembla que hi hauria un predomini de l'obstrucció en les vies de petit calibre amb un augment de la capacitat residual per un cert emfisema pulmonar o per deformitat toràcica.⁴

Quirúrgiques

Hi ha certa morbiditat que sense ser causada per la cirurgia, hi està relacionada estretament.

S'han registrat deformitats toràciques fins al 47% dels casos i escoliosi en el 13%.

La recidiva de l'HDC és molt més freqüent en cas de necessitar un pegat per a la cobertura del defecte (46%) que en el tancament primari (10%); i té un temps mig d'aparició al voltant de l'any. L'ús d'un pegat incrementa, a més, tant la incidència de deformitat toràcica com la d'obstrucció intestinal,¹³⁹ tant en les HDC esquerres com en les dretes.¹⁴⁰

Ja sigui per vòlvul o per adherències postquirúrgiques, la incidència d'obstrucció intestinal en pacients amb HDC arriba al 10-20%, essent la causa de reintervenció més freqüent. A més del vòlvul per malrotació, l'íleus prolongat per l'estat crític que solen presentar neonatalment i l'elevada pressió abdominal després de la reducció de l'hèrnia, s'han considerat substrats etiopatogènics d'aquesta elevada incidència d'obstrucció intestinal.

Altres símptomes intestinals que poden presentar durant el seguiment fins en un 13% són: singlot, vòmits, meteorisme i dolor abdominal.⁴

Els procediments quirúrgics més freqüents en aquests pacients a més de la reparació de l'HDC són la canulació/decanulació per l'ECMO i la funduplicatura per RGE (18%).¹⁴¹

Neurocognitives

Venen determinades inicialment per la hipoxèmia, hipercàpnia i acidosi neonatal que poden presentar, i per la teràpia amb ECMO.

La hipoxèmia persistent causa retard del desenvolupament cognitiu. La RMN ha detectat alteracions en pràcticament tots els pacients estudiats postHDC, que no eren detectables amb eco, però es desconeix la traducció clínica d'aquestes alteracions de la neuroimatge a llarg termini. La TAC igualment ha demostrat ser més sensible que la eco per a detectar lesions que van des d'hemorràgies petequials fins a atròfia frontal.

En el cas de pacients tractats amb ECMO s'han descrit dèficits neurològics simptomàtics en 10-30% dels casos.⁴

També s'han detectat manifestacions psicològiques com trastorns de conducta i dèficits cognitius lleus.⁶²

Així, les seqüeles cognitives són freqüents, tot i que el 50% dels casos d'HDC no tenen patologia neurològica associada, i dels que en tenen només un 7% presenta anomalies al sistema nerviós central.²⁴

Hipoacúsia

És una seqüela freqüent (35%), i s'ha relacionat amb l'alcalosi mantinguda (per hiperventilació) i amb la ventilació mecànica prolongada. També s'hi ha relacionat

l'ototoxicitat medicamentosa i la teràpia amb ECMO.

El tractament neonatal i l'ECMO en pacients similars amb altres patologies no té una incidència tan alta d'hipoacúsia, per la qual cosa alguns autors apunten que podria estar relacionada amb la patologia de base; la mateixa HDC.⁶²

Retard de creixement

Sembla tenir una incidència del 50%, i un 20-30% dels casos estaria per sota del percentil 5 tot i la optimització de les aportacions calòriques. Entre els factors que s'han involucrat en el retard de creixement que pateixen els pacients amb HDC hi ha l'augment de necessitats metabòliques per l'estrès neonatal i la patologia pulmonar, l'augment de treball respiratori, l'avèrsió oral, l'íleus intestinal, l'ús d'ECMO i d'oxigenoteràpia prolongada, i el RGE.⁴

Musculoesquelètiques

S'han descrit deformitats toràciques en 16-48% dels casos. La més freqüent és el *pectus excavatum*. Altres són asimetries del tòrax, escoliosi i deformitats costals i externals. S'han relacionat amb: una alteració inicial comuna del desenvolupament del pulmó, diafragma i paret toràcica; el petit volum pulmonar del costat afectat; un treball respiratori major que tendeixi a provocar retracció de les zones cartilaginoses i per tant un *pectus excavatum*; els pegats utilitzats en els defectes grans, i amb el fet que aquests pegats limitin el creixement toràcic en no ser distensibles. Normalment no requereixen una reparació quirúrgica. Es recomana seguiment de les escoliosis per evitar patrons restrictius.⁴

2.2. MODELS ANIMALS EXPERIMENTALS D'HDC

Degut a les limitacions de l'estudi de l'HDC en humans, s'han utilitzat i es continuen utilitzant múltiples models animals experimentals d'HDC. El primer model que es va desenvolupar va ser el d'ovella, amb una HD creada quirúrgicament en el terç mig de la gestació. Posteriorment, quan es va aconseguir un model teratogènic induït en rata amb un herbicida (Nitrofèn), que provoca principalment defectes diafragmàtics i pulmonars, es va poder estudiar exhaustivament tota la seqüència patogènica de l'HDC d'aquest origen. Aquest model teratogènic funciona en rates i ratolins, però no s'ha pogut reproduir en animals més grans. Tanmateix, com més gran és l'animal, més fàcil és crear una HD quirúrgicament en l'etapa fetal, i l'èxit del model depèn sobretot de l'estabilitat de l'úter davant l'agressió quirúrgica. Aquests models quirúrgics s'han realitzat en rates, conills, ovelles, gossos i porcs. Darrerament també s'han utilitzat models amb animals transgènics.

Cap d'aquests models reproduceix perfectament l'HDC amb les malformacions associades que es produeixen en l'humà, però tots ells aporten llum en l'estudi d'aquesta patologia, la seva patogènia i el seu tractament potencial.⁴⁶

2.2.1. MODEL TERATOGENIC: NITROFÈN

Entre els múltiples teratògens que han estat utilitzats en models murins en relació amb l'HDC (cadmi, aspirina, diflunisal, etc), el més destacable, atès que reproduceix en bona mesura les troballes de l'HDC en humans, és el nitrofèn. Aquest és, possiblement, el model animal d'HDC més utilitzat.³⁹

El nitrofèn (2,4-diclorofenil-*p*-nitrofenil èter) és un herbicida que administrat a la rata gestant causa HDC als fetus, amb hipoplàsia pulmonar i malformacions cardíques i esquelètiques que s'assemblen a les que es troben en l'HDC en humans. Malgrat això, no s'ha pogut demostrar cap relació d'aquest herbicida en l'etiopatogènia en humans. La incidència d'HDC per la seva administració és major en les rates Sprague-Dawley que en les Wistar.³⁹ Amb dosis de 2,5mg/g de menjar s'aconsegueixen incidències d'HDC del 80%, sent major la incidència com més precoç és l'administració del nitrofèn dins un període finestra efectiu (al voltant del dia 9-10 de gestació).³¹ El moment de l'administració té

efectes sobre la lateralitat. Quan s'administra el dia 9, la majoria de defectes són esquerres, mentre que si s'administra el dia 12, predominen les HDC dretes.³⁹

El seu mecanisme patogènic sembla ser la interferència de la síntesi de l'àcid retinoic. Es teoritza que això origina un doble insult independent sobre el pulmó i sobre el diafragma que explicarien conjuntament la hipoplàsia pulmonar i l'HDC que en resulten.¹⁴²

El desenvolupament d'HDC i hipoplàsia pulmonar, entre d'altres malformacions, en models murins de dèficit nutricional de vitamina A ja es va observar als anys 40 amb incidències d'entre el 25% i el 60%. També es va observar que aquesta incidència es reduïa o desapareixia amb l'administració de retinol o aliments que el continguessin, com l'oli de fetge d'halibut.³⁹

L'administració prenatal de vitamina A en el model d'HDC amb nitrofèn pot reduir la incidència d'HDC des d'un 54% a un 32%. L'administració d'àcid retinoic és encara més potent i redueix la incidència fins a un 15%.¹⁴³

Pel que fa al desenvolupament pulmonar en aquest model, s'han constatat alteracions de la vascularització pulmonar semblants a les de l'HDC en humans. En concret, una disminució del calibre dels vasos pulmonars i un engruiximent de la paret dels mateixos.⁹ En estudiar amb immunohistoquímica la paret d'aquests vasos s'observa una manca d'expressió del factor angiogènic VEGF (factor de creixement vascular endotelial) en els individus amb HDC, sense observar diferències en l'estudi de les isoformes de la cadena pesada de la miosina (que corresponen a diferents fases de maduració vascular) ni d'actina.¹⁴⁴ Això suggeriria que la principal alteració vascular seria endotelial i en resultaria alterat el to i la reactivitat vascular, mentre que la musculatura seria ultraestructuralment normal.

També s'ha observat una disminució de l'expressió de la proteïna Shh (Sonic hedgehog) en els pulmons d'aquests fetus de rata.³³ La proteïna Shh, està implicada en l'organogènesi, particularment de l'esòfag i de la ramificació pulmonar.

L'administració prenatal de vitamina A ha demostrat atenuar la HP⁹⁸ i la d'àcid retinoic resulta en una major alveologènesi dels fetus afectats respecte als controls.¹⁴⁵

Un altre agent terapèutic assajat en aquest model és la tetrandrina que actuaria disminuint l'expressió del factor de creixement transformador- β (TGF- β) que està sobreexpressat en l'HDC i se li atribueix un efecte d'inhibició del creixement i desenvolupament pulmonar.¹⁰⁰

Tot i que s'havia hipotetitzat que el paper que les hormones tiroïdals tenen en el

desenvolupament del pulmó podia interferir-se pel nitrofèn i explicar la patogènia de la HP que produeix, els nivells de T3 i T4 en teixit pulmonar no donen suport a aquesta teoria ja que no són diferents en fetus de rata exposada o no al nitrofèn.¹⁰¹

També s'ha assajat l'oclusió traqueal en el model de ratolí amb nitrofèn observant una normalització de la raó pes pulmó/pes fetus, i dels espais aeris, sense observar efecte en la ramificació bronquiolar.¹⁴⁶

Els principals avantatges d'aquest model són el baix preu, la fàcil realització i que produeix un defecte precoç en el desenvolupament diafragmàtic, de forma similar a l'HDC dels humans. Els seus principals inconvenients són: la petita mida dels fetus, que dificulta qualsevol procediment quirúrgic, i la teratogènia en sí mateixa, atès que en humans no s'ha demostrat associació de l'HDC amb teratògens.³⁵

2.2.2. MODELS GENÈTICS

Es basen en la utilització de ratolins *knockout*, es a dir, ratolins modificats genèticament per tal que no expressin certs gens implicats en el desenvolupament diafragmàtic i pulmonar.

S'han utilitzat ratolins mutants amb una abolicció de l'expressió del gen 1 del tumor de Wilms (WT1; conegut gen supressor relacionat amb el nefroblastoma), que presentaven defectes diafragmàtics associats,⁴⁶ i altres amb l'expressió bloquejada de Gli2 i/o Gli3 (proteïnes implicades en l'organogènesi de l'esòfag i la ramificació pulmonar) que manifesten un espectre de malformació pulmonar que va des de la formació d'un únic lòbul pulmonar fins a una agenèsia pulmonar.⁴⁶

Altres gens i proteïnes implicades en el desenvolupament diafragmàtic i pulmonar, utilitzades en models murins genètics amb bloqueig de la seva expressió són: Slit3, Gata4 i Gata6, Fog2, c-Met, COUP TFII, PDGFR α (receptor α del factor de creixement derivat de plaquetes) i RAR (receptors de l'àcid retinoic).^{21, 46}

L'estudi en aquests models permet obtenir informació fisiopatogènica i embriològica de l'HDC que no s'obté en els models quirúrgics.

2.2.3. MODELS QUIRÚRGICS

Una de les hipòtesis patogèniques de la HP en l'HDC, atribueix aquella al pas de vísceres intraabdominals al tòrax impedit el normal desenvolupament del pulmó per una compressió directa i per l'alteració dels moviments respiratoris fetals. Els models quirúrgics reproduïen aquesta situació creant un defecte diafragmàtic o bé ocupant directament el tòrax.⁴⁶

Aquests models permeten estudiar tant les alteracions pulmonars com assajar diferents estratègies prenatales per tal de revertir els efectes de l'HD. Com que no hi ha un error patogènic, no serveixen per a l'estudi etiològic o fisiopatològic del defecte diafragmàtic però s'hi poden estudiar les conseqüències de l'HD *per se*, excloent el context malformatiu que pot acompanyar els pacients humans. Per aquest motiu, són models que s'han utilitzat fonamentalment per a avaluar tant les conseqüències directes de la ocupació d'espai intratoràcic com els efectes de diferents teràpies prenatales com: l'administració prenatal de corticoides,^{36, 147, 148} la reparació intrauterina del diafragma,^{11, 12} o l'oclusió de la tràquea fetal.^{108, 146, 149} Aquesta darrera estratègia es basa en l'observació d'una hiperplàsia pulmonar quan hi ha una obstrucció de la via aèria durant l'etapa fetal del desenvolupament, en el que es coneix com a síndrome CHAOS (*Congenital high airway obstruction syndrome*) i la seva potencial aplicació per a corregir la HP associada a la HDC (vegeu el subapartat d'Història de la teràpia fetal dins l'apartat 2.1.9.3 del Tractament Prenatal).

L'animal d'experimentació utilitzat principalment en models quirúrgics ha estat l'ovella, però s'ha treballat també en conills, gossos i primats. Per tal que el model reproduïxi fidelment el moment del desenvolupament pulmonar en què es produeix l'HDC en humans (fase pseudoglandular), cal conèixer l'equivalència en la gestació del model animal triat (Fig. 15). En el cas del conill, el dia 23 en què creem l'HD es correspon a la fase pseudoglandular.

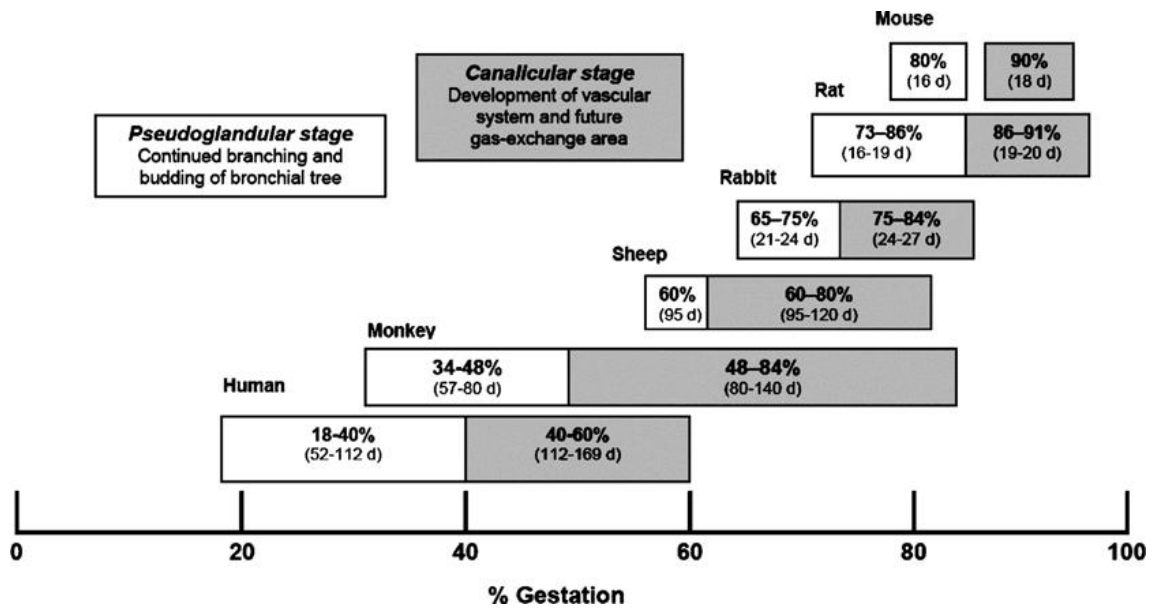


Figura 15. Desenvolupament pulmonar i correspondència amb els dies i percentatge de gestació en els diferents models animals. (<http://www.nature.com/mt/journal/v12/n1/extref/mt20051271x1.jpg>)

2.2.3.1. MODEL QUIRÚRGIC EN OVELLA

És el model quirúrgic d'HDC que primer es va utilitzar i que més s'ha emprat des de llavors. Es va desenvolupar els anys 60 com a part d'un seguit d'estudis fisiopatològics en la gestació. Com que la gestació de l'ovella és molt estable i tolera bastant bé l'agressió quirúrgica, es van fer models quirúrgics de diferents malformacions en el fetus d'ovella i se'n va estudiar la fisiopatologia. Es va demostrar que un defecte diafragmàtic creat quirúrgicament, permetia el pas del budell al tòrax i això es traduïa en una elevada mortalitat postnatal. El grup capdavanter va ser el del Dr. Michael Harrison a San Francisco, CA (EUA). El seu primer model va consistir en inflar un baló al tòrax d'un fetus d'ovella provocant una hipoplàsia pulmonar fetal amb elevada mortalitat neonatal.¹⁰³ Aquesta mortalitat no millorava en desinflar el baló postnatalment (simulant una correcció quirúrgica neonatal), però sí quan es desinflava prenatalment, demostrant que la hipoplàsia podia ser reversible i que s'acompanyava d'una millora de la supervivència.¹¹ Un cop demostrada la reversibilitat prenatal de la HP, es van crear models més semblants a l'HDC humana. Creant un defecte diafragmàtic quirúrgicament el dia 60 de gestació i reparant-lo sobre el dia 100 amb cirurgia fetal, es va comprovar que també s'aconseguia revertir els efectes de disminució i engruiximent de la vascularització pulmonar que es produeixen per l'HDC.¹² En

aquest moment es va començar a pensar que el tractament prenatal podia ser una nova estratègia terapèutica que canviaria radicalment el pronòstic d'aquesta malformació, i es va començar a desenvolupar la cirurgia fetal en humans.

Es van experimentar diferents modalitats de cirurgia fetal en l'ovella, com la comparació del tancament directe *vs* tancament amb una "sitja". Es tracta d'una bossa sintètica on s'allotja el contingut herniat fora de l'abdomen (un cop tancat el diafragma), suturada als marges de la laparotomia, per disminuir la pressió intraabdominal postoperatòria després de reparar el diafragma. Es va comprovar que totes dues tècniques tenien un efecte beneficiós sobre la hipoplàsia pulmonar¹⁵⁰ i que per tant, la pressió abdominal no era un factor determinant sobre la recuperació de la HP.

Per tal de caracteritzar les alteracions patològiques de l'HDC en el model oví, es van utilitzar diferents paràmetres per a avaluar la HP: raó pes pulmonar/pes fetal, densitat bronquial terminal mitjana, àrea de les capes mitjana i adventícia de l'artèria pulmonar, xarxa capil·lar (=àrea vascular/ àrea de teixit), gruix de les capes muscular i adventícia, etc.⁹ L'objectiu era trobar indicadors útils d'HP i HTP. Alguns d'aquests paràmetres van resultar ser bons indicadors i s'utilitzen també en altres models (raó pes fetal/pes pulmonar) i altres van ser-ho menys.

Un cop els mals resultats de la cirurgia fetal oberta en humans van fer abandonar aquesta via, l'ovella va ser de nou el banc de proves pel desenvolupament del tractament mitjançant l'oclusió traqueal (OT). Primer es va demostrar la utilitat d'aquesta tècnica en revertir les alteracions estructurals del pulmó amb HDC.¹⁵¹ Aquesta millora es va observar en tots els paràmetres de creixement i maduració pulmonar, i en el calibre arteriolar.¹⁴⁹

L'ovella, després va servir per a millorar la tècnica endoscòpica per a cloure la tràquea, primer amb clips,¹¹⁰ i posteriorment amb la tècnica que actualment es realitza en humans, conegut com a Fetendo-PLUG (taponament endoscòpic fetal) als EUA¹¹¹ i FETO (Fetal Endoscopic Tracheal Occlusion) a Europa.¹⁵²

Un altre aspecte que es va poder millorar a través d'aquest model fou la durada de l'oclusió. Per tal d'evitar la disminució de pneumòcits tipus II i de producció de surfactant que es va demostrar que causava l'OT de llarga durada,¹¹² es van assajar oclusions de menor durada (2 setmanes) que, sense aconseguir augments de volum tant notables, preservaven la funció d'intercanvi gasós, milloraven la compliància del pulmó i reduïen la HTP.¹⁵³ Aquest

concepte també ha estat traslladat a l'escenari d'OT en humans.

Així doncs, si la història de la teràpia fetal de l'HDC deu a algun model experimental el lloc on es troba, aquest és sens dubte, el model quirúrgic en ovella.

2.2.3.2. MODEL QUIRÚRGIC EN CONILL

L'antecedent d'aquest model és l'utilitzat per a l'estudi de la hipoplàsia pulmonar per oligoamni en fetus de conill amb l'ús de *shunts* amnioperitoneals. S'observà una disminució del pes del pulmó i de la raó respecte al pes del fetus, així com una disminució de l'expressió de les apoproteïnes del surfactant que sintetitzen els pneumòcits tipus II.⁵²

Als anys 90 es va descriure el primer model quirúrgic d'HDC en conill que demostrà ser superposable al model oví en la reproducció d'hipoplàsia pulmonar. La variable estudiada va ser el recompte alveolar radial.¹⁶⁷

El grup que més ha desenvolupat aquest model és el del Dr. Jan Deprest a Lovaina. Aquest és el model que hem utilitzat en el nostre estudi. Consisteix en la creació d'un defecte diafragmàtic esquerre al fetus el dia 23 de gestació (terme 31 dies), que es correspon a la fase pseudoglandular del desenvolupament pulmonar (Fig. 15), i els fetus s'extrauen el dia 30 per cesària. Aviat van poder demostrar en aquest model la hipoplàsia pulmonar i, també, que els efectes sobre el desenvolupament del pulmó no eren deguts al fet quirúrgic de la toracotomia (els fetus del grup *sham* tenien pulmons tan desenvolupats com els fetus control sans).^{154, 155} Per això van deixar de fer grups *sham* en els següents estudis.^{148,158,168}

Entre les variables que han estudiat prenatalment (entre els dies 25-29 de gestació) trobem el pes pulmonar, el pes fetal i la raó entre ambdós pesos. En la morfometria bronquioalveolar recullen: densitat bronquiolar terminal, interceptació lineal (mesura de la mida dels alvèols), gruix dels septes i densitat dels pneumòcits tipus II (immunofluorescència amb anticossos anti-SP-A). Les anàlisis demostren un retard del creixement i de la maduració dels pulmons del grup amb HDC ja identificable abans del terme de la gestació.¹⁵⁴

Pel que fa a la morfometria vascular, seleccionen 50 vasos perifèrics menors de 100 micres (els <60 micres corresponen al nivell intraacinar i els >60 i <100 al nivell preacinar) per ser els que contribueixen més a les resistències vasculars pulmonars. N'extrauen les variables:

diàmetre extern, diàmetre intern i gruix proporcional de la capa muscular. Aquesta darrera variable elimina els possibles biaixos deguts a vasoconstricció i vasodilatació.^{148, 155}

Els diàmetres intern (DI) i extern (DA) del vas són menors que als controls i el gruix proporcional del vas (GPA) és major que als controls. Aquests estudis s'han demostrat superposables al model oví pel que fa a les alteracions de la vascularització pulmonar associades a l'HDC. També s'ha comprovat que fent la cesària a partir del dia 27 es troben majors diferències amb els controls que si es fa prèviament.¹⁵⁵

El model quirúrgic de conill també ha estat utilitzat des del punt de vista terapèutic. L'oclusió traqueal causa un aprimament de la vascularització pulmonar perifèrica i per tant redueix les resistències pulmonars.¹⁵⁶ També s'ha estudiat l'efecte de l'administració prenatal de betametasona a la mare, que no augmenta la mida del pulmó però incrementa la vascularització intraacinar i en disminueix el gruix vascular. La combinació de l'administració de betametasona amb l'oclusió traqueal n'augmenta aquest efecte beneficiós.¹⁴⁸

Altres teràpies experimentades per a induir el creixement i la maduració pulmonar, han estat l'administració intraamniòtica de surfactant i dexametasona, amb resultats positius pel que fa a la disminució del glicogen i la col·làgena pulmonars que augmenten per l'HDC,¹⁴⁷ però sense una repercussió demostrada en la funció pulmonar postnatal.

