



# Correlació entre l'hemodinàmica, la morfometria, la histoquímica i l'estat neonatal en un model d'hèrnia diafragmàtica tractada amb oclusió traqueal

Jordi Prat Ortells

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.

Correlació entre  
l'hemodinàmica, la  
morfometria, la  
histoquímica i l'estat  
neonatal en un model  
d'hèrnia diafragmàtica  
tractada amb oclusió  
traqueal

---

Jordi Prat Ortells

# ÍNDIX

|   | Pàgina       |
|---|--------------|
| Índex de figures i taules   | 4-5          |
| Abreviatures  | 6            |
| <b>I. Introducció</b>   | <b>7-45</b>  |
| 1. Evolució històrica   | 7-11         |
| 2. Epidemiologia  | 12-13        |
| 3. Etiopatogènia: per què té lloc l'HD?   | 14-16        |
| 4. Fisiopatologia   | 17-18        |
| 5. Embriologia: com es formen els pulmons i el diafragma?   | 19-25        |
| a. La formació del diafragma  | 19-21        |
| b. El desenvolupament pulmonar  | 21-24        |
| c. El desenvolupament vascular pulmonar   | 24-25        |
| 6. El desenvolupament en una situació d'hèrnia diafragmàtica.<br>Justificació de la hipoplàsia pulmonar i la hipertensió pulmonar<br>associades | 26           |
| 7. El tractament prenatal de l'hèrnia diafragmàtica   | 27-45        |
| a. Tractaments fetals: 50 anys d'història   | 27-30        |
| b. Justificació del tractament fetal de l'HD  | 31-32        |
| c. Models animals d'HD  | 33-34        |
| d. Història de la cirurgia fetal experimental de l'HD   | 35-36        |
| e. L'evidència científica de l'oclusió traqueal en l'HD   | 36-40        |
| f. La pràctica de l'oclusió traqueal fins als nostres dies  | 40-45        |
| <b>II. Justificació</b>   | <b>46</b>    |
| <b>III. Hipòtesis i objectius</b>   | <b>47</b>    |
| <b>IV. Material i mètode</b>  | <b>48-56</b> |
| 1. Àmbit, acreditació, col·laboradors, permisos i finançament   | 48           |
| 2. Subjectes d'estudi   | 48           |
| 3. Disseny  | 48-49        |
| 4. Variables de l'estudi  | 49           |
| 5. Metodologia detallada  | 50-56        |
| a. Primera cirurgia fetal   | 50-51        |
| b. Segona cirurgia fetal  | 52           |

|              |   |                |
|--------------|---|----------------|
| c.           | Recollida dels fetus                                | 52             |
| d.           | Avaluació funcional                                 | 53             |
| e.           | Processament de les mostres                         | 53             |
| f.           | Estudi hemodinàmic                                  | 54             |
| g.           | Estudi histològic                                   | 54             |
| h.           | Estudi immunohistoquímic                            | 55-56          |
| i.           | Càlculs estadístics                                 | 56             |
| <b>V.</b>    | <b>Resultats</b>                                    | <b>57-73</b>   |
| 1.           | El model animal                                     | 57             |
| 2.           | Estudi hemodinàmic                                  | 57-59          |
| 3.           | Situació neonatal                                   | 59-62          |
| 4.           | Morfologia descriptiva                              | 62-67          |
| 5.           | Anàlisi immunohistoquímica                          | 68             |
| 6.           | Correlació de variables de diferents tipus          | 69-73          |
| <b>VI.</b>   | <b>Discussió dels resultats</b>                     | <b>74-102</b>  |
| 1.           | Anàlisi del model i validesa interna                | 74-78          |
| a.           | Sobre el model animal                               | 74-75          |
| b.           | Validesa del model d'hèrnia diafragmàtica en conill | 75-77          |
| c.           | L'oclusió traqueal                                  | 77-78          |
| 2.           | Anàlisi dels resultats obtinguts                    | 79-102         |
| a.           | La valoració hemodinàmica                           | 79-84          |
| b.           | L'oxigenació neonatal                               | 84-85          |
| c.           | Descripció morfològica                              | 85-94          |
| i.           | Valoració de la hipoplàsia pulmonar                 | 85-88          |
| ii.          | Valoració de les mesures arterials                  | 89-94          |
| d.           | L'estudi immunohistoquímic                          | 95-97          |
| e.           | Relació dels diferents apartats entre si            | 98-102         |
| <b>VII.</b>  | <b>Conclusions</b>                                  | <b>103</b>     |
| <b>VIII.</b> | <b>Bibliografia</b>                                 | <b>104-124</b> |

## ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

|  | <b>Pàgina</b> |
|--|---------------|
| <b>Taula 1:</b> Resum de les principals fites en la història de l'HD                 | 11            |
| <b>Taula 2:</b> Resum de l'evidència que implica la genètica com a causa de l'HD     | 16            |
| <b>Taula 3:</b> Resum cronològic de l'embriologia dels pulmons i del diafragma       | 24            |
| <b>Taula 4:</b> Requisits d'una patologia per ser susceptible de tractament prenatal | 28            |
| <b>Taula 5:</b> Indicacions actuals de la cirurgia fetal                             | 30            |
| <b>Taula 6:</b> Simplificació de la Figura 4   | 32            |
| <b>Taula 7:</b> Indicacions actuals de l'EXIT  | 43            |
| <b>Taula 8:</b> Resum de les variables de l'estudi                                   | 49            |
| <b>Taula 9:</b> Resum de les dades de la situació neonatal                           | 60            |
| <b>Taula 10:</b> Resum de la distribució de l'AMT                                    | 65            |
|  |               |
| <b>Figura 1:</b> Fisiopatologia de la hipertensió pulmonar persistent en l'HD        | 17            |
| <b>Figura 2:</b> Esquema del desenvolupament de l'arbre traqueobronquial             | 23            |
| <b>Figura 3:</b> Fases del desenvolupament pulmonar                                  | 23            |
| <b>Figura 4:</b> Corba de supervivència dels fetus amb HD esquerra                   | 32            |
| <b>Figura 5:</b> Alguns dels gens implicats en l'HD de l'ésser humà                  | 34            |
| <b>Figura 6:</b> Distribució del PI segons els grups                                 | 58            |
| <b>Figura 7:</b> Distribució del FMBV segons els grups                               | 58            |
| <b>Figura 8:</b> Correlació entre PI i FMBV  | 59            |
| <b>Figura 9:</b> Distribució del SatO <sub>2</sub> segons els grups                  | 61            |
| <b>Figura 10:</b> Distribució del FC segons els grups                                | 61            |
| <b>Figura 11:</b> Correlació entre SatO <sub>2</sub> i FC                            | 62            |
| <b>Figura 12:</b> Distribució del LBWR segons els grups                              | 63            |
| <b>Figura 13:</b> Distribució del RAC segons els grups                               | 63            |
| <b>Figura 14:</b> Correlació entre RAC i LBWR  | 64            |
| <b>Figura 15:</b> Distribució de l'AMT segons els grups                              | 65            |
| <b>Figura 16:</b> Distribució de l'AMT segons el diàmetre de l'arteriola             | 67            |
| <b>Figura 17:</b> Western blot   | 68            |
| <b>Figura 18:</b> Correlació entre SatO <sub>2</sub> i AMT                           | 69            |
| <b>Figura 19:</b> Correlació entre FC i LBWR   | 70            |
| <b>Figura 20:</b> Correlació entre RAC i PI  | 70            |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 21:</b> | Correlació entre AMT i FMBV   | 71 |
| <b>Figura 22:</b> | Correlació entre LBWR i PI  | 71 |
| <b>Figura 23:</b> | Correlació entre LBWR i FMBV  | 72 |
| <b>Figura 24:</b> | Correlació entre LBWR i AMT   | 72 |
| <b>Figura 25:</b> | Correlació entre RAC i FMBV   | 72 |
| <b>Figura 26:</b> | Correlació entre AMT i PI   | 73 |
| <b>Figura 27:</b> | Correlació entre RAC i AMT  | 73 |
| <b>Figura 28:</b> | Comparació entre el desenvolupament pulmonar de l'humà i del conill | 74 |
| <b>Figura 29:</b> | Resum de les gràfiques principals que comparen els grups HD i N     | 76 |
| <b>Figura 30:</b> | Distribució del PI i FMBV segons els grups (incloent N)             | 82 |
| <b>Figura 31:</b> | Distribució de l'AMT segons el diàmetre arteriolar (incloent N)     | 90 |
| <b>Figura 32:</b> | Gràfiques del treball de Roubllova et al(117)                       | 91 |
| <b>Figura 33:</b> | Resum dels principals efectes de l'OT                               | 94 |
| <b>Figura 34:</b> | Distribució de les mostres segons el diàmetre arteriolar            | 99 |

## ABREVIATURES

AMT (*arterial muscular thickness*): gruix de la capa muscular d'una artèria o arteriola (pulmonar)

CDH (*congenital diaphragmatic hernia*): hèrnia diafragmàtica congènita

CHAOS (*congenital high airway obstructive syndrome*): síndrome de l'obstrucció congènita alta –habitualment laringe o tràquea- de la via aèria principal. La causa sol ser intrínseca, com ara una atrèsia de laringe o traqueal (per una membrana...). Tot i que el comportament dels fetus és similar no se sol incloure en aquesta denominació als fetus amb una compressió de la via aèria per un tumor o als que se'ls realitza una oclusió traqueal

DE: diàmetre extern (d'un vas)