Els principals avantatges del model en conill respecte al model oví són el seu temps gestacional més curt, disponibilitat tot l'any, major nombre de fetus per gestació, menor necessitat d'infraestructura i personal per a la seva cura i realització dels procediments, i menor cost.¹⁵⁴ Respecte als models murins el principal avantatge del conill és la major mida del fetus, que permet una cirurgia més còmoda tot i requerir més infraestructura i personal. I, sobretot, permet l'ús d'instruments i eines que difícilment es poden fer servir en animals de menor mida (p.ex. ecògraf, instrumental no microquirúrgic, etc).

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

3.1. HIPÒTESI

El model quirúrgic d'hèrnia diafragmàtica en fetus de conill reproduceix la insuficiència respiratòria neonatal, la hipoplàsia i la hipertensió pulmonar i, per tant, és semblant a l'HDC que presenten els pacients humans.

Aquest model d'HDC provoca un retard en el desenvolupament i la maduració pulmonar, que pot ser avaluat a partir de diferents paràmetres: hemodinàmics del flux vascular pulmonar, histopatològics dels arbres respiratori i arterial, histoquímics dels factors de creixement que són claus en cada etapa del desenvolupament, i funcionals de la oxigenació neonatal.

El retard del desenvolupament bronquioalveolar i vascular és harmònic, per la qual cosa existeix una correlació entre els paràmetres hemodinàmics, histopatològics, histoquímics i funcionals de la hipoplàsia pulmonar.

3.2. OBJECTIUS

1-Validar un model d'hèrnia diafragmàtica quirúrgica en fetus de conill que reproduceixi les característiques de la hipoplàsia i la hipertensió pulmonar dels pacients humans amb HDC.

2-Avaluar hemodinàmicament la circulació pulmonar fetal mitjançant eco-doppler en aquest model animal.

3-Caracteritzar les relacions entre diferents aspectes de la hipoplàsia pulmonar mitjançant:

- Paràmetres de vascularització arterial pulmonar, tant dinàmics com histopatològics
- Paràmetres de desenvolupament pulmonar, tant histopatològics com histoquímics
- Paràmetres clínics de benestar i oxigenació neonatal

4. **MATERIAL I MÈTODE**

4.1. MATERIAL

4.1.1. SUBJECTES D'ESTUDI

Per a aquest estudi experimental hem utilitzat fetus de conill neozelandès blanc. Les conilles prenyades de 19-20 dies de gestació foren subministrades per una granja cunicultora especialitzada.

Les principals característiques de la gestació d'aquesta espècie són:

- Alt índex de fertilitat
- Gestació múltiple (4-12 fetus) en un úter bicorne
- Temps de gestació curt (31 dies) i molt constant
- Gestació estable, amb baixa resposta dinàmica de l'úter a l'agressió quirúrgica.

Tres o quatre dies abans de la intervenció, les conilles gestants es traslladen al nostre centre per tal d'aclimatar-les abans del procediment quirúrgic. Romanen durant aquest temps en condicions estàndard de temperatura i llum en gàbies individuals amb accés lliure a pinso i aigua.

El nombre total de conilles gestants utilitzades ha estat de 40, i el de fetus ha estat de 133.

4.1.2. GRUPS D'ESTUDI

S'han dividit en dos grups de fetus:

- Hèrnia Diafragmàtica (HD): Es tracta de fetus als quals els creem una HD esquerra quirúrgicament. Són l'objecte del present estudi i constitueixen el grup problema.
- Control (C): Són fetus sans, germans de la mateixa conillada que el grup HD, als quals no se'ls realitza cap procediment quirúrgic.

4.1.3. CRITERIS D'INCLUSIÓ I EXCLUSIÓ

- S'han inclòs tots els fetus als quals s'ha realitzat tot el protocol quirúrgic assignat al seu grup i que eren vius en el moment d'obtenir-los mitjançant cesària.
- S'han exclòs els fetus morts abans de recollir-los (morts fetals o prenatals), i els que no presentaven herniació de les vísceres abdominals cap al tòrax a través de l'orifici creat.

4.1.4. INFRAESTRUCTURA I PERSONAL

El procediment quirúrgic i les determinacions clíniques s'han realitzat al quiròfan experimental de l'estabulari de la Universitat de Barcelona a l'Edifici Docent de l'Hospital de Sant Joan de Déu pels cinc membres de l'equip investigador. En cada procediment quirúrgic, almenys tres membres han estat necessaris simultàniament.

Les determinacions hemodinàmiques les ha realitzat un col·laborador del Grup de Recerca Fetal i Perinatal del Departament de Medicina Maternal-Fetal de l'Hospital Clínic-IDIBAPS al mateix quiròfan experimental.

L'emmagatzematge i processat de les mostres de laboratori s'ha realitzat al laboratori del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic per personal del propi Servei.

L'estudi histopatològic s'ha realitzat als laboratoris dels Serveis d'Anatomia Patològica dels Hospitals Clínic i Sant Joan de Déu per tres membres de l'equip investigador.

L'estudi immunohistoquímic s'ha realitzat al laboratori del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic, per membres d'aquest Servei.

4.2. MÈTODE

4.2.1. DISSENY EXPERIMENTAL

Estudi experimental sobre els efectes de l'HDC en un model animal en fetus de conill. El model reproduïx quirúrgicament una malformació congènita, l'hèrnia diafragmàtica, que tindrà com a conseqüència la hipoplàsia del pulmó ipsilateral. Es compara un grup d'animals

amb hèrnia diafragmàtica amb un grup de controls sans respecte a diferents variables d'estudi. El projecte va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal.

El procediment quirúrgic emprat per al model d'HD en fetus de conill és el publicat pel grup del Dr. Deprest a Lovaina.¹⁵⁴

4.2.2. METODOLOGIA

4.2.2.1. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

4.2.2.1.1. Primer procediment

En el 23è dia de gestació (equivalent al segon trimestre d'una gestació humana), tres membres de l'equip de cirurgia experimental realitzen la intervenció quirúrgica.

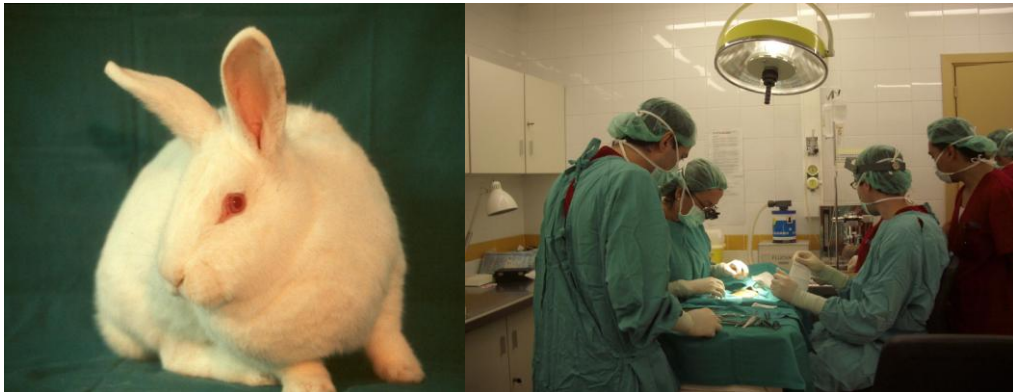


Figura 16. Conilla gestant neozelandesa blanca i quiròfan experimental amb l'equip investigador.

- Anestèsia:

S'inicia la inducció anestèsica amb l'administració de Ketamina (20mg/kg) i Clorpromazina (2,5mg/kg) via intramuscular. Igualment s'administra una dosi profilàctica d'antibiòtic (Cefazolina a 50mg/kg), un inhibidor de la dinàmica uterina (Depoprogesterona a 6µg/kg) i una dosi analgèsica de càrrega de Meloxicam (1mg/kg). Quan la conilla perd el to, es procedeix a rasurar l'abdomen, es col·loca sobre la taula d'operacions i es canalitza un accés venós a l'orella.

L'anestèsia de manteniment durant el procediment s'administra via inhalatòria amb Isoflurane (al 2,5% amb un flux d'O₂ d'1 litre/minut) i l'analgèsia, via endovenosa, amb Fentanil en bolus segons necessitats (0,005mg/kg).

- Laparotomia materna:

En condicions estèrils, es realitza una laparotomia mitjana. S'identifiquen les dues banyes uterines (l'úter de la conilla és bicorne) que poden contenir un nombre variable de fetus disposats en línia a cada banya (habitualment de 3 a 5 a cadascuna). S'exterioritza una de les banyes i es prenen les mesures hemodinàmiques prequirúrgiques dels fetus seleccionats amb un transductor lineal de 13 MHz aplicat a la paret uterina i connectat a l'aparell d'ultrasons (*Sonoline Antares*. Siemens Medical Systems, Malvern, PA. USA). Escollim el primer fetus per intervenir, que serà el de l'extrem ovàric.



Figura 17. Exteriorització de les banyes uterines i mesura de les variables hemodinàmiques amb ecografia transuterina.

- Histerotomia:

S'identifica prèviament per palpació de l'úter la localització del cap i coll del fetus (per tal que sigui aquesta zona la que se'ns presenti ràpidament després de la histerotomia), i la placenta (per tal d'evitar lesionar els vasos placentaris). Es practica una histerotomia transversa (1,5-2cm) evitant seccionar els vasos uterins que s'observen a la superfície. Es fixa la membrana amniòtica als marges de la histerotomia amb tres o quatre punts permetent això un tancament més estanc de la cavitat amniòtica en finalitzar el procediment.

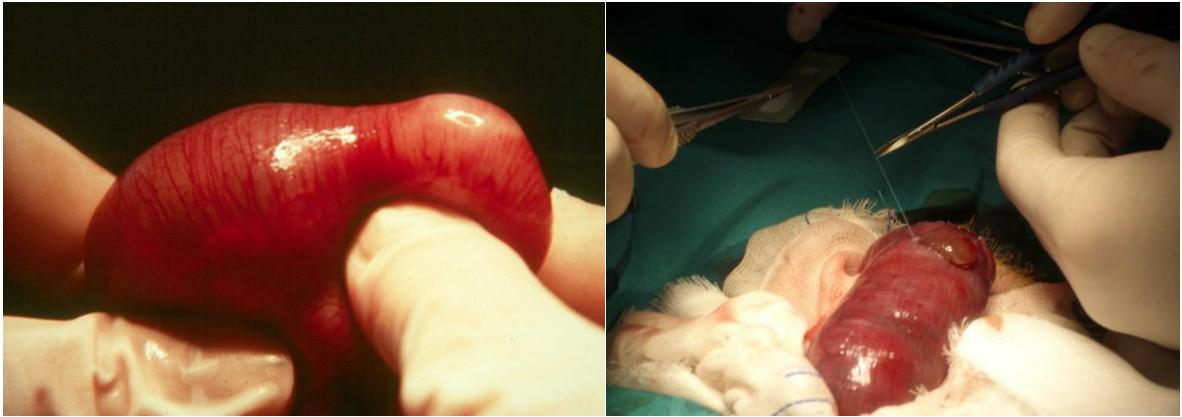


Figura 18. Localització del cap i coll del fetus, histerotomia transversa i sutura de les membranes amniòtiques a la paret uterina.

- Toracotomia fetal:

S'exterioritza amb cura el cap, el coll, l'extremitat superior esquerra i la major part del tòrax del fetus. La part exposada es manté humida amb irrigació amb sèrum fisiològic tebi durant tot el procediment. En tot moment s'evita l'exteriorització completa del fetus que provocaria un despreniment placentari per la falta de distensió del segment uterí que ha quedat buit, i la mort fetal.



Figura 19. Exteriorització del cap, el tòrax i l'extremitat superior esquerra.

Es practica una toracotomia esquerra baixa que permet un accés directe al diafragma disminuint la possibilitat de lesió al pulmó. S'identifica la línia d'unió entre el centre frènic (part tendinosa) i la perifèria muscular diafragmàtica. Sobre ella es fa una incisió àmplia per

tal d'aconseguir una bona herniació, traccionant el diafragma amb una pinça. Aquest és un punt delicat de la cirurgia atès que si es lesiona la càpsula hepàtica subjacent, la mort del fetus és gairebé segura. Sense esperar que el contingut abdominal ascendeixi al tòrax per l'orifici creat, es tanca la toracotomia en un sol pla amb un o dos punts simples irreabsorbibles de 6/0. El fetus es reintrodueix a la cavitat amniòtica i es tanca la histerotomia junt amb les membranes amniòtiques amb una sutura contínua entrellaçada de seda 4/0. Abans de finalitzar la sutura fem una amnioinfusió amb sèrum fisiològic tebi, restaurant el to del sac amniòtic.

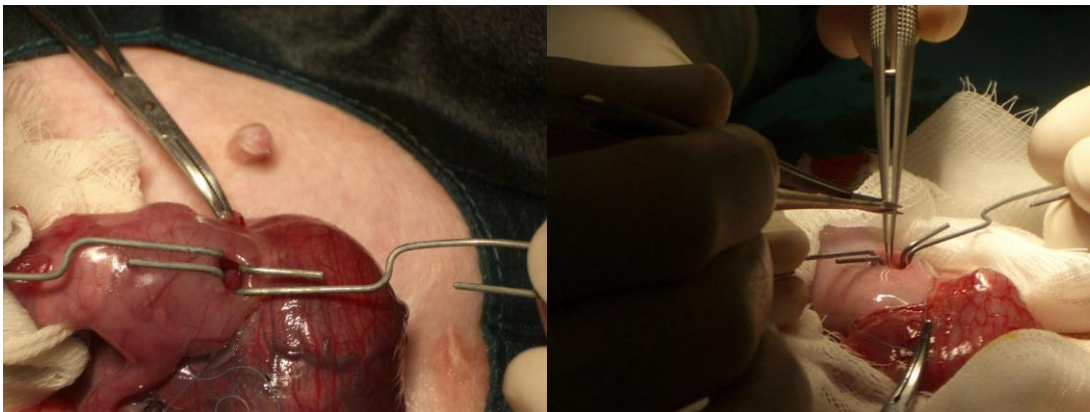


Figura 20. Toracotomia, exposició del diafragma i apertura del mateix amb una pinça.

Realitzem aquest procediment en tres o quatre fetus germans, començant pels extrems i deixant fetus sans intercalats entre els operats. La laparotomia es tanca en dos plans amb sengles sutures contínues.

Acabada la intervenció la conilla es deixa reposar a la seva caixa de transport i en verifiquem la recuperació de la consciència, del to muscular i l'absència d'estrès abans de traslladar-la a la seva gàbia. L'endemà de la intervenció, la conilla rep una altra dosi de Meloxicam.

4.2.2.1.2. Segon procediment

Seguint el mateix protocol que en el primer procediment, el dia 28 de la gestació tres membres de l'equip realitzen el segon procediment. Inicialment es valora la supervivència dels fetus intervinguts mitjançant una ecografia transabdominal. Si cap d'ells ha sobreviscut

es procedeix a sacrificar la mare amb sobredosi de pentotal intravenós. En cas d'observar fetus vius amb hèrnia diafragmàtica es practica una laparotomia mitjana iterativa. Es prenen mesures hemodinàmiques amb ecografia-doppler sobre la paret uterina, del fetus operat i del control corresponent.

D'entre els fetus viables la meitat són sotmesos a una segona cirurgia fetal que consisteix en realitzar una oclusió traqueal extrínseca mitjançant una lligadura. Aquests individus són l'objecte d'estudi d'una altra tesi doctoral dins la mateixa línia d'investigació.

4.2.2.1.3. Tercer procediment

Amb el mateix protocol prequirúrgic i quirúrgic que en els anteriors procediments, el dia 30 de la gestació (a terme 31 dies), es prenen novament mesures hemodinàmiques amb ecografia-doppler de tots els subjectes (controls sans i fetus sotmesos a hèrnia diafragmàtica).

A continuació s'extrauen tots els fetus i es sacrifica la mare mitjançant secció de la vena cava inferior.

4.2.2.2. RECOLLIDA DE MOSTRES

Tots els fetus són pesats. Es registra l'aparença, color i mobilitat per a constatar la seva supervivència en el moment de l'extracció. Es situen sota una font de calor i d'oxigen i es mesura la saturació d'O₂ (SaO₂) i la freqüència cardíaca amb un pulsioxímetre (Nellcor N-595) situat al voltant del coll. Aquesta mesura es repeteix als 5, 20, 40 i 60 minuts. Els fetus que no han mort espontàniament es sacrifiquen a l'hora de vida amb una sobredosi de pentotal intraperitoneal.



Figura 21. Aspecte del fetus postextracció, amb la toracotomia suturada. Es col·loquen els fetus nounats sota una font de calor i oxigen, i es realitza la pulsioximetria.

Es practica una esternolaparotomia mitjana amb extensió subcostal bilateral. Es registren quines vísceres s'han herniat cap al tòrax, en quina mesura i l'aspecte del pulmó.

S'extrauen els dos pulmons separatament i es pesen. S'introdueixen en tubs d'Eppendorf i es congelen per immersió en nitrogen líquid. Les mostres es conserven a -70°C posteriorment.

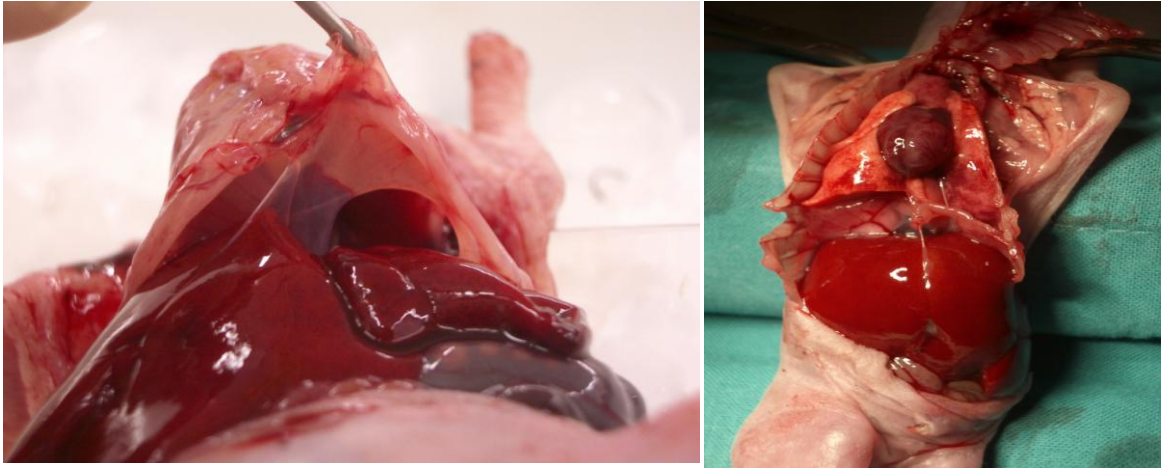


Figura 22. Esquerra: Orifici diafragmàtic amb lòbul hepàtic esquerre herniat. Dreta: Esternolaparotomia mitjana visualitzant el contingut abdominal i toràcic. S'observa un pulmó esquerre d'aspecte hipoplàstic.

4.2.2.3. VARIABLES D'ESTUDI

HEMODINÀMIQUES:

- De resistències pulmonars:
 - Índex de pulsilitat (PI).
 - Pic màxim de flux revers diastòlic (PEDRF).
 - Velocitat sistòlica màxima (PSV).
- De perfusió pulmonar:
 - Fracció sanguínia en moviment (FMBV).

CLÍNQUES

- De benestar fetal
 - Oxigenació neonatal (SaO_2)
 - Freqüència cardíaca (FC)
- Mortalitat neonatal

HISTOPATOLÒGIQUES

- Generals
 - Raó pes pulmonar/pes fetal (PP/PF)
- Morfomètriques:
 - Bronquioloalveolars: Recompte alveolar radial (RAC)
 - Arteriolars pulmonars: Gruix de la paret arteriolar (GPA).

IMMUNOHISTOQUÍMIQUES

- Determinació de VEGF, CD44v6, TTF1 i TGF-3 β

4.2.2.4. MESURA DE LES VARIABLES

4.2.2.4.1. Estudis hemodinàmics

Es realitza a l'inici de cadascun dels tres procediments (dies 23, 28 i 30 de gestació) per un obstetra, col·laborador de l'equip investigador, expert en ecografia fetal. Mitjançant un ecògraf-doppler pulsat d'alta resolució (*Sonoline Antares*, Siemens Medical Systems, Malvern, PA. USA), en la visió transversa de les quatre cambres cardíaques, s'identifica l'artèria intrapulmonar contralateral a l'HDC del fetus i es mesura l'ona de pols.

Les mesures hemodinàmiques pulmonars es prenen, com en la practica clínica, en l'artèria contralateral per la dificultat de visualitzar la del pulmó ipsilateral, atesa la seva mida petita, desplaçada i comprimida per l'HDC. Per aquest motiu també s'ha realitzat així en el nostre model.

Es registren els següents índexs fluxomètrics a partir de tres o més ones de pols amb un angle d'isonació proper a 0° i amb un filtre de 70 Hz per evitar artefactes, amb el software d'anàlisi MATLAB 7.5 (TheMathWorks, Natick, MA. USA) que incorpora l'equip:

- Índex de pulsilitat de l'artèria pulmonar (PI: *Pulsatility index*)
- Pic màxim de flux revers diastòlic (PEDRF: *Peak of early diastolic reversed flow*)
- Velocitat sistòlica màxima del flux vascular (PSV: *Peak of maximum systolic speed flow*)
- Fracció sanguínia en moviment (FMBV: *Fractional moving blood volume*)

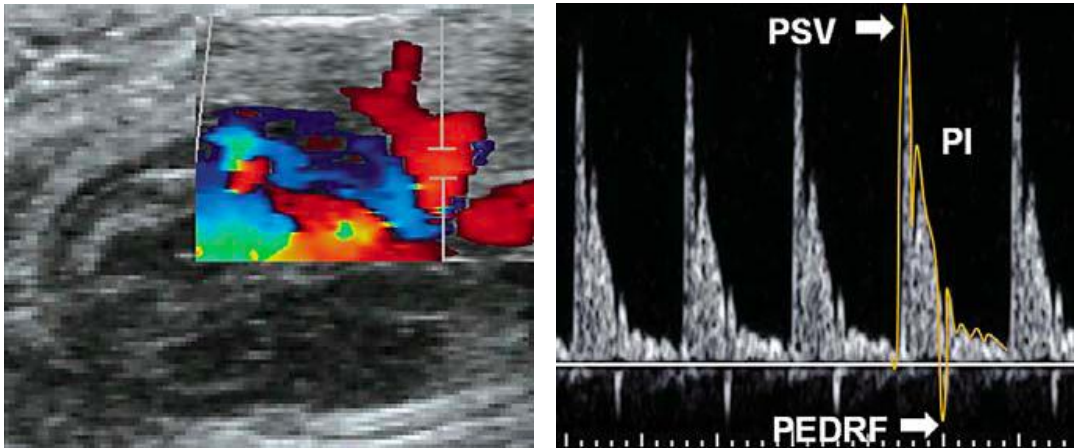


Figura 23. Esquerra: Doppler pulsat sobre l'artèria intrapulmonar. Dreta: Traçat de l'ona de pols amb els índexs analitzats: PSV (velocitat sistòlica màxima); PI (índex de pulsatilitat); PEDRF (pic màxim de flux revers diastòlic).¹⁶⁶

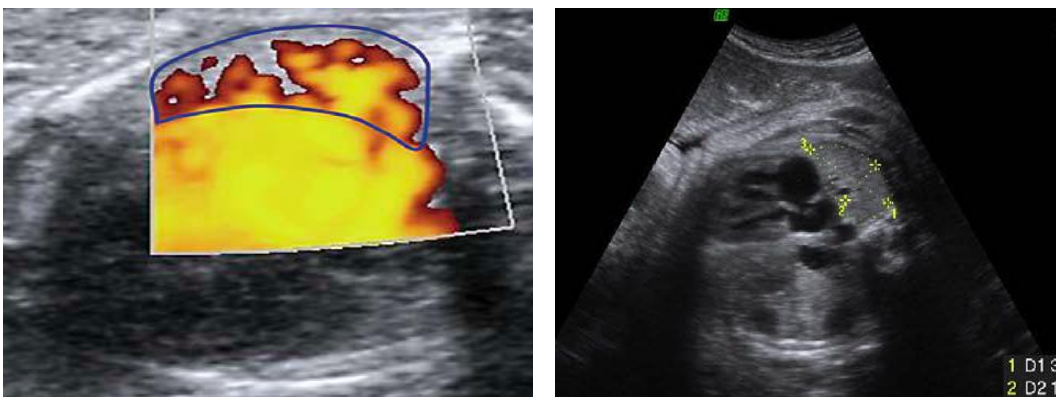


Figura 24. Esquerra: Power-doppler de l'àrea d'interès (línia blava) on s'estima la perfusió pulmonar amb la FMBV (fracció sanguínia en moviment). Dreta: Imatge del pulmó i del cor en la visió estàndard de les quatre cambres cardíques.¹⁶⁶

4.2.2.4.2. Estudis clínics neonatals

Es registra la reactivitat (molt reactiu; poc reactiu; arreactiu), la mobilitat (moviments vigorosos; moviments dèbils; immòbil), el color (rosat, blavós, gris) per a constatar la seva supervivència en el moment de l'extracció. Es situen els fetus immediatament sota una font de calor i d'oxigen i es mesura la saturació d'O₂ i la frequència cardíaca amb un pulsioxímetre (Nellcor N-595) situat al voltant del coll. Aquesta mesura es repeteix als 5, 20, 40 i 60 minuts.