DI: diàmetre intern

FMBV (*fractional moving blood volume*): fracció de sang en moviment

HD: hèrnia diafragmàtica

LBWR (*lung to body weight ratio*): quocient entre el pes dels pulmons i el pes fetal

PEDRF (*peak of early diastolic reversed flow*): mesura de l'ona de pols vascular que quantifica el primer pic de flux revers que apareix durant la diàstole

PI (*pulsatility index*): Índex de pulsatilitat

PMSSF (*peak of maximum systolic speed flow*): paràmetre hemodinàmic que representa la velocitat màxima del flux sanguini durant la sístole

PPF (*pleuroperitoneal folds*): membranes o plects pleuroperitoneals

RAC (*radial alveolar count*): recompte alveolar radial

SG: setmanes de gestació

TO (*tracheal occlusion*): oclusió traqueal

## I. INTRODUCCIÓ

L'hèrnia diafragmàtica (HD) és una malformació greu, relativament freqüent i associada a una morbiditat i mortalitat elevades. La visió tradicional de l'HD ha estat la d'un forat o un defecte del diafragma a través del qual les vísceres abdominals ascendien al tòrax i comprimien els pulmons i el cor. Es pensava que això feia que el nadó amb HD tingués un compromís ventilatori i circulatori. D'acord amb aquesta visió tradicional, si les vísceres es retornaven al seu lloc i el defecte del diafragma es tancava, el nadó amb HD es podria curar completament. Per aquest motiu, inicialment l'HD interessava més als cirurgians que no pas als pediatres o neonatòlegs. La realitat, però, és molt més complexa i l'interès sobre aquesta patologia s'ha estès a molts altres especialistes: cirurgians pediàtrics, neonatòlegs, obstetres i cirurgians fetals, principalment.

### 1. Evolució històrica:

Revisar l'evolució del coneixement sobre l'HD al llarg del temps és una bona manera de començar a endinsar-nos en aquesta malformació. Podem arribar a diferenciar cinc períodes en el coneixement de l'HD. Muratone(1) ofereix un resum històric excel·lent que m'ha servit de base per a aquest apartat. Totes les dades històriques que no associen una cita concreta han estat extretes d'aquesta revisió.

El primer període comprèn des de les primeres observacions fins al 1900. El caracteritzen la descripció (clínica i patològica) i el diagnòstic de la malformació. La primera referència a una HD fou l'any 1579, quan el prestigiós cirurgià Ambroise Paré anuncià la troballa d'una HD en dues autòpsies(2). Fins llavors es desconeixia totalment l'existència d'aquestes hèrnies. No fou fins un segle més tard que Lazarus Riverius (1679) va descriure una HD congènita en l'estudi postmortem d'un jove de 24 anys(2). Holt, el 1701, fou el primer en reportar un cas d'HD en un nen. Més tard, el 1761, Morgagni va descriure diferents tipus d'HD, entre elles la que encara duu el seu nom(3). El mateix Morgagni va reconèixer que Sthehelinus fou el primer en observar la hipoplàsia pulmonar associada a l'HD. El 1827, Cooper va descriure la simptomatologia, anatomia i classificació de l'HD. Uns anys més tard, el 1834, Laënc (que ha passat a la història de la medicina per inventar l'estetoscop) suggereix que es podria fer el diagnòstic d'HD per l'auscultació del tòrax i llança la hipòtesi que una laparotomia podria ser l'abordatge necessari per restablir l'anatomia normal. Bowditch, el 1847, fou el primer en diagnosticar una HD a la capçalera del pacient. Ja llavors



diferenciava la gravetat del quadre entre aquells que es morien en néixer, els que podrien viure uns quants mesos i aquells en què la malformació es manifesta casualment anys després d'haver dut una vida normal. El 1848, Bochdalek, professor d'anatomia a Praga, va notar que l'HD sol ocórrer a través d'un defecte posterolateral del diafragma. Bochdalek postulà que l'hèrnia tenia lloc per la ruptura intraúter de la membrana localitzada al triangle lumbocostal, hipòtesi que l'embriologia moderna no recolza. És en el seu honor que l'HD posterolateral duu el nom de Bochdalek.