4.2.2.4.3. *Estudis histopatològics*

4.2.2.4.3.1. Generals

Es registren els pesos d'ambdós pulmons de cada fetus i es calcula la variable Pes pulmonar/pes fetal (PP/PF).

Els pulmons esquerres congelats es tallen per l'hil de forma que el tall mostri la major superfície d'ambdós lòbuls (superior i inferior). De cada pulmó es realitzen seccions que són fixades i tenyides amb hematoxilina/eosina. Les preparacions s'examinen amb un microscopi òptic (40x-60x). La determinació de les dades morfomètriques es realitza per tres observadors prenent les mostres de forma aleatòria.

4.2.2.4.3.2. Morfometria bronquioloalveolar

- Recompte alveolar radial (RAC *Radial alveolar count*):

És un índex numèric de la quantitat d'alvèols de cada lobulet respiratori. És un indicador del grau d'hipoplàsia pulmonar.

En cada preparació, es localitzen almenys deu bronquíols respiratoris. Des del punt de transició de l'epiteli cilíndric al respiratori en cadascun d'ells, es traça la línia més curta fins al septe interlobular més proper (aquest es correspon a la vena interlobular o la superfície pleural més pròximes). Es compta el nombre de septes alveolars que travessa aquesta línia. Si la línia passa per la paret entre dos alvèols, se'n compta només un. Si un recompte d'alvèols és superior a vint, cal assumir que no s'està prenent el septe d'aquest lobulet i es rebutja la mesura. De cada preparació s'ha realitzat la mitjana aritmètica de tots els RAC mesurats (mínim deu recomptes).

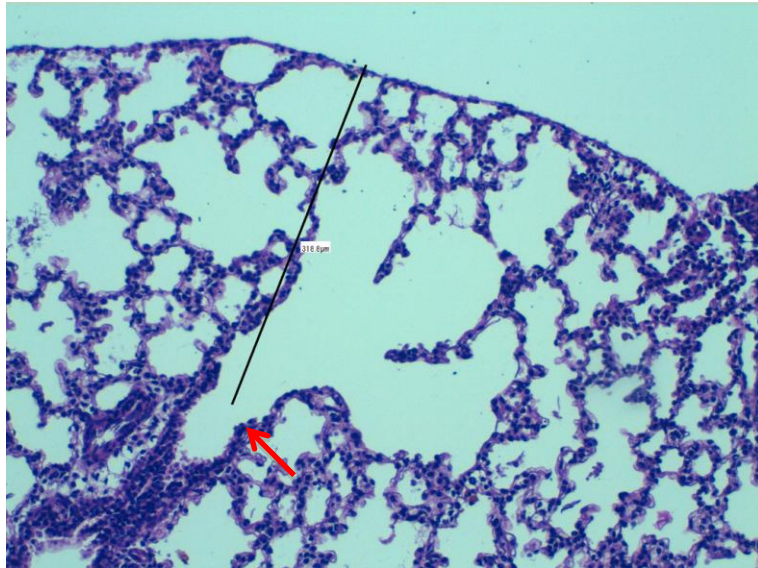


Figura 25. Morfometria bronquioloalveolar. Recompte alveolar radial. Línia des del límit del bronquíol respiratori fins al punt més proper de la pleura visceral. Fletxa vermella senyalant el canvi d'epiteli. El RAC és cinc.

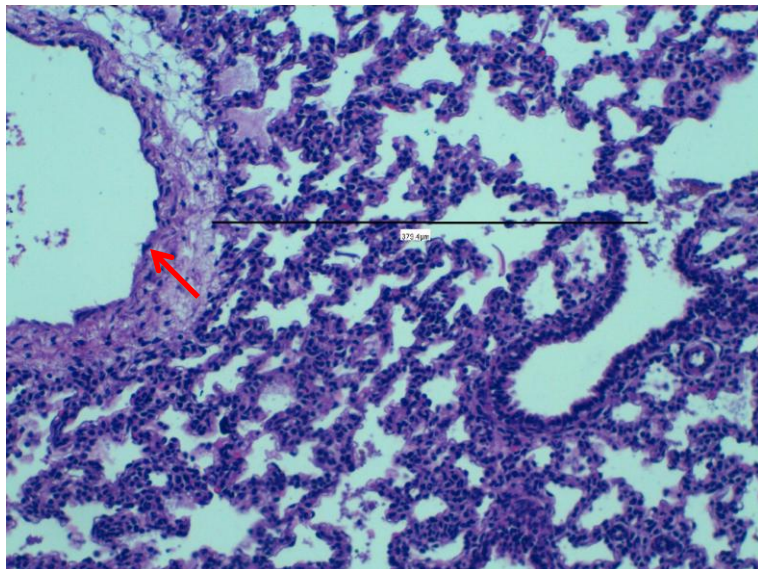


Figura 26. Morfometria bronquioloalveolar. Recompte alveolar radial. Línia fins el septe interlobular més proper (es correspon amb la vena interlobar en aquest cas: fletxa vermella). El RAC és quatre.

4.2.2.4.3.3. Morfometria arteriolar pulmonar

En cada preparació, es mesuren almenys 50 arterioles menors de 150µm de diàmetre. Es recullen les següents mesures:

- Diàmetre extern (DE)
- Diàmetre intern (DI)

Amb aquests índexs es calcula la variable:

- Gruix de la paret arteriolar (GPA) = $(DE-DI)/DE \times 100$

En aquelles arterioles que tinguin una secció esbiaixada es pren el diàmetre menor. En cas que el diàmetre major sigui més del doble del menor es rebutja l'arteriola.

De cada preparació es realitza la mitjana aritmètica de tots els GPA.

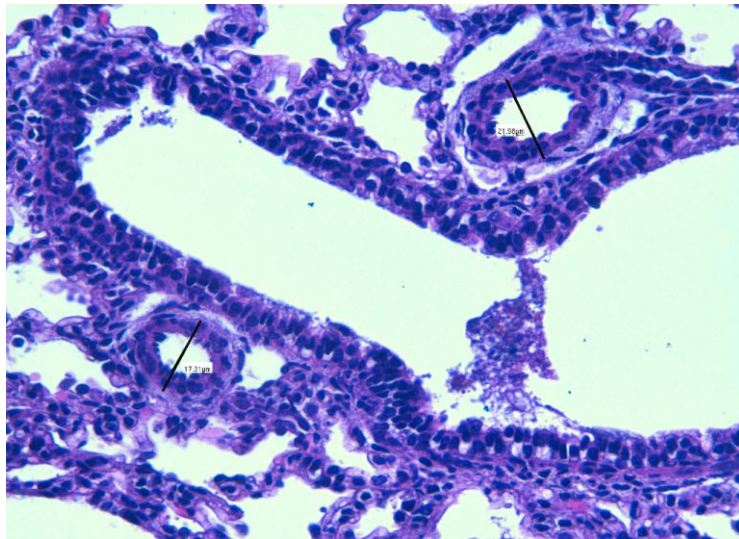


Figura 27. Morfometria arteriolar pulmonar. Mesura dels diàmetres externs de dues arterioles, prenent el diàmetre menor i de forma perpendicular a la paret fins al límit de la muscular amb l'adventícia. (60x)

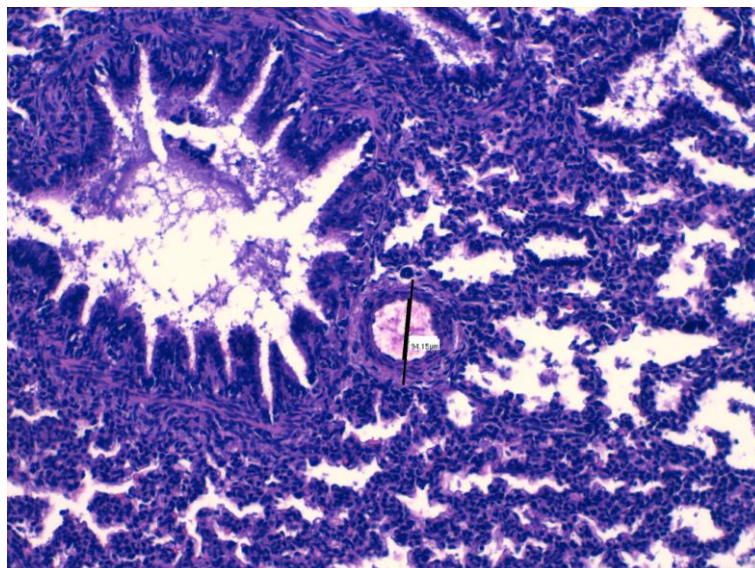


Figura 28. Morfometria arteriolar pulmonar. Mesura dels diàmetres intern i extern d'una arteriolar en el mateix punt (apareixen superposades ambdues mesures). (60x)

4.2.2.4.4. *Estudis immunohistoquímics*

Han estat realitzats per patòlegs experts del Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona. S'han fet estudis immunohistoquímics per a determinar l'expressió d'alguns factors de creixement representatius de cada fase del desenvolupament embriològic pulmonar (vegeu la Taula 2 de l'apartat 2.1.3.2. Embriologia Pulmonar). Si bé inicialment preteníem estudiar FGF-10, TTF-1, TGF- β 3, VEGF i PDGF-A, degut a la manca de sets comercials d'anticossos per a diferents factors de creixement de conill i a l'escassa reactivitat creuada d'un bon nombre d'anticossos anti-rata o anti-ratolí respecte a antígens de conill, finalment només s'ha pogut realitzar algun estudi del VEGF, CD44v6 (proteïna relacionada amb l'organogènesi), TTF1 i TGF- β 3. S'han fet tant estudis immunohistoquímics com Western blot.

- Estudi immunohistoquímic (IHQ):

Els pulmons dels dos grups son fixats en una solució d'etanol (95%) i àcid acètic (1%). Les mostres son incloses en parafina i es preparen talls de 3 μ m de gruix. Després del desenvolupament de color enzimàtic, els talls són tenyits amb hematoxilina i visualitzats al microscopi. Les seccions de pulmó es monten sobre portaobjectes tractats amb poli-L-lisina. Després d'hidratació en concentracions decreixents d'etanol, s'exposen els epítops i es bloqueja l'activitat peroxidasa endògena amb incubació de les seccions en peròxid d'hidrogen al 1%. S'incuben les seccions amb l'anticòs primari (aquell que s'adreça a la proteïna objecte d'estudi, p. ex. TTF-1) durant tota la nit a 4°C. Després de rentar amb PBS (solució tamponada amb fosfat) i aplicar l'anticòs secundari marcat amb biotina (aquell que reconeix la part no específica de l'anticòs primari), s'amplifica el senyal i es revela la reacció. D'aquesta manera s'han analitzat TTF-1, TGF- β 3, CD44v6 i VEGF.

- Estudi Western blot (Wb)

S'homogenitzen les mostres de pulmó i es col·loquen en les matrius d'electroforesi (de gel de poliacrilamida dodecil sulfat sòdic: SDS-PAGE) que permetran separar les proteïnes pel seu pes molecular o el seu punt isoelèctric. Un cop completada l'electroforesi, es col·loca sobre una membrana de nitrocel·lulosa i s'hi afegeix el primer anticòs, se'n renta l'excés i s'hi afegeix el segon. Aquest segon anticòs, que

reacciona amb el primer, va lligat a un fluoròfor (enzim fluorescent en exposar-lo a la llum). Així s'obtenen imatges de luminescència que són fotografides i analitzades amb el programa ImageJ 1.45s (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Aquest software mesura la densitat integrada de senyal dels píxels corresponents a cada banda d'electroforesi. Es repeteix la mesura 5 cops i se n'obté la mitjana. El valor màxim de densitat integrada de cada matriu s'ha usat com a referència (100%) per a les altres bandes, donant com a resultat un percentatge proporcional de densitat integrada. D'aquesta forma s'ha analitzat el TGF- β 3.

4.2.2.5. CRITERIS D'EXCLUSIÓ DE LES MOSTRES

S'han exclòs del present estudi les mostres segons el següents criteris:

- Mostra mal identificada
- Mostres artefactades (si fan impossible la morfometria).

4.2.2.6. ANÀLISI ESTADÍSTICA

A partir de les variables obtingudes de la recollida de dades hem realitzat l'anàlisi corresponent amb el paquet estadístic *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS 16.0; SPSS Inc., Chicago, IL. USA) i Excel 2007.

- S'han avaluat estadísticament les diferències entre les variables dels grups control (C) i hèrnia diafragmàtica (HD)
- S'han avaluat qualitativament de forma individual aquells casos dels quals disposàvem de totes les variables
- S'ha avaluat l'associació entre les variables hemodinàmiques, histològiques i immunohistoquímiques en cadascun dels grups

S'han utilitzat tests tant paramètrics (t de Student) com no paramètrics (U de Mann-Whitney) per a la comparació de mitjanes de les variables quantitatives i la r de Pearson per a les correlacions. S'ha acceptat com a significativa la probabilitat $p < 0,05$.

5. RESULTATS

5.1. RENDIMENT

Es van intervenir 40 conilles gestants, de les quals 38 van superar tot el procediment. A un total de 133 fetus se'ls practicà una hèrnia diafragmàtica el dia 23 de gestació (primer procediment). D'aquests, 36 van sobreviure fins al dia 28 (2n procediment), 13 dels quals van ser estudiats hemodinàmicament en algun moment de la gestació (dies 28 o 30). La mortalitat global va ser del 81%. Es van obtenir nou nounats vius amb HD i tots ells foren estudiats histopatològicament. En tots els casos es van registrar dades de vitalitat neonatal. En tres es van registrar dades d'oxigenació i/o freqüència cardíaca. La resta, o bé estaven agònics o eren massa petits pels registres, i el pulsioxímetre no captava ona de pols.

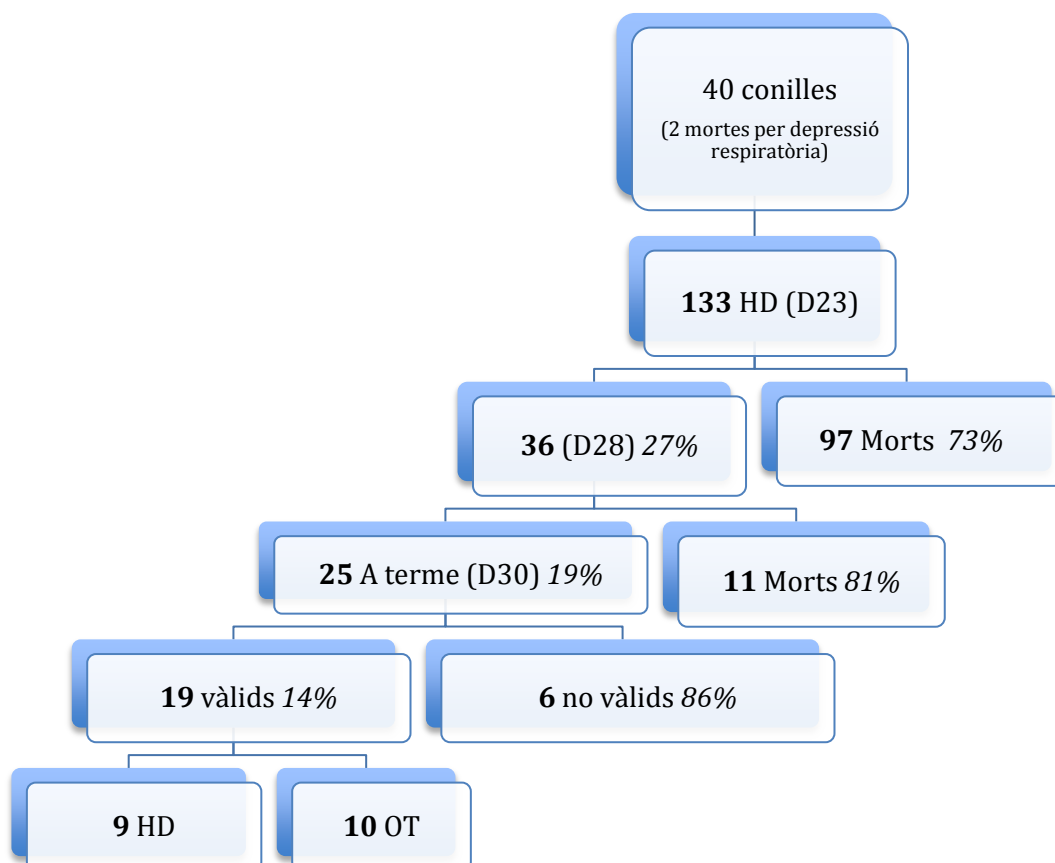


Figura 29. Evolució dels fetus intervinguts quirúrgicament. HD: hèrnia diafragmàtica; OT: oclusió traqueal. Xifres de les caselles: **nombre absolut de casos per grup**; (D dia del procediment); *percentatge acumulat*.

Incloent el recompte final dels dos grups, en 20 controls (C) i en 13 casos del grup d'hèrnia diafragmàtica (HD) s'ha realitzat l'estudi hemodinàmic. L'estudi clínic complet s'ha pogut realitzar a 3 HD i a 8 controls germans. El nombre de casos vàlids per a l'estudi histopatològic ha estat 9 dins el grup d'HD i 17 dins el grup C.

A continuació es presenta en forma de taula el resum dels estadístics de les variables: mitjana (\bar{x}), desviació estàndard (σ) i rang (**R**); i els diagrames de caixes corresponents a la comparació entre els grups hèrnia diafragmàtica (HD) i control (C), per a les variables en què s'han trobat diferències significatives.

5.2. ESTUDI HEMODINÀMIC

S'han analitzat les variables fluxomètriques de 13 fetus del grup HD i 20 del grup C. Per a les correlacions entre aquestes variables i les dels estudis histopatològic i clínic, però, només hem inclòs 3HD i 5C que són els que s'han pogut avaluar i identificar el dia 30 de gestació. Els resultats de l'anàlisi de les resistències vasculars pulmonars inclouen l'índex de pulsatilitat (PI), el pic màxim de flux revers diastòlic (PEDRF) i la velocitat sistòlica màxima de flux vascular (PSV). El resultat de l'anàlisi de la perfusió pulmonar el representa la fracció sanguínia en moviment (FMBV).

5.2.1. INDICADORS DE RESISTÈNCIA PULMONAR

5.2.1.1. ÍNDEX DE PULSATILITAT (PI)

El PI és significativament major en el grup HD respecte al grup C.

PI	C	HD	U Mann-Whitney
	5,22	8,08	<i>p 0,0001</i>
σ	1,07	2,90	
R	4,18	10,85	

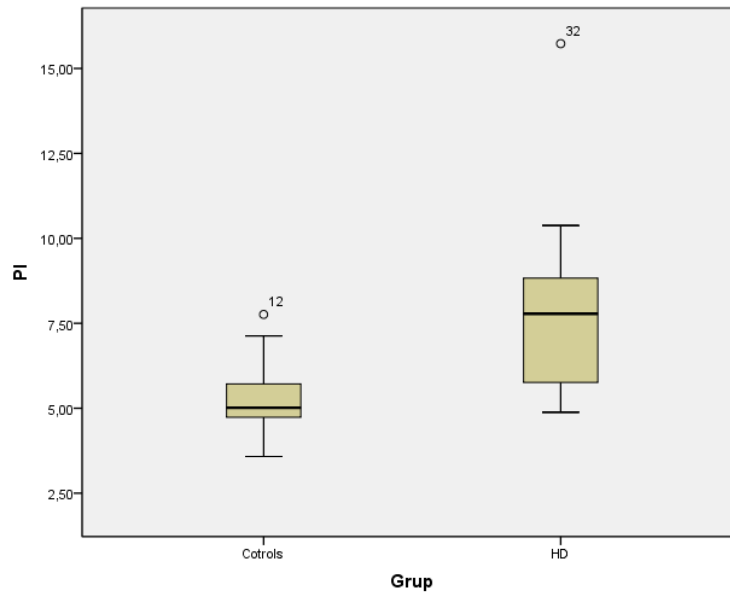


Figura 30. Diagrama de caixes de la variable PI

5.2.1.2. PIC MÀXIM DE FLUX REVERS DISTÒLIC (PERDF)

Les comparacions dels valors de PEDRF entre els dos grups no han demostrat diferències significatives.

5.2.1.3. VELOCITAT SISTÒLICA MÀXIMA (PSV)

Les comparacions dels valors de PSV entre els dos grups no han demostrat diferències significatives.

5.2.2. INDICADOR DE PERFUSIÓ PULMONAR

5.2.2.1. FRACCIÓ SANGUÍNIA EN MOVIMENT (FMBV)

L'FMBV és significativament menor el grup HD respecte al C.

FMBV	C	HD	U Mann-Whitney
	23,04	14,45	<i>p 0,0001</i>
σ	2,10	4,83	
R	8,61	16,44	

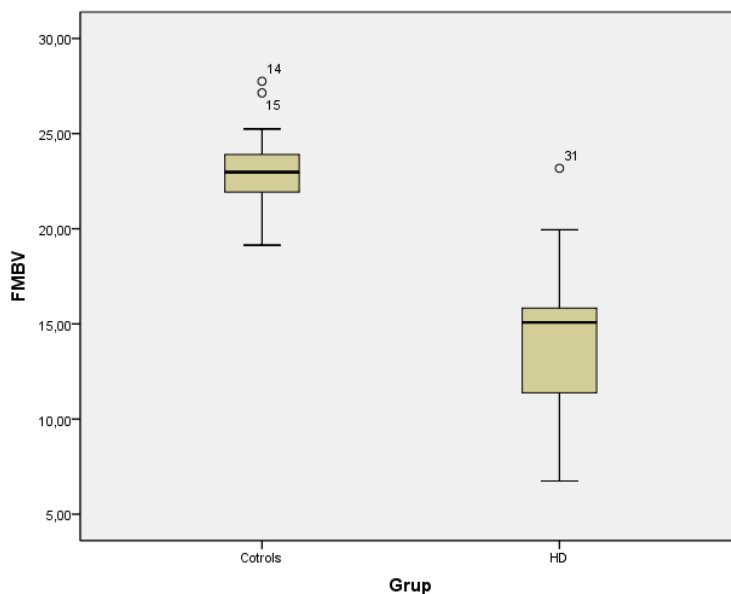


Figura 31. Diagrama de caixes de la variable FMBV

5.3. ESTUDI CLÍNIC

5.3.1. EXPLORACIÓ DE LA VITALITAT NEONATAL

Aquest apartat recull els resultats de mesures subjectives de vitalitat com el color, la reactivitat i la mobilitat, i altres d'objectives com la mortalitat i les mesures d'oxigenació i freqüència cardíaca.

Mentre que els casos del grup C presentaven al néixer una coloració rosada, estaven reactius i amb moviments vigorosos, vuit dels nou casos (89%) del grup HD presentaven, ja en fer la cesària i durant els següents 60 minuts, una coloració gris, estaven arreactius i amb moviments espontanis nuls o molt lents. L'únic cas del grup HD que estava més actiu, amb millor coloració i reactivitat, presentava a la necròpsia una herniació molt escassa de contingut abdominal al tòrax per un orifici petit.

5.3.2. OXIGENACIÓ NEONATAL I FREQUÈNCIA CARDÍACA

Vam recollir els resultats de 8 cotrols i 3 casos d'hèrnia diafragmàtica. La saturació d'O₂ (SaO₂) i la freqüència cardíaca (FC) mitjançant pulsioximetria van ser impossibles d'obtenir en la resta, perquè la senyal era indetectable pel compromís hemodinàmic sever que presentaven. Així, la majoria dels nounats amb hèrnia diafragmàtica eren moribunds

immediatament després de la cesària, i al llarg de la primera hora postnatal no es va aconseguir cap mesura del pulsioxímetre en 6 dels 9 casos d'HD (66%). La següent taula representa els resultats obtinguts. La petita mida de la mostra no permet una anàlisi estadística.

Taula 5. Resultats de l'oximetria i freqüència cardíaca, junt als valors de la morfometria cas a cas. S'inclouen a la taula aquests tres casos d'HD (*) perquè eren fetus vius, malgrat que només en un es van poder registrar una dada de saturació d'O₂, i en els altres dos cap de les dades.

Grup	SaO₂	FC	LBWR	RAC	GPA
HD*	61	--	1,73	2,91	45,46
HD	55	41	1,60	2,83	47,12
HD	100	150	1,65	2,27	38,88
HD*	--	--	0,76	2,92	48,09
HD*	--	--	1,04	3,30	50,00
C	91	--	2,46	4,08	41,80
C	100	190	2,80	3,67	48,98
C	87	59	2,32	4,58	46,61
C	94	170	2,20	5,46	39,51
C	84	160	--	5,20	45,44
C	74	168	0,99	4,10	36,86
C	90	155	1,87	3,83	44,67
C	96	85	2,09	4,60	49,35

5.3.3. MORTALITAT NEONATAL

La mortalitat neonatal del grup HD en la primera hora va ser del 66% (6/9), mentre que només va morir un individu del grup C (1/8: 12,5%).

5.4. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC

S'han estudiat variables generals i morfomètriques com a indicadors d'hipoplàsia pulmonar.

5.4.1. GENERAL

5.4.1.1. PES FETUS

Els pesos dels fetus en néixer no presenten diferències estadísticament significatives, indicant que no hi ha retràs de creixement del fetus després de la toracotomia.

Pes fetus	C	HD	U Mann-Whitney
	39,83	38,88	<i>p 0,7</i>
σ	6,94	6,19	
R	24,30	16,30	

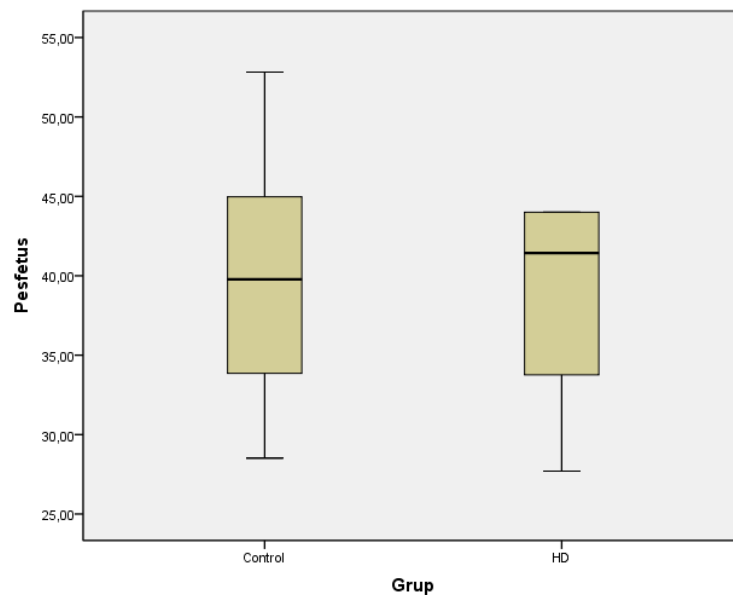


Figura 32. Diagrama de caixes de la variable Pes fetus

5.4.1.2. PES PULMÓ

Els pesos dels pulmons esquerres (costat de la hèrnia diafragmàtica) d'ambdós grups presenten diferències estadísticament significatives sent menors en el grup de hèrnia diafragmàtica.

Pes pulmó	C	HD	U Mann-Whitney
	0,38	0,17	<i>p 0,0001</i>
σ	0,08	0,06	
R	0,31	0,20	

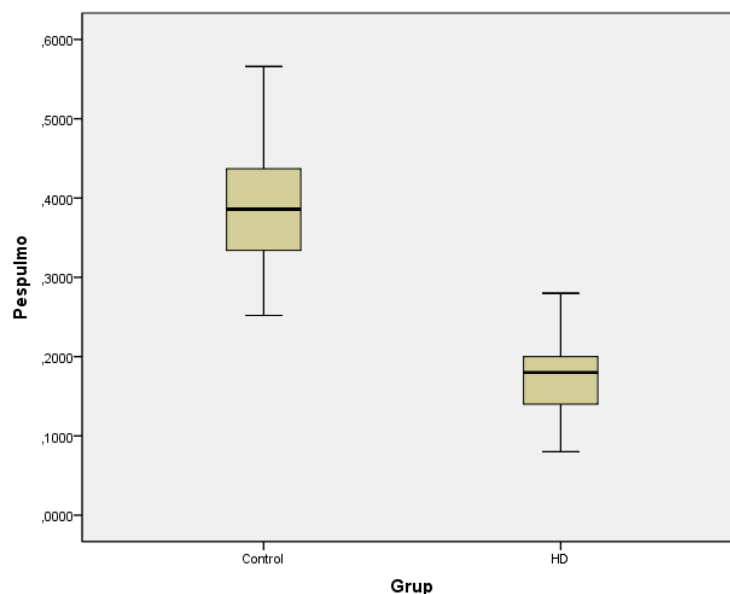


Figura 33. Diagrama de caixes de la variable Pes pulmó

5.4.1.3. RAÓ PES PULMÓ/PES FETUS (LBWR)

Es calcula dividint el pes dels dos pulmons entre el pes corporal (Pes pulmó/Pes fetus=LBWR). En comparar aquesta variable confirmem que efectivament hi ha diferències entre els dos grups (U de Mann-Whitney *p 0,0001*), sent menor en el grup HD on aquesta raó és gairebé la meitat que en el grup C.

LBWR	C	HD	U Mann-Whitney
	2,35	1,27	<i>p 0,0001</i>
σ	0,38	0,38	
R	1,55	0,97	

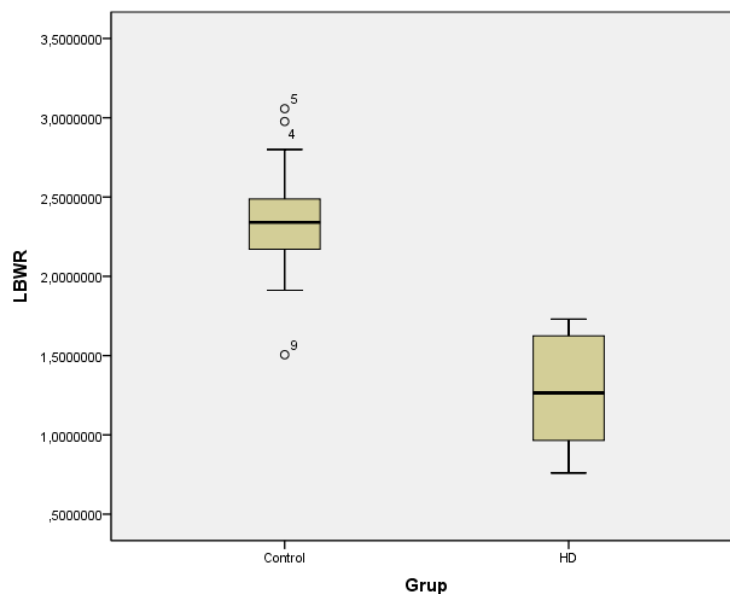


Figura 34. Diagrama de caixes de la variable Pes pulmó / Pes fetus

5.4.2. MORFOMETRIA

S’han analitzat paràmetres morfomètrics indicadors del desenvolupament bronquioloalveolar i de maduració vascular pulmonar.

5.4.2.1. RECOMPTE ALVEOLAR RADIAL (RAC)

Sobre les mostres dels 17 controls i 9 hèrnies diafragmàtiques s’han recomptat un total de 186 i 92 bronquíols respiratoris respectivament (10 o més en cada mostra).

La comparació d’aquesta variable entre ambdós grups demostra una disminució estadísticament significativa del RAC en el grup HD.

RAC	C	HD	t Student
	4,70	2,96	<i>p 0,0001</i>
σ	2,42	1,56	
R	11	8	

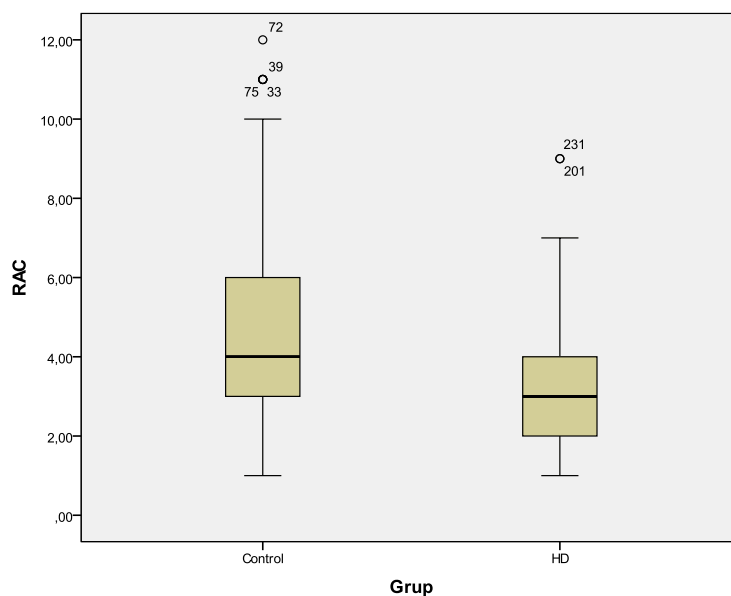


Figura 35. Diagrama de caixes de la variable RAC

5.4.2.2. MORFOMETRIA ARTERIOLAR

Sobre els 9 individus amb hèrnia diafragmàtica i 17 controls, s'han realitzat respectivament 435 i 812 mesures (al voltant de 50 per mostra i individu) de les següents variables:

- 1. Diàmetre intern (DI)**
- 2. Diàmetre Extern (DE)**
- 3. Gruix de la paret arteriolar (GPA)**

A partir de les mesures dels diàmetres intern (DI) i extern (DE) de la capa muscular de les arterioles es calcula el gruix d'aquesta capa en percentatge (GPA): $(DE-DI)/DE \times 100$.

Aquestes mesures adopten una distribució normal amb les gràfiques Q-Q, tot i que el test de Kolmogorov-Smirnov no permetia acceptar la normalitat en totes les mesures dels DI, DE i GPA. Amb assessorament estadístic expert, s'ha assumit la normalitat i s'han aplicat tests paramètrics en conseqüència.

El resum dels estudis estadístics dels diàmetres intern i extern es presenta en les següents taules:

DI	C	HD	t Student
	15,08	15,32	<i>p 0,073</i>
σ	14,50	15,09	
R	119,80	140	

DE	C	HD	t Student
	26,69	28,93	<i>p 0,79</i>
σ	20,66	21,66	
R	155,60	198,30	

Les mitjanes de les mesures dels grups C i HD són homogènies en quant al seu diàmetre extern (DE) i llum vascular (DI), amb $p=0,073$ i $p=0,79$ respectivament (t Student).

Pel que fa al GPA, trobem una diferència significativa ($p<0,001$; t d'Student) en la comparació de mitjanes entre els grups C i HD, amb un valor estimat de 3,85 (IC 95% de 2,44-5,25), demostrant el major gruix arteriolar que presenta el grup HD.

GPA	C	HD	t Student
	46,68	50,53	<i>p 0,001</i>
σ	12,13	12,04	
R	70,54	64,74	

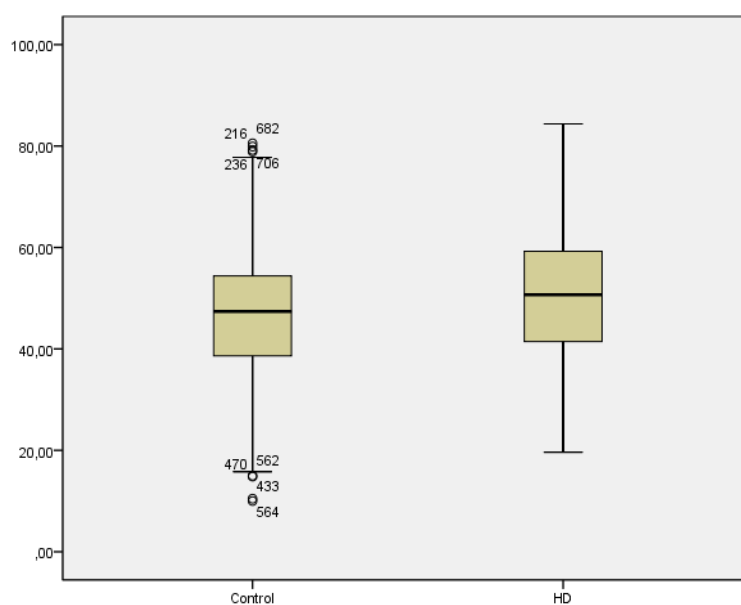


Figura 36. Diagrama de caixes de la variable GPA

Considerant el GPA com un indicador de les resistències vasculars, si representem aquesta variable per a cada calibre de vas, i ho comparem entre els dos grups, obtenim la següent gràfica:

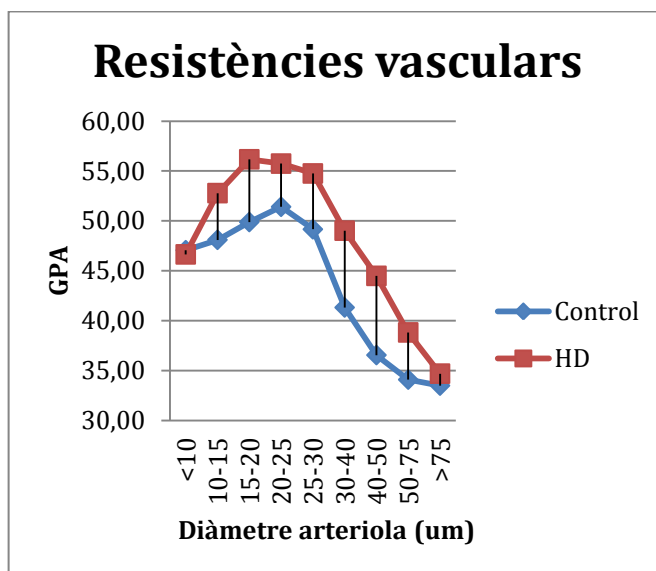


Figura 37. Distribució de les mesures de GPA (Gruix de paret arteriolar) agrupades segons el calibre de les arterioles.

Les arterioles d'entre 20-30 micres són les que tenen major GPA, i per tant major resistència al flux de sang, tant en els controls com en el fetus amb HD en el nostre model.

També es troben diferències estadísticament significatives comparant el gruix en cada interval de diàmetre independentment.

5.5. ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC

- **VEGF**

Els anticossos per al VEGF i el CD44v6 (present en els pneumòcits tipus II), provats a diferents dilucions, no han donat cap resultat valorable. Les mostres han presentat una positivitat difusa i generalitzada en el primer cas i inespecífica en el segon (fins i tot

provant-ho amb teixit pulmonar humà). Amb el CD44v6 s'ha utilitzat l'anticòs ab30436 d'Abcam®.

- **TTF-1**

S'ha determinat l'expressió de TTF-1 en 21 casos (15C i 6 HD) en mostres incloses amb parafina amb l'anticòs anti-TTF-1 de Dako® (clon 8G7G3/1) detectat amb l'anticòs Envison® de Dako®. No s'han trobat diferències en l'expressió entre els grups. L'expressió de TTF-1 s'observa en la pràctica totalitat de les cèl·lules alveolars i de les vies aèries, independentment del grup al qual pertany l'animal.

- **TGF-β3**

No s'ha obtingut un resultat específic i mesurable en l'estudi immunohistoquímic del TGF-β3. Per això, s'ha realitzat també l'estudi del TGF-β3 amb Western blot. S'ha quantificat l'expressió en percentatge respecte a la banda amb major luminescència. Es demostra que el grup C té una expressió molt major (entre el 82-100%) que el grup HD (entre 6 i 48%).

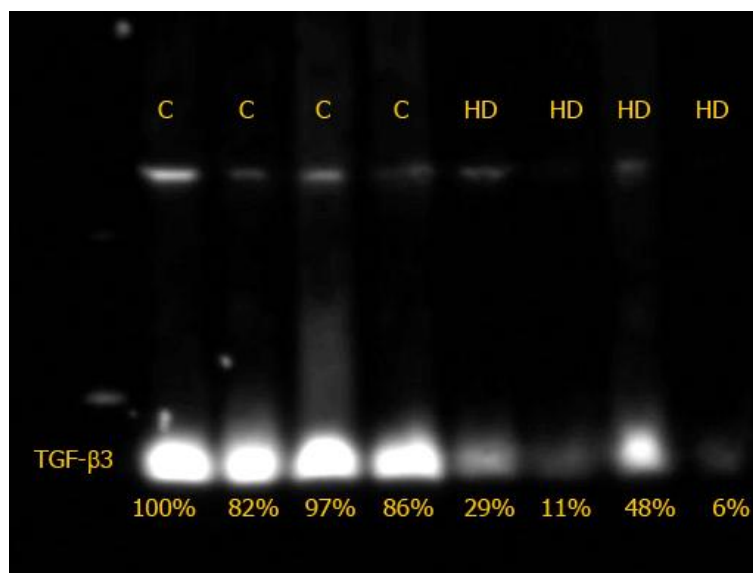


Figura 38. Western blot de TGF-β3. S'observen les diferències de luminescència entre les bandes de l'esquerra (C) i les de la dreta (HD). A la part inferior s'han quantificat aquestes diferències en percentatge respecte a la més luminescent (100%).

5.6. ESTUDI DE L'ASSOCIACIÓ ENTRE VARIABLES

S'han analitzat les possibles correlacions entre les variables hemodinàmiques (PI, FMBV), histopatològiques (Pes pulmó, Pes fetus, LBWR, RAC, DE, DI, GPA) i clíniques (SaO₂ i FC).

Correlacions de les variables hemodinàmiques

Per correlacionar les diferents variables hemodinàmiques entre sí, hem utilitzat totes les dades fluxomètriques de que disposàvem (13HD i 20C). Per a les correlacions entre aquestes variables i les dels estudis histopatològic i clínic només hem inclòs les 3HD i 5C que s'han registrat la setmana 30, i per tant coneixem els resta de variables d'aquests casos.

El PI es correlaciona significativament i negativament amb el pes del pulmó i també amb el LBWR ($r=-0,7820$; $p=0,022$ i $r=-0,795$; $p=0,033$ respectivament). Per tant, entenent el PI com un indicador de resistències pulmonars, com més hipoplàstic és el pulmó, majors són les resistències pulmonars.

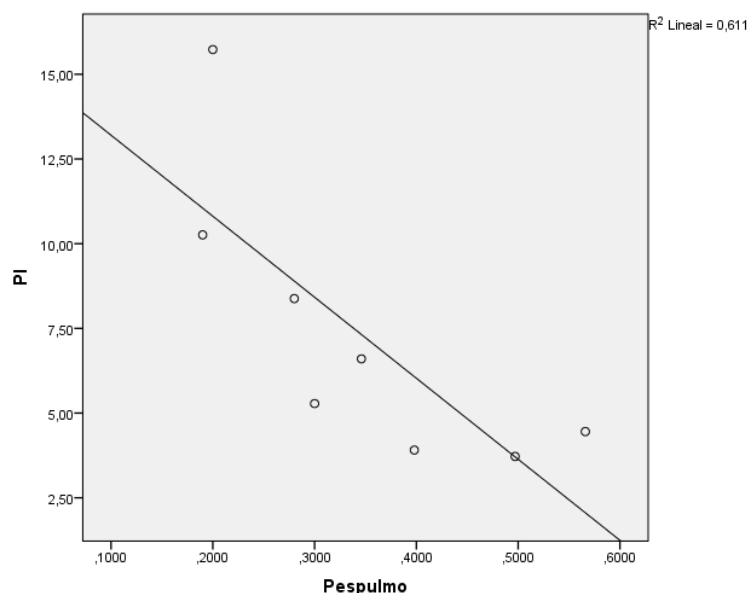


Figura 39. Correlació significativa entre PI i pes pulmó ($r=-0,7820$; $p=0,022$)

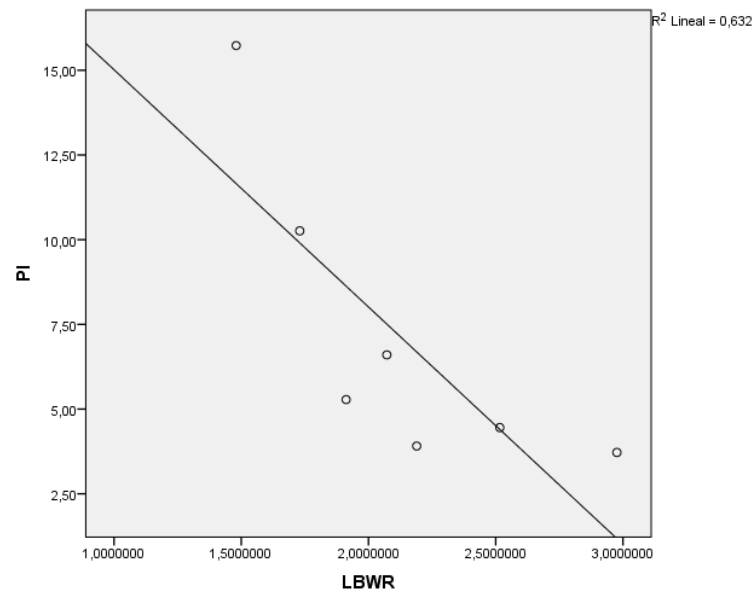


Figura 40. Correlació significativa entre PI i LBWR ($r=-0,795$; $p=0,033$)

Hem trobat també una correlació estadísticament significativa entre el PI i el RAC ($r=-0,841$; $p=0,009$). Per tant, la hipoplàsia pulmonar mesurada en el lobulec respiratori mitjançant el RAC també es relaciona amb unes majors resistències pulmonars.

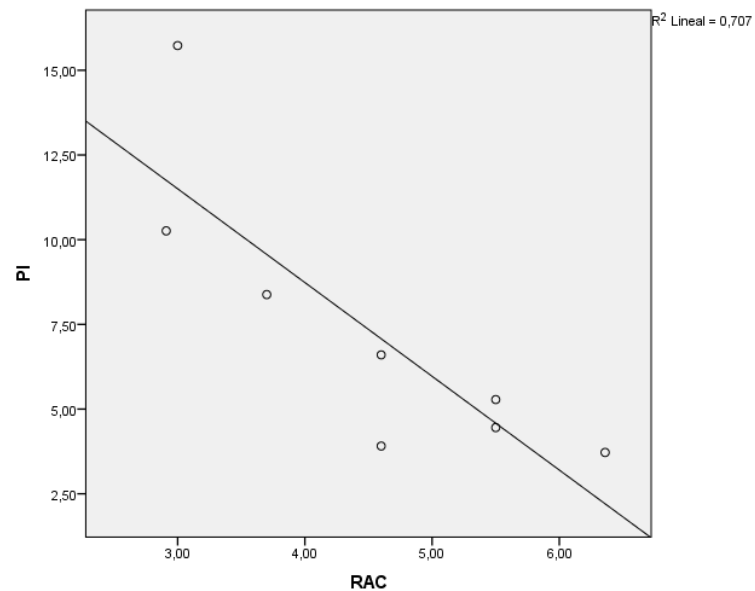


Figura 41. Correlació significativa entre PI i RAC ($r=-0,841$; $p=0,009$).

L'indicador de perfusió pulmonar FMBV s'ha correlacionat de forma significativa i negativa (Correlació de Pearson $r=-0,361$ $p=0,018$) amb el PI, indicant que quant més grans siguin les resistències vasculars, menor serà la perfusió pulmonar.

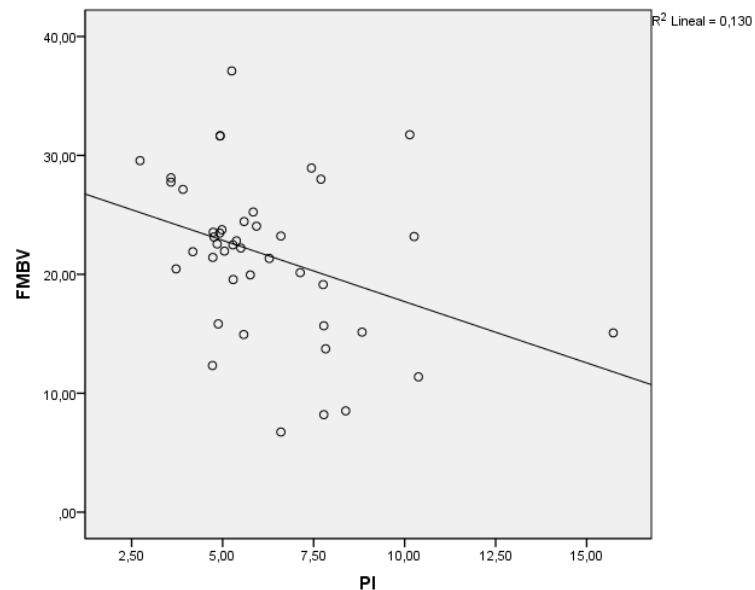


Figura 42. Correlació significativa entre FMBV i PI ($r=-0,361$ $p=0,018$).

L'FMBV no s'ha correlacionat de forma significativa amb cap variable dels altres grups. Tampoc ho han fet el PEDRF i la PSV.

Correlacions de les variables histopatològiques

Hi ha una correlació estadísticament significativa entre el RAC i el LBWR ($r=0,676$; $p<0,001$).

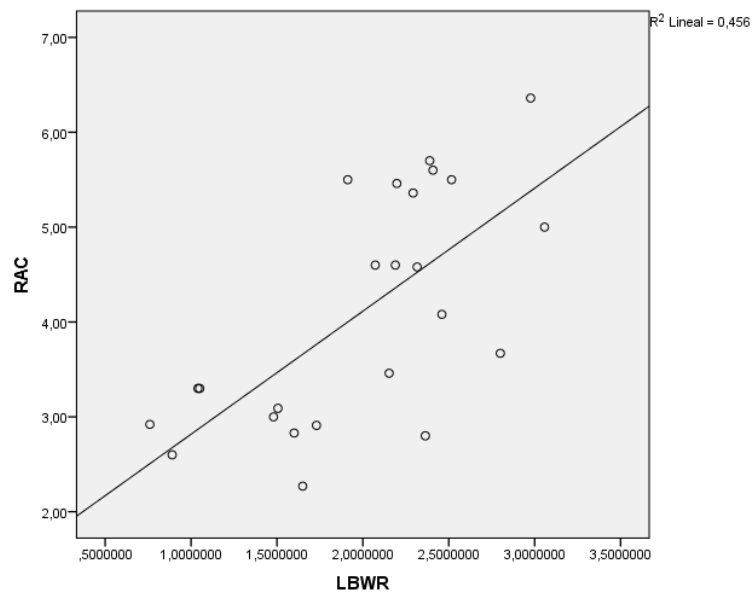


Figura 43. Correlació significativa entre RAC i LBWR ($r=0,676$; $p<0,001$)

El GPA es correlaciona, tant amb el DI ($r=-0,76$; $p=0,0001$) com amb el DE ($r=-0,46$; $p=0,03$) de l'arteriola.

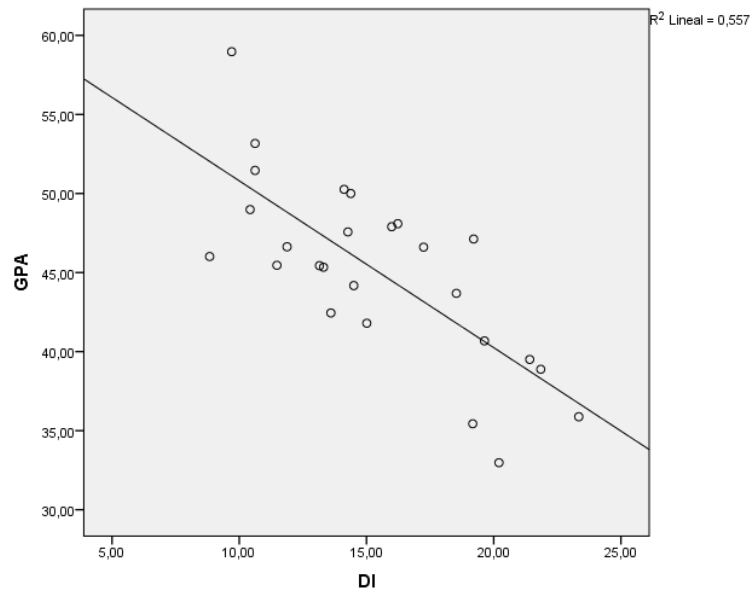


Figura 44. Correlació significativa entre GPA i DI ($r=-0,76$; $p=0,0001$)

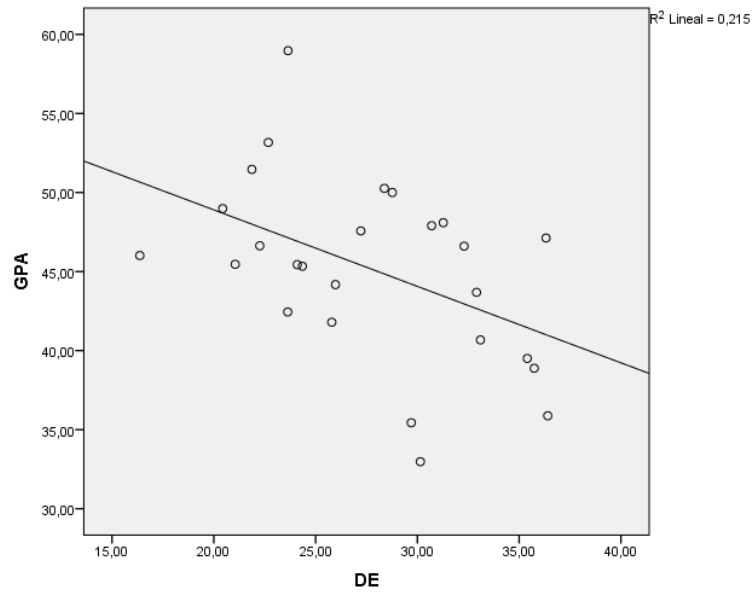


Figura 45. Correlació significativa entre GPA i DE ($r=-0,46$; $p=0,03$)

No hem trobat cap correlació entre les variables histopatològiques bronquiolalveolars i arteriolars.

Finalment, hem trobat una correlació lineal moderada entre els següents paràmetres: SaO₂ i RAC; SaO₂ i GPA; i freqüència cardíaca i LBWR. Cap d'aquestes correlacions no arriba al nivell d'adquirir significació estadística.

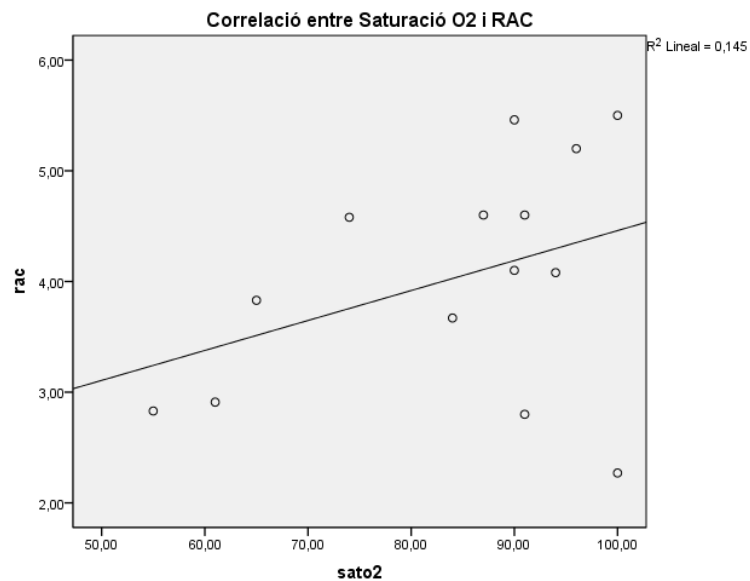


Figura 46. Correlació no significativa entre RAC i SaO₂ ($r=0,380$ i $p=0,18$)

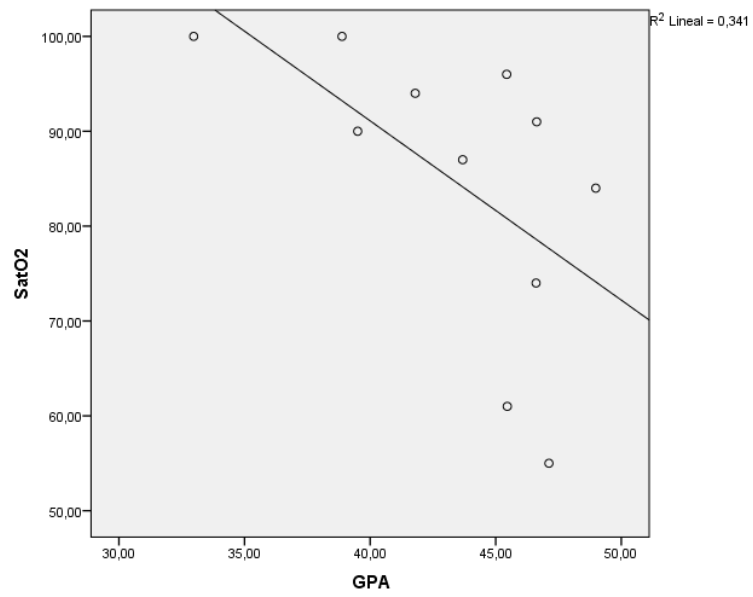


Figura 47. Correlació no significativa entre GPA i SaO2 ($r=-0,46$ i $p=0,059$)

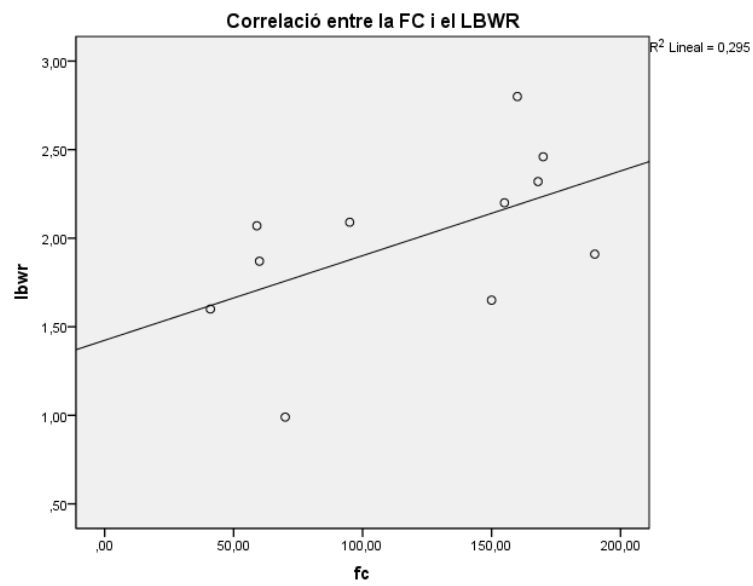


Figura 48. Correlació no significativa entre LBWR i FC ($r=0,543$ i $p=0,084$)

6. DISCUSSIÓ

6.1. DISCUSSIÓ DEL MATERIAL I DEL MÈTODE

6.1.1. DISCUSSIÓ DEL MODEL

Els antecedents i el desenvolupament del model quirúrgic d'HD en fetus de conill es descriu amb detall a l'apartat 2.2.3.2.

Per aquest estudi hem triat el fetus de conill com a animal d'experimentació per diferents motius. Un dels principals pros d'aquest model és el fet que el desenvolupament pulmonar del conill és comparable al dels humans.^{46, 157, 158} Com podem observar en la Figura 49, el desenvolupament pulmonar del conill i l'humà segueix les mateixes etapes, amb la peculiaritat que la fase pseudoglandular és molt més llarga en el conill arribant fins al 80% de la gestació (dia 24-25). Això ens permet reproduir l'HD en la mateixa fase en que ho fa en l'humà però amb un fetus de mida suficient per poder-lo manipular (dia 23).

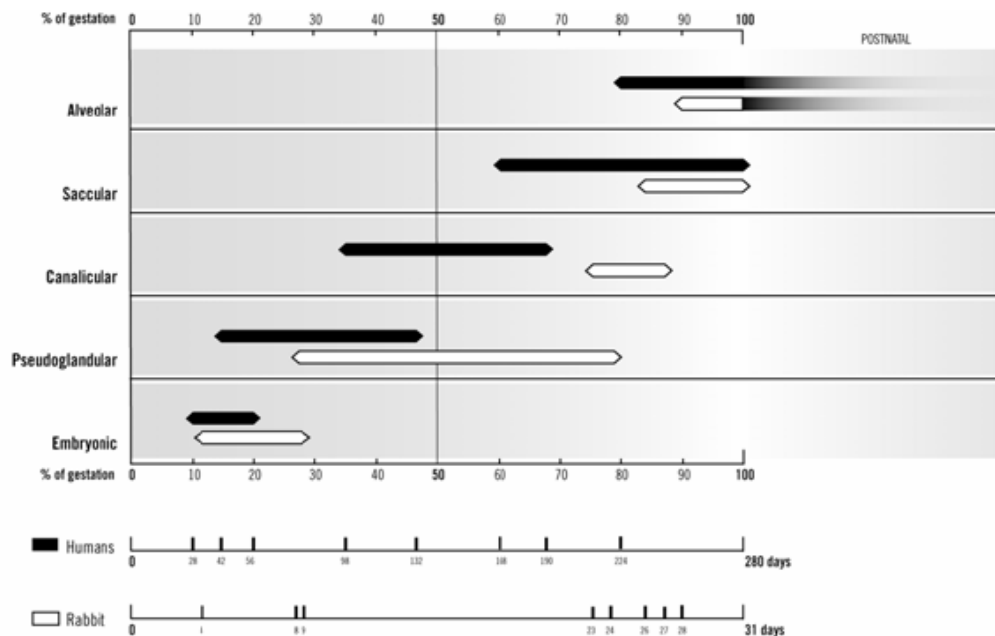


Figura 49. Comparació entre el desenvolupament pulmonar humà i del conill respecte a les seves fases i l'edat gestacional¹⁵⁸

La mida dels fetus facilita, al contrari que altres rosegadors, les intervencions quirúrgiques fetals sense gaire infraestructura (p. ex. no cal microscopi) i l'estudi hemodinàmic mitjançant ecografia, que no és possible en fetus de rata.

Altres avantatges són que la conilla té un període de gestació curt (31 dies) i un preu assequible. Anatòmicament presenta un úter bicorne allargat amb 8-12 fetus en bosses amniòtiques independents. Això permet una manipulació individualitzada de cada fetus i una cohort de controls germans per a poder-los comparar.

La llarga experiència del nostre grup amb aquest animal d'experimentació, que l'ha utilitzat de forma habitual des de 1989 (model de fetus extraamniòtic, model de gastròsquisi, model de cicatrització fetal, model d'espina bífida i model d'obstrucció uretral),^{159, 160, 161} fa que sapiguem que es tracta d'un animal de fàcil manipulació i relativament resistent a les intervencions fetals repetides.

L'ovella ha estat el principal animal d'experimentació en models quirúrgics d'HDC per la seva mida, però no era una opció possible per aquest estudi pel seu major cost econòmic, major complexitat de la infraestructura necessària (incloses les estades en granges especialitzades entre les intervencions), major durada de la gestació, menor nombre de fetus per gestació, etc.

El model quirúrgic té l'avantatge que es limita a crear un defecte en el diafragma, els possibles efectes col.laterals dels teratògens (p. ex. malformacions cardíques o hipoplàsia pulmonar que poden aparèixer en el model de nitrofèn). Per tant, la hipoplàsia pulmonar es produeix de forma secundària a l'ocupació del tòrax i no de forma primària per un possible desenvolupament pulmonar patològic per un teratogen. Com que l'etiopatogènia de la hipoplàsia pulmonar associada a l'HDC continua sent confusa, l'estudi del pulmó que ha esdevingut hipoplàstic per un mecanisme purament físic té l'avantatge de poder correlacionar HDC i HP sense un possible biaix degut a la HP primària.

En canvi, el model quirúrgic podria crear un biaix per la histerotomia i la toracotomia. En diferents models experimentals en fetus de conill del nostre grup, que avaluaven el pes pulmonar, s'ha demostrat que la histerotomia i diferents intervencions fetals (diferents de la toracotomia) *per se* no l'alteraven.^{160, 161}

En el nostre estudi hem utilitzat el model validat descrit pel grup de Lovaina en el qual van utilitzar controls *sham* adequats, on s'ha demostrat que l'efecte de la histerotomia i la toracotomia són negligibles. En primer lloc, el potencial efecte la histerotomia sobre el desenvolupament pulmonar i fetal es produiria tant en els controls com en els casos. En segon lloc, l'efecte d'una toracotomia sobre un grup *sham* sense obrir el diafragma, va demostrar que no produïa diferències en l'estudi dels pulmons del grup *sham* respecte als controls sense toracotomia.^{154, 155} Aquesta evidència junt a l'elevada mortalitat inicial en el nostre estudi, ens va portar a decidir no utilitzar cap grup *sham* per tal de no augmentar més la mortalitat amb una intervenció sobre més fetus controls.

Crear l'HDC de forma tardana en la gestació del conill (en la fase pseudoglandular, que en el conill es produeix més enllà de la meitat de la gestació), simula una malformació d'insult únic (*single-hit*). Per contra, les hipòtesis de doble insult (*dual-hit*) que justificarien per una banda la HP primària bilateral independentment de la mida del defecte i les malformacions cardíques associades, i per l'altra, la HP ipsilateral a l'HDC, s'ajustarien millor a models com el teratogènic amb nitrofèn.¹⁴² És per això que aquest model és adequat per a estudiar les conseqüències de l'HDC i no pas la causa.

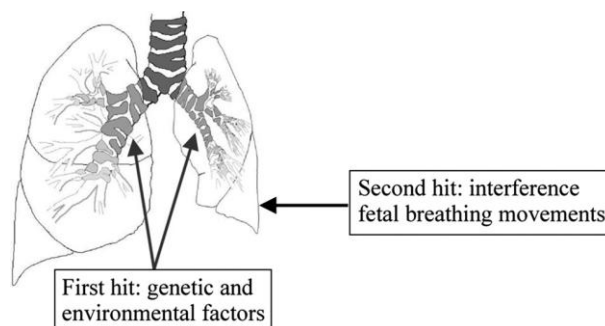


Figura 50. Teoria “*dual-hit*” en la patogènia de la HP de la HDC.¹⁴²

El model teratogènic murí amb nitrofèn, si bé comprèn tot l'espectre de la malformació i podria simular la hipòtesi de doble insult, té les limitacions de ser un model toxicològic, etiologia que no ha estat demostrada en humans. A més, la petita mida dels fetus de rata hauria impossibilitat l'estudi hemodinàmic i dificultat la segona fase del nostre estudi: l'oclusió taqueal.

6.1.2. DISCUSSIÓ DE LES VARIABLES D'ESTUDI

El nostre model pretén estudiar les 3 conseqüències fonamentals de la malformació a partir de la creació del defecte diafragmàtic: la hipoplàsia pulmonar (paràmetres generals i morfomètrics: Pes pulmó, LBWR, RAC), la hipertensió pulmonar (paràmetres hemodinàmics: PI i FMBV; i morfomètrics: GPA), i la clínica (coloració, reactivitat, FC i supervivència en la primera hora).

Per a la determinació dels paràmetres hemodinàmics, hem utilitzat l'ecografia-doppler. L'efecte doppler consisteix en el canvi aparent de la freqüència d'una ona que es produeix pel moviment relatiu de la font emissora respecte al seu observador. En ecografia, l'aplicació d'aquest efecte és el que permet que les variacions de freqüència dels ultrasons emesos pel transductor en topar amb sang en moviment (vasos sanguinis) ens informin de les característiques d'aquest flux de sang: direcció i velocitat.¹⁶² Amb el software adequat es poden calcular els altres paràmetres:

El **PI** és un paràmetre que s'obté del registre de l'ona de pols d'un vas, en el nostre cas de l'artèria intrapulmonar. Aquesta ona té un traçat característic que es va descriure fa 15 anys (veure apartat 6.1.7.3.1) i l'índex de pulsatilitat que se'n deriva es relaciona amb les resistències vasculars del territori d'irrigació de l'artèria analitzada.¹⁶³

L'**FMBV** és un paràmetre que es calcula amb un software matemàtic (MATLAB 7.5; TheMathWorks, Natick, MA. USA) a partir d'un transductor d'ultrasons amb tecnologia *power-doppler*, que estima de forma quantitativa la proporció de sang que té un teixit. S'identifica la denominada "regió d'interès" sobre una imatge ecogràfica congelada, calibrant el *power-doppler* amb una estructura adjacent que tingui un 100% de flux sanguini (en el nostre cas l'artèria pulmonar). Calculant la raó entre els valors de *power-doppler* de la regió d'interès i els píxels totals obtenim l'FMBV. Es repeteix la mesura en diferents fases del cicle cardíac i se'n obté la mitjana.¹⁶⁴

L'FMBV no deixa de ser una estimació indirecta de la perfusió pulmonar. Però aquesta tècnica ha demostrat una excel·lent correlació amb una tècnica *gold standard* per a l'avaluació de la perfusió com és l'ús de microesferes radioactives en un model de perfusió renal en ovella.⁸⁵

Aquests dos paràmetres ja han estat utilitzats per altres grups i en altres models. El grup de Filadèlfia va publicar fa més d'una dècada que es produïa un augment del PI en el seu model oví d'HDC, i que l'oclusió traqueal tendia a revertir-lo.¹⁶⁵

Nosaltres, en el model de conill, hem publicat ja els resultats hemodinàmics del nostre estudi comparant-los amb el grup d'oclusió traqueal que s'ha realitzat paral·lelament, demostrant l'augment de PI i descens d'FMBV del grup HD i la millora d'aquests paràmetres després de l'OT.¹⁶⁶

Posteriorment s'ha demostrat la utilitat de l'FMBV en la pràctica clínica. En aquest sentit, el grup europeu en el qual participa l'Hospital Clínic ha publicat recentment resultats superposables als del model d'ovella i de conill.⁸⁷ Seguint el mateix protocol d'obtenció dels paràmetres (pulmó contralateral, artèria intrapulmonar,...), van prendre mesures en 95 fetus humans amb HDC esquerra i van comparar-les amb les de fetus sans d'edat gestacional similar. Demostren que els pacients amb HDC, efectivament, tenen valors d'FMBV més baixos que els controls, i es correlacionen positivament amb l'o/e LHR i negativament amb el PI. És a dir, tenen pulmons més petits, amb menor perfusió i majors resistències vasculars. L'estudi d'aquestes dues variables hemodinàmiques aporta informació molt precisa de la situació d'HP i HTP, que són els dos problemes més greus dels pacients amb HDC. Aquesta informació prenatal es pot relacionar amb la gravetat de la situació pulmonar (pronòstic) i amb la histologia.

També des del punt de vista pronòstic, alguna altra mesura hemodinàmica com el PEDRF, s'ha proposat com a indicador de probabilitat de supervivència atès que es correlaciona de forma negativa i consistent amb l'o/e LHR (com hem vist, l'indicador pronòstic més utilitzat actualment).⁸¹ El mateix grup del Clínic ha reportat recentment que el PEDRF i el PI tenen significació pronòstica respecte a la morbiditat neonatal (major duració de ventilació mecànica, necessitat d'O₂, iNO i VAFO) en pacients tractats amb oclusió traqueal fetoscòpica.¹³⁶

Tot i la mida adequada dels fetus de conill per a fer un estudi ecogràfic, a vegades l'estudi mitjançant doppler de l'arteria pulmonar per avaluar el PI ha resultat difícil per la proximitat amb el cor i per la mida de l'artèria pulmonar. L'estudi de l'FMBV, atès que analitza una superfície major, resulta més fàcilment determinable. A més, el fet de només

tenir un ecografista capaç de fer les determinacions hemodinàmiques ha suposat una limitació, doncs quan ell no hi era no podíem fer els registres.

A l'espera de millores tècniques en l'ultrasonografia hemodinàmica, cal continuar els estudis en animals i en humans per tal de trobar paràmetres que permetin una avaluació prenatal que es pugui correlacionar amb l'evolució pre i postnatal de la HP associada a l'HDC. L'objectiu continua sent la identificació prenatal del risc de morbimortalitat neonatal i com a conseqüència el desenvolupament de les teràpies fetals en base a aquest pronòstic predit, ja sigui amb un o amb la combinació de diversos indicadors, que n'augmentin el valor predictiu.

Els paràmetres d'hipoplàsia pulmonar i el procediment per a obtenir-los, estan ben estandarditzats. Des de la seva descripció, el RAC ha estat un paràmetre àmpliament utilitzat en els estudis del desenvolupament pulmonar. És considerat el millor paràmetre d'HP.⁶³ Una de les dificultats rau en la necessitat de tenir els alvèols desplecats per tal de poder fer el recompte (RAC). Si estan col·lapsats o bé l'espai alveolar o l'interstici es troba ocupat per cèl·lules inflamatòries no resulta factible el recompte. Tot i que s'havia utilitzat l'expansió sota pressió del pulmó prèvia a la fixació (expansió durant 24 hores amb perfusió de la via aèria amb formol a 25 cmH₂O),¹⁶⁷ s'ha vist que aquesta maniobra no és necessària i que pot, fins i tot, esbiaixar els resultats del RAC.^{158, 168} Per això no l'hem utilitzat, i hem pogut fer els recomptes en tots els casos encara que pràcticament no haguessin respirat (morts als pocs minuts o agònics), excepte en 3 casos que presentaven pneumonitis. En segon lloc, la identificació dels bronquióls respiratoris resulta senzilla quan la secció és longitudinal, però no tant quan és transversal. Tot i així es van poder fer els 10 RAC per lamineta que ens havíem proposat, amb la sistemàtica "d'escombrat" consistent en resseguir arreu tota la preparació de forma contínua amb el microscopi. El fet de prendre 10 determinacions és l'estàndard acceptat arbitràriament, des de la seva descripció, com a suficient per a minimitzar el marge d'error.¹⁶⁹ La perpendicular amb que hem comptat els envans alveolars del recompte es dibuixava segons el criteri coincident de dos membres de l'equip, i la revisió posterior de les fotografies obtingudes de cada mesura per un patòleg expert.

L'anàlisi de les variables de morfometria arterial té molt d'interès, perquè les anomalies arteriolars són el substrat histopatològic que condiciona la temuda HTP, una de les principals causes de mortalitat en la HDC. En l'intent de disminuir al màxim el marge

d'error de les mesures, s'han estudiat 50 arterioles per mostra (50 arterioles x 2 diàmetres a cada arteriola = 100 mesures), resultant un total de 435 arterioles en el grup HD i 812 en el grup C. Aquest gran nombre de mesures en una mostra petita, requereix una sistemàtica acurada, per a resseguir tota la superfície de la làmina sense repetir la mesura d'una mateixa arteriola. Aquest procés requereix molt de temps i concentració per a l'estudi de cada mostra. Mentre que en les arterioles de major calibre els límits de la capa muscular són ben definibles i per tant poc variables interobservadors, les de menor calibre tenen diferències notables segons si la mesura es pren a l'alçada del nucli o fora d'aquest. Aquesta possible diferència en les mesures l'hem homogeneïtzat prenent la mesura enmig del nucli de la cèl·lula. El fet d'emprar una tinció d'hematoxilina-eosina i no una tinció específica per al múscul llis (p.ex. tinció de les fibres elàstiques amb orceïna i amb tinció de Verhoeff) fa que les arterioles més petites siguin difícils d'identificar i per tant predominin les mesures de les de calibre mitjà. A la Figura 51 veiem que tenim mesures de tot el rang de diàmetre entre 10 i 100µm, però les de petit calibre estan menys representades (quan haurien de ser més per la ramificació).

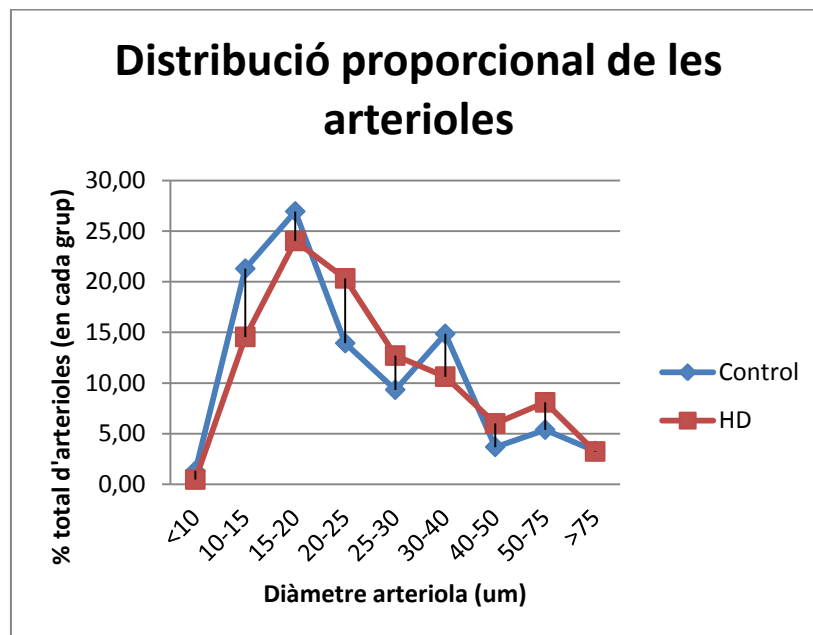


Figura 51. Distribució proporcional de les mesures de morfometria arteriolar segons el calibre del vas. La major proporció d'arterioles mesurades correspon als calibres entre 15 i 25µm.

El fet que per sota de 10µm caigui el nombre d'arterioles mesurades, es pot deure al fet que no les veiem (per col·lapse de la llum), o les rebutgem per dubtar de si són venes o artèries (per l'escassa muscularització). En tot cas, no hi ha diferències en les proporcions de gruix entre els grups, el procediment ha estat el mateix en els dos grups i el fet de primar les mesures de les arterioles més muscularitzades tindria major traducció clínica atès que són les principals responsables de les resistències pulmonars.

Pel que fa a l'estudi clínic, les variables analitzades corresponen aproximadament al test d'Apgar que s'utilitza per l'avaluació neonatal en la pràctica clínica. La coloració, reactivitat, moviments espontanis i freqüència cardíaca en formen part, i enlloc de l'avaluació dels moviments respiratoris hem afegit la pulsioximetria.

6.2. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

6.2.1. RENDIMENT

Van sobreviure 25 nounats amb HD, dels quals 19 foren vàlids per l'estudi (9 HD i 10 OT). Dels altres sis exclosos, tres ho foren perquè les mostres no es podien analitzar (per pneumonitis), un no presentava hèrnia diafragmàtica en el moment de realitzar la necròpsia, un altre no tenia herniació de vísceres al tòrax perquè el defecte era molt petit, i el darrer tenia les mostres mal identificades (veure la Fig. 29).

Tot i que l'anestèsia inhalatòria amb respiració espontània és complicada per l'escàs marge terapèutic, només 2 conilles van morir a la intervenció per depressió respiratòria. La mortalitat, doncs, s'ha concentrat en els fetus després de realitzar els procediments. Només un 27% dels fetus van sobreviure a la creació de l'HD. I un 70% d'aquests van arribar a terme després de superar la segona intervenció materna (oclusió traqueal sobre germans seus). Així doncs, és la primera intervenció la principal responsable de la mortalitat del model, probablement per la seva precocitat, l'agressivitat de la tècnica i el temps necessari per a realitzar-la.

La taxa de mortalitat publicada pel grup que va descriure el model, quan es realitza només un procediment quirúrgic (creació del defecte diafragmàtic), és del 12-14%,^{154, 158} i quan es realitza un segon procediment (oclusió traqueal), augmenta fins al 20%.¹⁵⁶

La nostra elevada mortalitat es pot atribuir fonamentalment a 4 causes:

1. Les intervencions quirúrgiques repetides. Dos procediments d'apertura i tancament d'histerotomia.
2. Intervenció simultània de múltiples fetus germans. A diferència del grup que va descriure el model, i amb intenció d'optimitzar els recursos, s'han intervingut una mitjana de 4 fetus per mare. Això prolonga el temps quirúrgic i l'agressió als fetus.
3. El maneig dels fetus. Durant l'estudi vam veure que el maneig no havia de ser només curós sinó exquisit.
4. L'ecografia directa sobre la paret uterina. Per la compressió del transductor sobre la placenta i el fetus, en ocasions observàvem bradicàrdies severes dels fetus durant les determinacions, i fins i tot despreniment de placenta.

Després d'un període molt decebedor sense supervivents (primeres 12 conilles i 50 fetus), un dels creadors del model original (Dr. Jacques C Jani) va acceptar la nostra invitació per venir al nostre centre a mostrar-nos els detalls de la tècnica.^{156, 158, 168} Després d'això, amb la introducció d'algunes mesures pel que fa a la mínima manipulació (exteriorització limitada del tòrax en el primer procediment), hidratació dels fetus (irrigació del fetus durant la cirurgia i ompliment de la cavitat amniòtica amb sèrum fisiològic prèvia al tancament de la histerotomia), i la reducció del temps quirúrgic (reduint el nombre de fetus intervinguts en cada procediment), vam aconseguir reduir la mortalitat a uns nivells assumibles. A partir d'aquest moment, un 40% dels fetus (36 de 83) van sobreviure al primer procediment.

En resum, aquest model ens ha permès realitzar una hèrnia diafragmàtica i l'estudi hemodinàmic en el mateix individu (a més d'una oclusió traqueal als germans), a expenses d'una elevada exigència tècnica i dedicació.

El model permet reproduir les característiques bàsiques de l'HD en l'humà: vísceres herniades al tòrax, compromís en el desenvolupament pulmonar (amb hipoplàsia pulmonar) i compromís vascular (amb les mateixes troballes en la morfometria arteriolar que en l'humà i alteracions hemodinàmiques suggestives d'HTP). L'originalitat de l'estudi és integrar tota la informació dels 4 tipus de variables (hemodinàmiques, clíniques, histopatològiques i immunohistoquímiques) de cada individu i estudiar com es correlacionen.

6.2.2. ESTUDI HEMODINÀMIC

Aquesta part del treball és la principal novetat. Si bé s'ha validat l'FMBV com a estimador de perfusió vascular en un model oví de resposta suprarenal a l'asfíxia,⁸⁵ aquesta és la primera vegada que es quantifica la perfusió pulmonar en animals amb HDC mitjançant l'FMBV utilitzant *power-doppler*, i les resistències pulmonars mitjançant el PI.

Com era d'esperar, el fetus de conill amb HD creada quirúrgicament presenta una disminució de la perfusió pulmonar (menor FMBV que els controls) i un augment de la resistència vascular pulmonar (major PI que els controls). A més, el PI es correlaciona amb l'FMBV, com s'observa a la Figura 42, demostrant la interdependència entre les resistències vasculares i la perfusió.

L'eco-doppler ja ha estat utilitzada per caracteritzar la circulació pulmonar en fetus humans amb HDC, tot i que no hi ha gaires estudis encara. En un d'aquests, es va avaluar qualitativament la vascularització en funció del nombre de bifurcacions visibles de l'artèria pulmonar amb *power-doppler* 2D per tal d'estratificar els resultats amb finalitats pronòstiques. Es va demostrar que la mortalitat neonatal era major quan es visualitzaven menys de 3 branques de l'artèria pulmonar.⁸³ Aquesta menor visualització de branques segmentàries pulmonars s'explicaria pel major engruiximent arteriolar que causaria HTP i una menor perfusió pulmonar, que alhora es tradueix en una major mortalitat neonatal.

L'ecografia 3D també s'ha proposat en l'estudi de la perfusió fetal. Tot i que les imatges que s'obtenen amb aquesta tècnica són espectaculars, la seva aplicació clínica fins ara és limitada i els resultats dels estudis, variables. S'ha descrit l'anomenat *índex de flux en 3D* com a indicador de perfusió vascular, però analitzant l'artèria uterina, aquest índex ha demostrat una correlació molt pobre amb la velocitat i el volum del flux,¹⁷⁰ per la qual cosa sembla poc útil. En un altre estudi, es va utilitzar un mètode semiquantitatiu de la perfusió pulmonar amb *power-doppler* 3D demostrant-ne una disminució en els pacients amb HDC i associant aquesta troballa amb la presència d'HTP en néixer i amb la mortalitat.⁷⁰

Els nostres resultats demostren la potencial utilitat de l'avaluació del doppler fetal en l'estudi de l'HP i l'HTP associada a HDC. De la correlació entre el PI i el RAC, pes pulmonar i LBWR (Fig. 39-41), es pot inferir que com més hipoplàstic és un pulmó, majors

són les seves resistències pulmonars. Per tant, aquests paràmetres (PI i FMBV) podrien ser validats en humans i utilitzar-se amb finalitat pronòstica. En aquest sentit, actualment s'estan recollint les variables hemodinàmiques dels pacients amb HDC en seguiment a la nostra Unitat de Medicina Fetal. S'han analitzat aquests paràmetres en pacients sotmesos a oclusió traqueal trobant una associació entre PI i PEDRF preoperatòria i la supervivència,⁸⁴ però no en el cas de l'FMBV.⁸⁶

Finalment, en la segona part del nostre estudi, que no és l'objecte d'aquesta tesi, hem demostrat que aquest augment de les resistències pulmonars i la disminució de la perfusió es reverteix per l'oclusió traqueal, com ja vam avançar recentment en una publicació.⁸⁶

6.2.3. ESTUDI CLÍNIC

L'estudi de la vitalitat neonatal, ha demostrat l'efecte devastador de l'HD en tots els casos excepte en un (89%). Abans dels 60' els nounats presentaven una coloració gris, estaven areactius i amb moviments nuls o lents. L'únic individu amb un estat més actiu va resultar tenir un defecte petit al diafragma amb mínima herniació visceral.

Com a mesura indirecta i incruenta de l'oxigenació tissular vam prendre la freqüència cardíaca i la pulsioximetria com a paràmetres. Lògicament, la mida del conill nounat no permet una gasometria. La mortalitat neonatal és elevada i precoç per insuficiència respiratòria en el grup HD. La majoria moren en néixer i aquells que sobreviuen presenten un estat tan crític que el pulsioxímetre no arriba a captar una mesura de saturació d'O₂ o de freqüència cardíaca. Com que, a més, vam tenir limitacions en la disponibilitat del pulsioxímetre, el nombre de casos que es van poder avaluar va ser només de tres.

Evidentment, aquest escàs nombre no permet cap tipus d'anàlisi estadística, comparació entre grups, ni correlació amb altres paràmetres. Només permet especular sobre els resultats obtinguts, i també sobre els no obtinguts.

Les correlacions entre les variables clíniques d'oxigenació (SaO₂) i freqüència cardíaca (FC) respecte a les dels altres apartats, no han arribat a la significació però sí que han assenyalat tendències. Revisitem la Taula 5 per a comprovar-ho.

Taula 6. Resultats de l'oximetria i freqüència cardíaca, junt als valors de la morfometria cas a cas.

Grup	SaO₂	FC	LBWR	RAC	GPA
HD*	61	--	1,73	2,91	45,46
HD	55	41	1,60	2,83	47,12
HD**	100	150	1,65	2,27	38,88
HD*	--	--	0,76	2,92	48,09
HD*	--	--	1,04	3,30	50,00
C	91	--	2,46	4,08	41,80
C	100	190	2,80	3,67	48,98
C	87	59	2,32	4,58	46,61
C	94	170	2,20	5,46	39,51
C	84	160	--	5,20	45,44
C	74	168	0,99	4,10	36,86
C	90	155	1,87	3,83	44,67
C	96	85	2,09	4,60	49,35

Tres dels casos d'HD sense alguna de les dades de la pulsioximetria i freqüència cardíaca (assenyalats amb *) eren vius després de la cesària, però agònics, i l'aparell no era prou sensible per captar el pols o l'oximetria. Les dades morfomètriques d'aquests animals, però, van ser les esperades per la hipoplàsia pulmonar i semblants als altre casos d'HD. En aquest estat agònic, s'haurien d'haver obtingut uns resultats pitjors que els dels casos que tenim registrats i, per tant, potser en resultaria una significació estadística de les correlacions.

D'altra banda, el cas d'HD amb una saturació del 100% (**) presentava un millor resultat de morfometria arterial i tenia a l'autòpsia l'hèrnia diafragmàtica més petita i amb menys herniació de tots els individus intervinguts.

Tot i la poca discriminació de les dades numèriques, va resultar evident que l'estat clínic d'ambdós grups era completament diferent, i que la hipoplàsia pulmonar n'ha estat el substrate fisiopatològic, encara que no ho poguem correlacionar numèricament amb les altres variables.

6.2.4. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC

Atès que el pes dels pulmons esquerres del grup HD és significativament més petit que els del grup C i, en canvi, no hi ha diferències en el pes dels fetus en néixer, es pot afirmar que les diferències en els pesos dels pulmons es deuen a hipoplàsia pulmonar i que el retard de creixement del fetus no és un factor destacable. El LBWR és una variable obtinguda a partir de les anteriors que serviria per neutralitzar l'efecte de la mida del fetus i, novament, els resultats són també els esperats en el model: un menor LBWR en el grup HD. El pes dels pulmons del grup HD és només el 45,6% del dels controls. És per tant un model que obté una hipoplàsia pulmonar constatable mesurant el pes pulmonar, com ja havia estat demostrat en aquest mateix model d'HD.¹⁶⁸

El grup HD del nostre estudi compleix els criteris clàssics d'HP (RAC per sota del 75% i LBWR menor al 67% del normal).⁶³ Concretament, en el nostre estudi els valors mitjans de RAC foren del 63% i els de LBWR del 54% respecte als controls. Si mirem aquests paràmetres a cada individu, tots els casos excepte un (8/9) compleixen el criteri d'HP pel que fa al RAC i un 66% (6/9) el compleixen si atenem al LBWR. Dos dels casos que no el compleixen poden explicar-se: un correspon a l'únic cas del grup HD que saturava 100% en néixer i que presentava un defecte diafragmàtic petit amb escassa herniació, i l'altre és l'individu amb menor pes corporal d'ambdós grups. Com que aquest individu tenia un pes pulmonar semblant a la resta, el LBWR es veu incrementat, potser falsament. Val a dir que el RAC d'aquest individu compleix el criteri d'HP. Aquest fet reforça la major sensibilitat del RAC com a indicador d'HP.⁶³

Totes aquestes troballes histopatològiques constaten que aquest és un bon model d'HD que reproduceix de manera demostrable la HP.

Com hem vist en l'apartat d'HTP, la vascularització pulmonar dels pacients amb HDC presenta alteracions tant quantitatives com qualitatives. El nombre d'artèries per unitat de volum està disminuït,⁵¹ tenen la capa muscular i adventícia hipertrofiades i la muscularització s'estén fins a arterioles més distals.⁵⁵ En el nostre estudi, hem pogut constatar aquesta hipertròfia avaluant el gruix de la paret arteriolar (GPA) que és significativament major en el grup HD. La remodelació pre i postnatal tendeix a disminuir aquesta muscularització alhora que les artèries creixen, fins i tot en pacients amb HDC.⁵⁶

Aquesta remodelació també s'ha demostrat prèviament en el model animal que hem utilitzat.¹⁵⁵

Les resistències pulmonars es deuen principalment als canvis en el segment intraacinar de l'arbre vascular. En el conill el diàmetre extern d'aquestes artèries es situa al voltant de les 30µm.¹⁷¹ En l'anàlisi de les mesures de GPA de les artèries dels grups HD i C veiem que en tots dos grups les arterioles entre 15 i 30µm són les que presenten un major GPA. Aquest resultat és consistent amb les troballes en humans on el major gruix de l'arteriola intraacinar és el principal responsable de les resistències vasculars. I també ho és amb el fet que el grup d'HD presenta un GPA significativament major en tots els segments de diàmetre arterial excepte les majors de 75µm i les menors de 10µm (vegeu la Figura 37).

6.2.5. ESTUDI IMMUNOHISTOQUÍMIC (IHQ)

L'interès de poder demostrar alteracions moleculars de determinats factors de creixement associats a les diferents fases del desenvolupament pulmonar rau en la seva possible correlació amb les troballes hemodinàmiques, histopatològiques i clíniques. Si bé no hauria establert causalitat en les relacions obtingudes, suposaria una evidència més per a aprofundir en els mecanismes que condueixen a la HP, que tenen traducció en l'hemodinàmia prenatal i en les manifestacions clíniques. Creiem doncs que era raonable i obligat fer-ho, ja que no s'havia publicat, fins a l'inici del nostre projecte, cap estudi de factors de creixement en aquest model. Recentment se n'ha publicat un on, mitjançant PCR quantitativa en temps real s'ha trobat una expressió disminuïda dels gens codificants per la tropoelastina, lisil-oxidasa, fibrulina 5 i eNOS en nounats de conill amb HD creada quirúrgicament al fetus el día 23 de gestació.¹⁷² Aquest estudi s'ha focalitzat en aquests factors per l'evidència trobada de la seva expressió alterada en dos treballs publicats d'un mateix grup en HD d'humans, ovelles i rates.^{173, 174}

Aquesta part ha estat la que ha presentat majors dificultats, insalvables en molts casos.

Inicialment semblava que només el preu seria un obstacle i per això vam limitar l'estudi a 4 factors com a indicadors de les 5 diferents etapes del desenvolupament pulmonar (embrionària: FGF-10, pseudoglandular: TGF-β; canalicular: VEGF; sacular: TGF-β; i alveolar: PDGF-A).

Crèiem que molts dels anticossos per a l'estudi immunohistoquímic de factors de creixement de rata serien probablement útils degut a la reactivitat creuada interespècie que sovint presenten. No ha estat així, però. Els problemes que s'han presentat en aquesta part de l'estudi es poden resumir en:

- Falta d'anticossos primaris comercialitzats per a proteïnes del conill. I també cost excessiu per a encarregar la seva obtenció.
- Falta de reactivitat creuada amb el conill de molts anticossos anti-rata.
- Falta de discriminació dels anticossos secundaris (normalment anti-conill) respecte a proteïnes que el conill expressa en les cèl·lules no marcades amb l'anticòs primari.

Els resultats dispars amb tècniques IHQ, a més, tampoc són infreqüents a la literatura. Per exemple, durant els intents d'estudiar el TTF1 que només van obtenir una tinció difusa de totes les cèl·lules alveolars, revisant la literatura vam trobar treballs que en demostraven una expressió disminuïda en el model de rata amb nitrofen,³⁶ mentre que aquesta troballa no es confirmava en mostres humanes tant de pulmons sans com hipoplàstics per HDC.¹⁷⁵

Fins i tot el Western blot (Wb) ha presentat la limitació que es poden fer comparacions entre les bandes d'un mateix gel però no entre les de diferents gels. Igualment les correlacions entre aquesta i altres variables no han tingut cap resultat aclaridor.

Només el Wb del TGF- β 3 ens ha permès una mesura quantitativa de la seva expressió en el teixit pulmonar del nostre model. També aquest mètode ha presentat la limitació que es poden fer comparacions entre les bandes d'un mateix gel però no entre les de diferents gels. En comparar la densitat integrada de les bandes corresponents a cada individu en el mateix gel hem observat diferències evidents però no quantificables en tota la sèrie atès que les mostres estan en gels diferents.

El grup C té una expressió de TGF- β 3 molt major (entre el 82-100%) que el grup HD (entre 6 i 48%). El fet que sigui un factor de creixement que s'ha vinculat a la fase pseudoglandular (que és la que es veu interferida per la creació de l'HD en el nostre model) junt a aquesta diferència d'expressió donaria suport a la hipòtesi que el TGF- β 3 pot estar implicat els mecanismes moleculars de la HP lligada a l'HDC.

També s'han intentat estudis IHQ de CD44v6 (variant 6 de la glicoproteïna transmembrana CD44, relacionada amb l'organogènesi i present als pneumòcits tipus II) i TTF1 sense cap

resultat analitzable. Tot i intentar diferents dilucions, les tincions han estat sovint difuses i inespecífiques.

En tot cas, a la finalització d'aquest estudi, resten dues vies obertes per a completar aquesta vessant. Una consistiria en desenvolupar anticossos específics per conill, i l'altra seria analitzar els factors ja validats en conill en el recent estudi que hem comentat. Atès que tenim les mostres del nostre estudi congelades, ho podrem realitzar quan disposem dels recursos per fer-ho.

6.2.6. CORRELACIONS ENTRE VARIABLES

Hem trobat les correlacions lògiques, o ja conegudes, del RAC amb el pes pulmonar, i amb el LBWR, que demostren que es tracta d'un model vàlid d'hipoplàsia pulmonar deguda a HD i que aquesta HP es correlaciona amb el grau d'hipoplàsia del lobulete respiratori. Alhora, com més marcada és la hipoplàsia pulmonar, ja sigui mesurada amb el RAC o amb el LBWR, pitjor és la situació neonatal mesurada amb la freqüència cardíaca i la pulsioximetria. Resulta una relació lògica però no s'havia demostrat fins al moment en aquest model.

Pel que fa a les variables hemodinàmiques, només s'han inclòs per a les correlacions les dades dels vuit casos que han pogut ser avaluats el dia 30 de la gestació els quals, per tant, podíem identificar amb seguretat i dels quals coneixem la resta de variables. La correlació negativa significativa entre la HP mesurada amb el RAC, pes pulmonar o LBWR, i les resistències vasculares pulmonars mesurades amb el PI indica que les resistències vasculares augmenten amb la hipoplàsia pulmonar. Aquest fet no havia quedat demostrat ni clínicament ni experimentalment fins ara, i suposa una troballa molt interessant de cara a suggerir que el PI podria ser un indicador fiable d'HP i un potencial paràmetre pronòstic prenatal.

Igualment, la correlació entre la perfusió (FMBV) i les resistències vasculares pulmonars (PI), no s'havia demostrat fins ara en l'HD animal, i resulta també molt interessant el concepte que quan augmenten les resistències vasculares pulmonars disminueix la perfusió, que pot ser avaluada prenatalment. Recentment, un estudi clínic en 95 casos d'HDC i 95 controls trobava resultats semblants als que nosaltres presentem experimentalment; els pacients amb HDC tenen significativament valors menors d'FMBV que es correlacionen negativament amb el PI.⁸⁷ En el mateix treball presenten una correlació negativa d'FMBV

amb el PEDRF, que nosaltres no hem trobat, tot i observar-se una tendència cap a aquesta correlació.

El fet que el PI no es correlacioni amb el GPA, suggereix que l'augment de les resistències vasculares es deu sobretot a una alteració hemodinàmica sobre unes arterioles engruixides (per vasoconstricció, disminució del llit vascular per la hipoplàsia, etc), més que pròpiament a l'augment de gruix de la paret arteriolar.

El GPA es correlaciona tant amb el DI com amb el DE de l'arteriolar, (com és lògic atès que aquella variable s'obté d'aquestes), però ho fa de forma més potent i significativa amb el DI ($r=-0,76$; $p 0,0001$) que amb DE ($r=-0,46$; $p 0,03$), suggerint que l'engruiximent de la paret arteriolar és produït fonamentalment a expenses d'una reducció de la llum arteriolar.

Algunes altres correlacions no tenen suficient força per arribar a la significació estadística, però mostren una tendència. Així ocorre entre la SaO_2 i el RAC, entre la SaO_2 i el GPA i entre la FC i el LBWR. Atès que tots aquests resultats són els esperats per la lògica de la seqüència $HDC \rightarrow HP \rightarrow HTP \rightarrow$ Hipoxèmia / Bradicàrdia neonatal, és molt probable que amb una mida mostral més gran, aquestes tendències arribarien a la significació estadística.

Per acabar, tot i les diferències trobades en totes les variables histopatològiques del grup HD respecte el grup C, sorprenentment no hem trobat correlació entre les variables de desenvolupament bronquialveolar (RAC, Pes pulmó, LBWR) i les de desenvolupament vascular (GPA, DI, DE). Si bé l'alteració en el desenvolupament es desencadena en el mateix moment (a partir de la creació de l'HD), les conseqüències en les variables estudiades no es correlacionen entre sí. Això ens permet suposar que l'alteració del desenvolupament d'aquests dos components es produeix per mecanismes o vies cel·lulars diferents a partir d'un esdeveniment comú inicial.

7. CONCLUSIONS

Aquest model quirúrgic d'HD en fetus de conill:

1. És vàlid per a l'estudi de l'HDC ja que els nounats amb HD presenten:
 - a) Una significativa hipoplàsia pulmonar segons els paràmetres morfològics (Pes pulmó, LBWR i RAC).
 - a) Una significativa alteració morfològica (GPA) de les arterioles pulmonars característica de la hipertensió pulmonar.
 - b) Una insuficiència respiratòria neonatal que es manifesta en els paràmetres clínics (S_aO_2 , FC, mortalitat en la 1a hora).
 - c) La seqüència fisiopatològica esperada: hèrnia diafragmàtica, hipoplàsia pulmonar, hipertensió pulmonar amb hipoperfusió pulmonar i insuficiència respiratòria neonatal.

2. Permet avaluar la circulació pulmonar fetal per eco-doppler, essent una tècnica sensible per:
 - a) Detectar el significatiu augment de resistència vascular (PI) i disminució de la perfusió pulmonar (FMBV) que presenten els fetus amb HD.
 - b) Mesurar prenatalment el grau d'hipoplàsia pulmonar mitjançant l'índex de pulsatilitat (PI).

3. Altera el desenvolupament bronquioalveolar i el vascular de forma no harmònica, suggerint que ho fa a través de mecanismes moleculars diferents.

8. **RELLEVÀNCIA I PERSPECTIVES FUTURES**

8.1. **RELLEVÀNCIA**

En primer lloc, el desenvolupament d'aquest model i el seu estudi des de quatre vessants diferents (hemodinàmica, histopatològica, immunohistoquímica i clínica) estableix la base per a l'aprofundiment en cadascun d'aquests aspectes de l'HDC, contribuint al coneixement d'aquesta malformació, especialment des del punt de vista pronòstic i terapèutic.

En segon lloc, la principal rellevància de les nostres troballes ha estat la d'haver relacionat, per primer cop, els paràmetres acceptats d'hipoplàsia pulmonar (que només es poden determinar en teixit pulmonar ex viu, mitjançant biòpsia o necròpsia), amb paràmetres hemodinàmics mesurables de manera incruenta al llarg del desenvolupament fetal. Fins ara, el seguiment ecogràfic del desenvolupament pulmonar a l'HDC s'ha basat en dades antropomètriques (raó pulmó-tòrax; pulmó-perímetre cefàlic=LHR), i tot i que el PI es va suggerir com a indicador de resistències vasculars pulmonars, fins ara les decisions terapèutiques es segueixen prenent en base a la mida relativa del pulmó.

Igualment, la quantificació de la perfusió pulmonar per doppler no s'havia realitzat anteriorment en models d'HDC. Aquesta part de l'estudi ha estat publicada recentment.⁸⁶

Així doncs, els valor dels paràmetres hemodinàmics PI i FMBV estan significativament alterats en els casos d'HDC, i la correlació del PI amb els paràmetres d'hipoplàsia pulmonar, assenyalen que les dades de flux arterial pulmonar són una excel·lent mesura del desenvolupament pulmonar.

8.2. **PERSPECTIVES FUTURES**

El model emprat en aquest projecte té un actiu important que és la possibilitat de realitzar estudis hemodinàmics. Aquesta és una via que cal explorar en profunditat, ja sigui en el model en conill, tan exigent, o bé desenvolupant altres models animals.

Des del punt de vista clínic, les correlacions trobades indiquen que l'hemodinàmica pulmonar fetal s'hauria d'establir en el protocol d'estudi prenatal en l'HDC, per tal de fixar rangs de resistències vasculars i de perfusió pulmonar que ens ajudin a pronosticar el benestar neonatal en pacients amb HDC amb un alt valor predictiu, ja sigui amb aquests paràmetres hemodinàmics individualment o amb la seva combinació amb altres paràmetres morfològics.

Des del punt de vista molecular, queda per esbrinar el paper dels factors de creixement i les seves relacions amb els altres paràmetres; aquesta via no resta tancada. El fet que tinguem mostres congelades de tots els casos ens ofereix la possibilitat de continuar el nostre estudi quan obtinguem el finançament que requereix desenvolupar anticossos específics per al conill. Igualment en aquestes mateixes mostres podem analitzar altres factors que s'identifiquin com a clau en l'etiopatogènia de l'HDC.^{173, 174}

En aquest sentit, seria interessant poder determinar els diferents mediadors i vies moleculars que justifiquin la falta de correlació entre la histopatologia bronquioloalveolar i l'arteriolar.

Des del punt de vista terapèutic, com un segon graó del nostre estudi però realitzat simultàniament, hem fet oclusions traqueals a una part dels fetus amb HD, i hem analitzat els mateixos paràmetres, amb uns interessants resultats que són objecte d'altres dos treballs del nostre equip investigador.

Podem resumir doncs les línies futures més immediates en dos terrenys. Des del punt de vista experimental, aprofundir en els mecanismes moleculars de la HP i la HTP lligada a l'HD. Des del punt de vista clínic, implantar una avaluació hemodinàmica pulmonar fetal sistemàtica per tal de determinar-ne els valors normals, correlacionar-los amb les dades de comportament clínic neonatal, i utilitzar-los per a l'estratificació pronòstica i l'avaluació de la teràpia fetal.

9. **BIBLIOGRAFIA**

1. Colvin J, Bower C, Dickinson JE, Sokol J. Outcomes of congenital diaphragmatic hernia: a population-based study in Western Australia. *Pediatrics* 2005; 116: 356-363.
2. Stege G, Fenton A, Jaffray B. Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 2003; 112: 532-535.
3. Wright JC, Budd JL, Field DJ, Draper ES. Epidemiology and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a 9-year experience. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011; 25: 144-149.
4. Peetsold MG, Heij HA, Kneepkens CM, Nagelkerke EF, Huisman J, Gemke RJ. The long-term follow-up of patients with a congenital diaphragmatic hernia: a broad spectrum of morbidity. *Pediatr Surg Int* 2009; 25: 1-17.
5. de Buys Roessingh AS, Dinh-Xuan AT. Congenital diaphragmatic hernia: current status and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2009; 168: 393-406.
6. Morales, L. Hèrnia diafragmàtica i hipoplàsia pulmonar: frontera en la investigació pediàtrica. *Pediatr Catalana* 2009; 69: 244-249.
7. Campanale RP, Rowland RH. Hypoplasia of the lung associated with congenital diaphragmatic hernia. *Ann Surg* 1955; 142: 176-189.
8. Areechon W, Reid L. Hypoplasia of lung with congenital diaphragmatic hernia. *Br Med J* 1963; 1: 230-233.
9. Tenbrinck R, Gaillard JL, Tibboel D, Kluth D, Lachman B, Molenaar JC. Pulmonary vascular abnormalities in experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* 1992; 27: 862-865.
10. Miniati D. Pulmonary vascular remodeling. *Semin Pediatr Surg* 2007; 16: 80-87.
11. Harrison MR, Bressack MA, Churg AM, de Lorimier AA. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. II. Simulated correction permits fetal lung growth with survival at birth. *Surgery* 1980; 88: 260-268.

12. Adzick NS, Outwater KM, Harrison MR, Davies P, Glick PL, de Lorimier AA *et al.* Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero IV. An early gestational fetal lamb model for pulmonary vascular morphometric analysis. *J Pediatr Surg* 1985; 20: 673-680.
13. Harrison MR, Adzick NS, Longaker MT, Goldberg JD, Rosen MA, Filly RA, *et al.* Successful repair in utero of a fetal diaphragmatic hernia after removal of herniated viscera from the left thorax. *N Engl J Med* 1990; 322: 1582-1584.
14. Harrison MR, Mychaliska GB, Albanese CT, Jennings RW, Farrel JA, Hawgood S, *et al.* Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero IX: fetuses with poor prognosis (liver herniation and low lung-to-head ratio) can be saved by fetoscopic temporary tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1017-1022.
15. Hedrick MH, Estes JM, Sullivan KM, Bealer JF, Kitterman JA, Flake AW, *et al.* Plug the lung until it grows (PLUG): a new method to treat congenital diaphragmatic hernia in utero. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 612-617.
16. Harrison MR, Keller RL, Hawgood SB, Kitterman JA, Sandberg PL, Farmer DL, *et al.* A randomized trial of fetal endoscopic tracheal occlusion for severe fetal congenital diaphragmatic hernia. *N Engl J Med* 2003; 349: 1916-1924.
17. Deprest JA, Flake AW, Gratacos E, Ville Y, Hecher K, Nicolaides K, *et al.* The making of fetal surgery. *Prenat Diagn* 2010; 30: 653-667.
18. Gratacós E. Medicina Fetal. Editorial Médica Panamericana. 1ª Edición. 2007.
19. Keijzer R, Puri P. Congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2010; 19: 180-185.
20. Skari H, Bjornland K, Haugen G, Egeland T, Emblem R. Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 1187-1197.
21. Ackerman KG, Greer JJ. Development of the diaphragm and genetic mouse models of diaphragmatic defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145C: 109-16.
22. Ackerman KG, Vargas SO, Wilson JM, Jennings RW, Kozakewich HP, Pober B. Congenital Diaphragmatic Defects: Proposal for a New Classification Based on Observations in 234 Patients. *Pediatr Dev Pathol* 2012; 15: 265-274.

23. Torfs CP, Curry CJ, Bateson TF, Honoré LH. A population-based study of congenital diaphragmatic hernia. *Teratology* 1992; 46: 555-565.
24. Fauza DO, Wilson JM. Congenital diaphragmatic hernia and associated anomalies: their incidence, identification, and impact on prognosis. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 1113-1117.
25. Peetsold MG, Kneepkens CF, Heij HA, Ijsselstijn H, Tibboel D, Gemke RJ. Congenital Diaphragmatic Hernia: Long-term Risk of Gastroesophageal Reflux Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 51: 448-453.
26. Holder AM, Klaassens M, Tibboel D, Klein A, Lee B, Scott DA. Genetic Factors in Congenital Diaphragmatic Hernia. *American Journal of Human Genetics* 2007; 80: 825-845.
27. Kaiser JR, Rosenfeld CR. A population-based study of congenital diaphragmatic hernia: Impact of associated anomalies and preoperative blood gases on survival. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 1196-1202.
28. Langham MR, Kays DW, Ledbetter DJ, Frentzen B, Sanford LL, Richards DS. Congenital diaphragmatic hernia. Epidemiology and outcome. *Clin Perinatol* 1996; 23: 671-688.
29. Witters I, Legius E, Moerman P, Deprest J, Van Schoubroeck D, Timmerman D *et al.* Associated malformations and chromosomal anomalies in 42 cases of prenatally diagnosed diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet* 2001; 103: 278-282.
30. Moore KL, Persaud TV. The developing human: clinically oriented embryology. Saunders/Elsevier. 8th Edition. 2008.
31. Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol (Berl)* 1984; 169: 133-139.
32. Babiuk RP, Zhang W, Clugston R, Allan DW, Greer JJ. Embryological origins and development of the rat diaphragm. *J Comp Neurol* 2003; 455: 477-487.
33. Unger S, Copland I, Tibboel D, Post M. Down-regulation of sonic hedgehog expression in pulmonary hypoplasia is associated with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol* 2003; 162: 547-555.
34. Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 1--postnatal lung growth. *Thorax* 1982; 37: 572-579.

35. Gosche JR, Islam S, Boulanger SC. Congenital diaphragmatic hernia: searching for answers. *Am J Surg* 2005; 190: 324-332.
36. Losada A, Tovar JA, Xia HM, Diez-Pardo JA, Santisteban P. Down-regulation of thyroid transcription factor-1 gene expression in fetal lung hypoplasia is restored by glucocorticoids. *Endocrinology* 2000; 141: 2166-73.
37. Allan DW, Greer JJ. Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol* 1997; 83: 338-347.
38. Greer JJ, Allan DW, Babiuk RP, Lemke RP. Recent advances in understanding the pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 394-399.
39. Kling DE, Schnitzer JJ. Vitamin A deficiency (VAD), teratogenic, and surgical models of congenital diaphragmatic hernia (CDH). *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145C: 139-157.
40. Mayer S, Metzger R, Kluth D. The embryology of the diaphragm. *Semin Pediatr Surg* 2011; 20: 161-169.
41. Ackerman KG, Pober BR. Congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia: new insights from developmental biology and genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145C: 105-8.
42. Bielinska M, Jay PY, Erlich JM, Mannisto S, Urban Z, Heinkinheimo M, *et al.* Molecular genetics of congenital diaphragmatic defects.. *Ann Med* 2007; 39: 261-274.
43. Major D, Cadenas M, Fournier L, Leclerc S, Lefebvre M, Cloutier R. Retinol status of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 1998; 13: 547-549.
44. Beurskens LW, Tibboel D, Lindemans J, Duvekot JJ, Cohen-Overbeek TE, Veenma DC, *et al.* Retinol status of newborn infants is associated with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 2010; 126: 712-720.
45. Greer JJ, Babiuk RP, Thebaud B. Etiology of congenital diaphragmatic hernia: the retinoid hypothesis. *Pediatr Res* 2003; 53: 726-730.

46. van Loenhout RB, Tibboel D, Post M, Keijzer R. Congenital diaphragmatic hernia: comparison of animal models and relevance to the human situation. *Neonatology* 2009; 96: 137-49.
47. Klaassens M, de Klein A, Tibboel D. The etiology of congenital diaphragmatic hernia: Still largely unknown?. *Eur J Med Gen* 2009; 52: 281-286.
48. Aghabiklooei A, Goodarzi P, Kariminejad MH. Lung hypoplasia and its associated major congenital abnormalities in perinatal death: an autopsy study of 850 cases. *Indian J Pediatr* 2009; 76: 1137-1140.
49. Kinane TB. Lung development and implications for hypoplasia found in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145C: 117-124.
50. Murdock AI, Burrington JB, Swyer PR. Alveolar to arterial oxygen tension difference and venous admixture in newly born infants with congenital diaphragmatic herniation through the foramen of Bochdalek. *Biol Neonate* 1971; 17: 161-172.
51. Kitagawa M, Hislop A, Boyden EA, Reid L. Lung hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. A quantitative study of airway, artery, and alveolar development. *Br J Surg* 1971; 58: 342-346.
52. Asabe K, Toki N, Hashimoto S, Suita S, Sueishi K. An Immunohistochemical Study of the Expression of Surfactant Apoprotein in the Hypoplastic Lung of Rabbit Fetuses Induced by Oligohydramnios. *Am J Pathol* 1994; 145: 631-639.
53. Keller RL. Antenatal and postnatal lung and vascular anatomic and functional studies in congenital diaphragmatic hernia: implications for clinical management. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145C: 184-200.
54. Mohseni-Bod H, Bohn D. Pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2007; 16: 126-133.
55. O'Toole SJ, Irish MS, Holm BA, Glick PL. Pulmonary vascular abnormalities in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 1996; 23: 781-794.
56. Beals DA, Schloo BL, Vacanti JP, Reid LM, Wilson JM. Pulmonary growth and remodeling in infants with high-risk congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1992; 27: 997-1001.

57. Muratore CS, Wilson JM. Congenital diaphragmatic hernia: where are we and where do we go from here?. *Semin Perinatol* 2000; 24: 418-428.
58. Shehata SM, Sharma HS, Mooi WJ, Tibboel D. Pulmonary hypertension in human newborns with congenital diaphragmatic hernia is associated with decreased vascular expression of nitric-oxide synthase. *Cell Biochem Biophys* ; 44: 147-155.
59. Shehata SM, Mooi WJ, Okazaki T, Sharma HS, Shehata SM, Tibboel D. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in lungs of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypertension. *Thorax* 1999; 54: 427-431.
60. de Rooij JD, Hösgör M, IJzendoorn Y, Rottier R, Groenman FA, Tibboel D, *et al.* Expression of Angiogenesis-related Factors in Lungs of Patients with Congenital Diaphragmatic Hernia and Pulmonary Hypoplasia of Other Causes. *Pediatr Dev Pathol* ; 7: 468-477.
61. Reid LM. Lung growth in health and disease. *Br J Dis Chest* 1984; 78: 113-134.
62. Peetsold MG, Huisman J, Hofman VE, Heij HA, Raat H, Gemke RJ. Psychological outcome and quality of life in children born with congenital diaphragmatic hernia. *Arch Dis Child* 2009; 94: 834-840.
63. Askenazi SS, Perlman, M. Pulmonary hypoplasia: lung weight and radial alveolar count as criteria of diagnosis. *Arch Dis Child* 1979; 54: 614-618.
64. Thibeault DW, Haney B. Lung volume, pulmonary vasculature, and factors affecting survival in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 1998; 101: 289-295.
65. Taira Y, Yamataka T, Miyazaki E, Puri P. Comparison of the pulmonary vasculature in newborns and stillborns with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 1998; 14: 30-35.
66. Sokol J, Bohn D, Lacro RV, Ryan G, Stephens D, Rabinovitch M, *et al.* Fetal pulmonary artery diameters and their association with lung hypoplasia and postnatal outcome in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 1085-1090.
67. Brown SD, Ecker JL, Ward JR, Halpern EF, Sayeed SA, Buchmiller TL, *et al.* Prenatally diagnosed fetal conditions in the age of fetal care: does who counsels matter?. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206: 1-11.

68. Jani J, Keller RL, Benachi A, Nicolaides KH, Favre R, Gratacos E, *et al.* Antenatal-CDH-Registry Group. Prenatal prediction of survival in isolated left-sided diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006; 27: 18-22.
69. Ba'ath ME, Jesudason EC, Losty PD. How useful is the lung-to-head ratio in predicting outcome in the fetus with congenital diaphragmatic hernia? A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 30: 897-906.
70. Ruano R, Aubry MC, Barthe B, Dumez Y, Zugaib B, Benachi A. Three-dimensional sonographic measurement of contralateral lung volume in fetuses with isolated congenital diaphragmatic hernia. *J Clin Ultrasound* 2008; 36: 273-278.
71. Jani J, Peralta CF, Van Schoubroeck D, Deprest J, Nicolaides KH. Relationship between lung-to-head ratio and lung volume in normal fetuses and fetuses with diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006; 27: 545-550.
72. Deprest JA, Nicolaides K, Gratacos E. Fetal surgery for congenital diaphragmatic hernia is back from never gone. *Fetal Diagn Ther* 2011; 29: 6-17.
73. Jani J, Cannie M, Done E, van Mieghem T, van Schoubroeck D, Gucciardo L, *et al.* Relationship between lung area at ultrasound examination and lung volume assessment with magnetic resonance imaging in isolated congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 30: 855-860.
74. Barnewolt CE, Kunisaki SM, Fauza DO, Nemes LP, Estroff JA, Jennings RW. Percent predicted lung volumes as measured on fetal magnetic resonance imaging: a useful biometric parameter for risk stratification in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 193-197.
75. Cannie M, Jani J, Meersschaert J, Allegaert K, Done E, Marchal G, *et al.* Prenatal prediction of survival in isolated diaphragmatic hernia using observed to expected total fetal lung volume determined by magnetic resonance imaging based on either gestational age or fetal body volume. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 32: 633-639.
76. Mayer S, Klaritsch P, Petersen S, Done E, Sandaite I, Till H, *et al.* The correlation between lung volume and liver herniation measurements by fetal MRI in isolated congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Prenat Diagn* 2011; 31: 1086-1096.

77. Thébaud B, Tibboel D. Pulmonary hypertension associated with congenital diaphragmatic hernia. *Cardiol Young* 2009; 19 Suppl 1: 49-53.
78. Suda K, Bigras JL, Bohn D, Hornberger LK, McCrindle BW. Echocardiographic predictors of outcome in newborns with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 2000; 105: 1106-1109.
79. Takahashi S, Oishi Y, Ito N, Nanba Y, Tsukamoto K, Nakamura T, *et al.* Evaluating mortality and disease severity in congenital diaphragmatic hernia using the McGoon and pulmonary artery indices. *J Pediatr Surg* 2009; 44: 2101-2106.
80. Vuletin JF, Lim FY, Cnota J, Kline-Fath B, Salisbury S, Haberman B, *et al.* Prenatal pulmonary hypertension index: novel prenatal predictor of severe postnatal pulmonary artery hypertension in antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2010; 45: 703-708.
81. Moreno-Alvarez O, Hernandez-Andrade E, Oros D, Jani J, Deprest J, Gratacos E. Association between intrapulmonary arterial Doppler parameters and degree of lung growth as measured by lung-to-head ratio in fetuses with congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 164-170.
82. Laudy JA, Tibboel D, Robben SG, Krijger RR, Ridder MA, Wladimiroff JW. Prenatal Prediction of Pulmonary Hypoplasia: Clinical, Biometric, and Doppler Velocity Correlates. *Pediatrics* 2002; 109: 250-258.
83. Mahieu-Caputo D, Aubry MC, El Sayed M, Joubin L, Thalabard JC, Dommergues M. Evaluation of Fetal Pulmonary Vasculature by Power Doppler Imaging in Congenital Diaphragmatic Hernia. *J Ultrasound Med* 2004; 23: 1011-1017.
84. Cruz-Martinez R, Moreno-Alvarez O, Hernandez-Andrade E, Castañon M, Done E, Martinez JM, *et al.* Contribution of intrapulmonary artery Doppler to improve prediction of survival in fetuses with congenital diaphragmatic hernia treated with fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 35: 572-577.
85. Hernandez-Andrade E, Jansson T, Ley D, Bellander M, Persson M, Lingman G, *et al.* Validation of fractional moving blood volume measurement with power Doppler ultrasound in an experimental sheep model. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004; 23: 363-368.

86. Cruz-Martínez R, Moreno-Alvarez O, Hernández-Andrade E, Castañón M, Martínez JM, Done E, *et al.* Changes in Lung Tissue Perfusion in the Prediction of Survival in Fetuses with Congenital Diaphragmatic Hernia Treated with Fetal Endoscopic Tracheal Occlusion. *Fetal Diagn Ther* 2011; 29: 101-107.
87. Moreno-Alvarez O, Cruz-Martinez R, Hernandez-Andrade E, Done E, Gómez O, Deprest J, *et al.* Lung tissue perfusion in congenital diaphragmatic hernia and association with the lung-to-head ratio and intrapulmonary artery pulsed Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 35: 578-582.
88. Ruano R, Aubry MC, Barthe B, Mitanchez D, Dumez Y, Benachi A, *et al.* Quantitative analysis of fetal pulmonary vasculature by 3-dimensional power Doppler ultrasonography in isolated congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1720-1728.
89. Iocono JA, Cilley RE, Mauger DT, Krummel TM, Dillon PW. Postnatal pulmonary hypertension after repair of congenital diaphragmatic hernia: predicting risk and outcome. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 349-353.
90. Muratore CS, Kharasch V, Lund DP, Sheils C, Friedman S, Brown C, *et al.* Pulmonary morbidity in 100 survivors of congenital diaphragmatic hernia monitored in a multidisciplinary clinic. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 133-140.
91. Dillon PW, Cilley RE, Mauger D, Zachary C, Meier A. The relationship of pulmonary artery pressure and survival in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 307-312.
92. Stefanutti G, Filippone M, Tommasoni N, Midrio P, Zuccheta P, Moreolo G, *et al.* Cardiopulmonary anatomy and function in long-term survivors of mild to moderate congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 526-531.
93. Golombek SG. The history of congenital diaphragmatic hernia from 1850s to the present. *J Perinatol* 2002; 22: 242-246.
94. Irish MS, Holm BA, Glick PL. Congenital diaphragmatic hernia. A historical review. *Clin Perinatol* 1996; 23: 625-653.
95. Lally KP, Bagolan P, Hosie S, Lally PA, Stewart M, Cotten CM, *et al.* Corticosteroids for fetuses with congenital diaphragmatic hernia: can we show benefit?. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 668-674.

96. Doi T, Sugimoto K, Pur P. Prenatal retinoic acid up-regulates pulmonary gene expression of COUP-TFII, FOG2, and GATA4 in pulmonary hypoplasia. *J Pediatr Surg* 2009; 44: 1933-1937.
97. Li J, Hu T, Liu W, Xiang B, Jiang X. Effect of epidermal growth factor on pulmonary hypoplasia in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 37-42.
98. Baptista MJ, Melo-Rocha G, Pedrosa C, Gonzaga S, Teles A, Estevao-Costa J, *et al.* Antenatal vitamin A administration attenuates lung hypoplasia by interfering with early instead of late determinants of lung underdevelopment in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 658 - 665.
99. Cigdem MK, Kizil G, Onen A, Kizil M, Nergiz Y, Celik Y. Is there a role for antioxidants in prevention of pulmonary hypoplasia in nitrofen-induced rat model of congenital diaphragmatic hernia?. *Pediatr Surg Int* 2010; 26: 401-406.
100. Xu C, Liu W, Chen Z, Wang Y, Xiong Z, Ji Y. Effect of prenatal tetrandrine administration on transforming growth factor-[beta]1 level in the lung of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *J Pediatr Surg* 2009; 44: 1611-1620.
101. Tovar JA, Qi B, Diez-Pardo JA, Alfonso LF, Arnaiz A, Alvarez FJ *et al.* Thyroid hormones in the pathogenesis of lung hypoplasia and immaturity induced in fetal rats by prenatal exposure to nitrofen. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 1295-1297.
102. Luong C, Rey-Perra J, Vadivel A, Gilmour G, Sauve Y, Koonen D, *et al.* Antenatal sildenafil treatment attenuates pulmonary hypertension in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Circulation* 2011; 123: 2120-2131.
103. Harrison MR, Jester JA, Ross NA. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. I. The model: intrathoracic balloon produces fatal pulmonary hypoplasia. *Surgery* 1980; 88: 174-182.
104. Harrison MR, Ross NA, de Lorimier AA. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. III. Development of a successful surgical technique using abdominoplasty to avoid compromise of umbilical blood flow. *J Pediatr Surg* 1981; 16: 934-942.
105. Harrison MR, Adzick NS, Flake AW, Jennings RW, Estes JM, MacGillivray TE, *et al.* Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero: VI. Hard-earned lessons. *J Pediatr Surg* 1993; 28: 1411-1417.

106. Harrison MR, Adzick NS, Bullard KM, Farrell JA, Howell LJ, Rosen MA *et al.* Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero VII: a prospective trial. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 1637-1642.
107. Potter EL, Bohlender GP. Intrauterine respiration in relation to the development of the fetal lung. *Am J Obstet Gynecol* 1941; 142: 14-22.
108. Carmel JA, Friedman F, Adams FH. Fetal Tracheal Ligation and Lung Development. *Am J Dis Child* 1965; 109: 452-456.
109. DiFiore JW, Wilson JM. Lung development. *Semin Pediatr Surg* 1994; 3: 221-232.
110. VanderWall KJ, Bruch SW, Meuli M, Kohl T, Szabo Z, Adzick NS *et al.* Fetal endoscopic ('Fetendo') tracheal clip. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 1101-1103.
111. Skarsgard ED, Meuli M, VanderWall KJ, Bealer JF, Adzick NS, Harrison MR. Fetal endoscopic tracheal occlusion ('Fetendo-PLUG') for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 1335-1338.
112. O'Toole SJ, Sharma A, Karamanoukian HL, Holm B, Azizkhan RG, Glick PL. Tracheal ligation does not correct the surfactant deficiency associated with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 546-550.
113. Deprest JA, Flemmer AW, Gratacos E, Nicolaides K. Antenatal prediction of lung volume and in-utero treatment by fetal endoscopic tracheal occlusion in severe isolated congenital diaphragmatic hernia. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009; 14: 8-13.
114. Saura L, Castañón M, Prat J, Albert A, Caceres F, Moreno J, *et al.* Impact of fetal intervention on postnatal management of congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg* 2007; 17: 404-407.
115. Ruano R, Yoshisaki CT, da Silva MM, Ceccon ME, Grasi MS, Tannuri U, *et al.* A randomized controlled trial of fetal endoscopic tracheal occlusion versus postnatal management of severe isolated congenital diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2012; 39: 20-27.
116. Mayer S, Kluth D, Till H, Deprest J. Fetoscopic surgery as prenatal intervention for isolated congenital diaphragmatic hernia. *Zentralbl Chir* 2009; 134: 502-506.
117. Reiss I, Schaible T, van den Hout L, Capolupo I, Allagaert K, van Heijst A, *et al.* CDH EURO Consortium. Standardized postnatal management of infants with congenital

- diaphragmatic hernia in Europe: the CDH EURO Consortium consensus. *Neonatology* 2010; 98: 354-364.
118. Migliazza L, Bellan C, Alberti D, Auriemma A, Burgio G, Locatelli G, *et al.* Retrospective study of 111 cases of congenital diaphragmatic hernia treated with early high-frequency oscillatory ventilation and presurgical stabilization. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 1526-1532.
119. Hirschl RB, Philip WF, Glick L, Greenspan J, Smith K, Thompson A, *et al.* A prospective, randomized pilot trial of perfluorocarbon-induced lung growth in newborns with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 283-289.
120. Bagolan P, Casaccia G, Crescenzi F, Nahon A, Trucchi A, Giorlandino C. Impact of a current treatment protocol on outcome of high-risk congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 313-318.
121. Kinsella JP, Truog WE, Walsh WF, Goldberg RN, Bancalari E, Mayock DE, *et al.* Randomized, multicenter trial of inhaled nitric oxide and high-frequency oscillatory ventilation in severe, persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1997; 131: 55-62.
122. Brown KL, Sriram S, Ridout D, Cassidy J, Pandya H, Liddle M, *et al.* Extracorporeal membrane oxygenation and term neonatal respiratory failure deaths in the United Kingdom compared with the United States: 1999 to 2005. *Pediatr Crit Care Med* 2010; 11: 60-65.
123. Guner YS, Khemani RG, Qureshi FG, Wee CP, Austin MT, Dorey F, *et al.* Outcome analysis of neonates with congenital diaphragmatic hernia treated with venovenous vs venoarterial extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Surg* 2009; 44: 1691-1701.
124. Sebald M, Friedlich P, Burns C, Stein J, Noori S, Ramanathan S, *et al.* Risk of need for extracorporeal membrane oxygenation support in neonates with congenital diaphragmatic hernia treated with inhaled nitric oxide. *J Perinatol* 2004; 24: 143-146.
125. Moyer V, Moya F, Tibboel D, Losty P, Nagaya M, Lally KP. Late versus early surgical correction for congenital diaphragmatic hernia in newborn infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 5: 1-14.

126. Langer JC, Filler RM, Bohn DJ, Shandling B, Ein SH, Wesson DE, *et al.* Timing of surgery for congenital diaphragmatic hernia: is emergency operation necessary?. *J Pediatr Surg* 1988; 23: 731-734.
127. Lao OB, Crouthamel MR, Goldin AB, Sawin RS, Waldhausen JH, Kim SS. Thoracoscopic repair of congenital diaphragmatic hernia in infancy. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2010; 20: 271-6.
128. Ferreira CG, Reinberg O, Becmeur F, Allal H, De Lagausie P, Lardy H, *et al.* Neonatal minimally invasive surgery for congenital diaphragmatic hernias: a multicenter study using thoracoscopy or laparoscopy. *Surg Endosc* 2009; 23: 1650-1659.
129. Bliss D, Matar M, Krishnaswami M. Should Intraoperative Hypercapnea or Hypercarbia Raise Concern in Neonates Undergoing Thoracoscopic Repair of Diaphragmatic Hernia of Bochdalek?. *J Laparoendosc Adv Surg Tech* 2009; 19: 1-4.
130. The Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. Estimating disease severity of congenital diaphragmatic hernia in the first 5 minutes of life. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 141-145.
131. Sinha CK, Islam S, Patel S, Nicolaidis K, Greenough A, Davenport M. Congenital diaphragmatic hernia: prognostic indices in the fetal endoluminal tracheal occlusion era. *J Pediatr Surg* 2009; 44: 312-316.
132. Ilce Z, Celayir S. Modified Ventilatory Index (MVI) in newborns with congenital diaphragmatic hernia (CDH). *Indian Pediatr* 2003; 40: 920-920.
133. Mullassery D, Ba'ath ME, Jesudason EC, Losty PD. Value of liver herniation in prediction of outcome in fetal congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 35: 609-614.
134. Jani J, Nicolaidis KH, Keller RL, Benachi A, Peralta CF, Favre R, *et al.* Antenatal-CDH-Registry Group. Observed to expected lung area to head circumference ratio in the prediction of survival in fetuses with isolated diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 30: 67-71.
135. Jani J, Nicolaidis KH, Benachi A, Moreno o, Favre R, Gratacos E, *et al.* Timing of lung size assessment in the prediction of survival in fetuses with diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 37-40.

136. Cruz-Martinez R, Castañon M, Moreno-Alvarez O, Acosta-Rojas R, Martinez JM, Gratacos E. Usefulness of lung-to-head ratio and intrapulmonary Doppler in predicting neonatal morbidity in fetuses with congenital diaphragmatic hernia treated with fetoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 59-65.
137. Casaccia G, Crescenzi F, Dotta A, Capolupo I, Braguglia A, Danhaive O, *et al.* Birth weight and McGoon Index predict mortality in newborn infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 25-28.
138. Crankson SJ, Al Jadaan SA, Namshan MA, Al-Rabeeah AA, Oda O. The immediate and long-term outcomes of newborns with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 2006; 22: 335-340.
139. Jancelewicz T, Vu LT, Keller RL, Bratton B, Lee H, Farmar D, *et al.* Long-term surgical outcomes in congenital diaphragmatic hernia: observations from a single institution. *J Pediatr Surg* 2010; 45: 155-160.
140. Fisher JC, Jefferson RA, Arkovitz MS, Stolar CJ. Redefining outcomes in right congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 373-379.
141. Abdullah F, Zhang Y, Sciortino C, Camp M, Gabre-Kidan A, Price MR, *et al.* Congenital diaphragmatic hernia: outcome review of 2,173 surgical repairs in US infants. *Pediatr Surg Int* 2009; 25: 1059-1064.
142. Keijzer R, Liu J, Deimling J, Tibboel D, Post M. Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol* 2000; 156: 1299-1306.
143. Babiuk RP, Thébaud B, Greer JJ. Reductions in the incidence of nitrofen-induced diaphragmatic hernia by vitamin A and retinoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: 970-973.
144. Okazaki T, Sharma HS, Aikawa M, Yamataka A, Nagai R, Miyano T, *et al.* Pulmonary expression of vascular endothelial growth factor and myosin isoforms in rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 391-394.
145. Montedonico S, Sugimoto K, Felle P, Bannigan J, Puri P. Prenatal treatment with retinoic acid promotes pulmonary alveologenesis in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 500-507.

146. Baird R, Khan N, Flageole H, Anselmo M, Puligandlia P, Laberge JM. The Effect of Tracheal Occlusion on Lung Branching in the Rat Nitrofen CDH Model. *J Surg Res* 2008; 148: 224-229.
147. Tannuri U, Maksoud-Filho JG, Santos MM, Tannuri AC, Rodrigues CJ, Rodrigues AJ. The effects of prenatal intraamniotic surfactant or dexamethasone administration on lung development are comparable to changes induced by tracheal ligation in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1198-1205.
148. Roubliova XI, Lewi PJ, Verbeken EK, Vaast P, Jani JC, Lu H, *et al.* The effect of maternal betamethasone and fetal tracheal occlusion on pulmonary vascular morphometry in fetal rabbits with surgically induced diaphragmatic hernia: a placebo controlled morphologic study. *Prenat Diagn* 2009; 29: 674-681.
149. Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Chen MF, Piedboeuf B. Pulmonary structural maturation and pulmonary artery remodeling after reversible fetal ovine tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 739-744.
150. Lipsett J, Cool JC, Runciman SC, Ford WD, Parsons DW, Martin AJ. Effect of immediate versus slow intrauterine reduction of congenital diaphragmatic hernia on lung development in the sheep: a morphometric analysis of term pulmonary structure and maturity. *Pediatr Pulmonol* 2000; 30: 228-240.
151. DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Peters CA, Kackler JC, Wilson JM. Experimental fetal tracheal ligation reverses the structural and physiological effects of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 248-257.
152. Deprest J, Gratacos E, Nicolaides KH. Fetoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe congenital diaphragmatic hernia: evolution of a technique and preliminary results. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2004; 24: 121-126.
153. Wild YK, Piasecki GJ, Paepe ME, Luks FI. Short-term tracheal occlusion in fetal lambs with diaphragmatic hernia improves lung function, even in the absence of lung growth. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 775-779.
154. Wu J, Yamamoto H, Gratacos E, Ge X, Verbeken E, Sueishi K. Lung development following diaphragmatic hernia in the fetal rabbit. *Hum Reprod* 2000; 15: 2483-2488.

155. Roubliova XI, Verbeken E, Wu J, Yamamoto H, Lerut T, Tibboel D, *et al.* Pulmonary vascular morphology in a fetal rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 1066-1072.
156. Roubliova XI, Verbeken EK, Wu J, Vaast P, Jani J, Deprest JA. Effect of tracheal occlusion on peripheral pulmonary vessel muscularization in a fetal rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191: 830-836.
157. Kikkawa Y, Motoyama EK, Gluck L. Study of the lungs of fetal and newborn rabbits. Morphologic, biochemical, and surface physical development. *Am J Pathol* 1968; 52: 177-210.
158. Roubliova XI, Biard JM, Ophalvens L, Gallot D. Morphology of the developing fetal lung-The rabbit experimental model. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* 2007: 417-425.
159. Julià V. Cicatrización de las heridas en el feto: estudio experimental. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. 1991.
160. Albert A. Efectos del líquido amniótico y la constricción de las asas en la gastrosquisis. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. 1994.
161. Margarit J. Efecto de la orina del líquido amniótico sobre el intestino de los fetos con gastrosquisis: estudio experimental. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. 1998.
162. Laudy JA. Doppler ultrasonography of the human fetal pulmonary circulation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 99: 3-5.
163. Thompson RS, Trudinger BJ. Doppler waveform pulsatility index and resistance, pressure and flow in the umbilical placental circulation: An investigation using a mathematical model. *Ultrasound Med Biol* 1990; 16: 449-458.
164. Welsh A. Quantification of power Doppler and the index 'fractional moving blood volume' (FMBV). *Ultrasound Obstet Gynecol* 2004; 23: 323-326.
165. Sylvester KG, Rasanen J, Kitano Y, Flake AW, Crombleholme TM, Adzick NS. Tracheal occlusion reverses the high impedance to flow in the fetal pulmonary circulation and normalizes its physiological response to oxygen at full term. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1071-1075.

166. Cruz-Martinez R, Moreno-Alvarez O, Prat J, Krauel L, Tarrado X, Castñón M, *et al.* Lung tissue blood perfusion changes induced by in utero tracheal occlusion in a rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther* 2009; 26: 137-142.
167. Fauza DO, Tannuri U, Ayoub AA, Capelozzi VL, Saldiva PH, Maksoud JG. Surgically produced congenital diaphragmatic hernia in fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 882-886.
168. Roubliova XI, Deprest JA, Biard JM, Ophalvens L, Gallot D, Jani JC, *et al.* Morphologic changes and methodological issues in the rabbit experimental model for diaphragmatic hernia. *Histol Histopathol* 2010; 25: 1105-1116.
169. Emery JL, Mithal A. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child* 1960; 35: 544-547.
170. Dubiel M, Hammid A, Breborowicz A, Pietryga M, Sladkevicius P, Olofsson PA, *et al.* Flow index evaluation of 3-d volume flow images: An in vivo and in vitro study. *Ultrasound Med Biol* 2006; 32: 665-671.
171. Kay JM. Comparative morphologic features of the pulmonary vasculature in mammals. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 53-57.
172. Vuckovic A, Roubliova XI, Votino C, Naeije R, Jani JC. Signaling molecules in the fetal rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 2012; 47: 1088-1096.
173. Boucherat O, Benachi A, Barlier-Mur AM, *et al.* Decreased Lung Fibroblast Growth Factor 18 and Elastin in Human Congenital Diaphragmatic Hernia and Animal Models. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 1066-1077.
174. Boucherat O, Franco-Montoya ML, Delacourt C, Martinovic J, Masse V, Elie C. Defective angiogenesis in hypoplastic human fetal lungs correlates with nitric oxide synthase deficiency that occurs despite enhanced angiopoietin-2 and VEGF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 298: L849-L856.
175. Hösgör M, Ijzendoorn Y, Mooi WJ, Tibboel D, De Krijger RR. Thyroid transcription factor-1 expression during normal human lung development and in patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 1258-1262.