La segona era s'inicia, aproximadament, amb el segle XX. Ve caracteritzada pels primers intents de reparació quirúrgica. Naumann, el 1888, fou el primer en realitzar una laparotomia per corregir la malformació, tot i que sense èxit. O'Dwyer, a Nova York, intervingué una HD estrangulada en un nen de tres anys i mig. A ell s'atribueix el concepte de la "pèrdua del dret d'espai", en ser-li gairebé impossible reduir el contingut herniat a l'abdomen degut al poc volum de la cavitat abdominal. Heidenhain, a l'Alemanya de 1909, fou el responsable de la primera reparació amb èxit d'una HD en un nen de 9 anys. Aquests intents de correcció quirúrgica eren anecdòtics. La majoria de pacients amb HD en el primer quart del segle XX no rebien cap tractament. En aquesta època la visió fisiopatològica de l'hèrnia es reduïa a la compressió progressiva del pulmó per les vísceres abdominals i la desviació del mediastí(4). Hedbolm, el 1925, després de revisar una llarga sèrie d'hèrnies diafragmàtiques arriba a la conclusió que el 75% dels infants no tractats moren abans del mes de vida. D'aquí sorgeix el concepte de reparació precoç. Holt i Howland, en un llibre sobre malalties del lactant i el nen descriuen que els símptomes d'HD són dificultat respiratòria, cianosi i respiració ràpida, un abdomen excavat i un tòrax sobredistès; també descriuen el paper de la radiologia en el diagnòstic d'HD(5):

*"Children often live but a few hours. In those who survive a longer time, dyspnea is generally the most prominent symptom. It may be constant, or occur at intervals in severe paroxysms, or there may be attacks of cyanosis produced by an accumulation of gas in the stomach or the thoracic part of the intestine. The physical signs vary much from time to time. Sometimes those of pneumothorax are present; at others there is so much dullness with the feeble respiratory sounds, as to suggest fluid. A positive diagnosis can often be made by means of the X-ray after the administration of bismuth. The condition is not amenable of treatment."*

Bettman i Hass, el 1929, intervingueren amb èxit un nadó de 3 mesos.

Malgrat informes anecdòtics de reparacions amb bons resultats d'hèrnies diafragmàtiques, la cirurgia no esdevingué un tractament acceptat fins que Ladd i Gross publicaren una sèrie de 16 casos d'HD intervingudes en les primeres 48 hores

de vida amb un 56% de supervivència(6). El 1946, Gross publicà el primer cas de reparació amb èxit en un nounat de menys de 24 hores(7).

Precisament amb els treballs de Ladd i Gross s'inicia la tercera era en l'evolució de l'HD. Ells assenyalen la conveniència de reduir el contingut del tòrax a l'abdomen abans que les vísceres es distenguin, i també emfatitzen la importància del control postoperatori. En aquesta etapa l'hèrnia és considerada una emergència neonatal, una malaltia quirúrgica i s'advoca per la reparació immediata. L'any 1953, Gross afirmava que seguint els seus principis, es podria assolir una taxa de supervivència del 90-95%(8). Aquest dogma persistirà fins al 1980.

Els resultats, però, no eren tan bons com se suposava, i la mortalitat, aparentment, augmentava. Els diagnòstics més precoços (fins i tot prenatals), juntament amb reanimacions més agressives i el transport ràpid fins als centres quirúrgics fan que molts nadons que abans haurien mort siguin portats a la taula d'operacions.

A dia d'avui, sabem que la mortalitat de l'HD es relaciona amb el grau d'hipoplàsia pulmonar i la hipertensió pulmonar.

El 1921, Koms ja reconeix la importància de la hipoplàsia pulmonar. El 1953, Campanale i Rowland destaquen la hipoplàsia pulmonar en la fisiopatologia de l'HD(9). La relació entre hipoplàsia pulmonar i mortalitat fou descrita el 1963 per Areechor i Reid(10). D'altra banda, Murdock, Rowe i Uribe publiquen que la principal anormalitat de l'HD és la hipertensió pulmonar persistent(11;12).

La quarta etapa en el coneixement de l'HD comença sobre el 1980. Lentament neix la idea que l'HD representa més una emergència fisiològica que no pas quirúrgica. A mesura que augmenta el coneixement de la fisiopatologia de l'HD i les cures intensives neonatals esdevenen més sofisticades, s'arriba a la conclusió que el risc vital més important de l'HD prové de la inestabilitat fisiològica. El maneig inicial de l'HD passa de la cirurgia neonatal immediata a l'estabilització inicial i una cirurgia diferida.

Un treball de Rudolf i Yuan demostrava que l'arbre vascular pulmonar del nounat és sensible als canvis de PaCO<sub>2</sub> i de pH(13).

Drummond va demostrar que augmentant el pH per sobre de 7,5 i reduint la PaCO<sub>2</sub> a menys de 30mmHg es podia revertir el flux de sang a través del ductus arteriós que hi havia en els nadons amb hipertensió pulmonar persistent(14). Com a conseqüència d'això, la hiperventilació va esdevenir el tractament de la hipertensió pulmonar persistent. Com que el nounat amb HD associa una hipertensió pulmonar amb un *shunt* de dreta a esquerra a través del ductus, Vacanti va proposar, el 1984, que la

hiperventilació i l'alcalinització fos l'estratègia inicial d'estabilització dels nadons amb HD, alhora que va publicar molt bons resultats amb aquest maneig(15).

És en aquesta època on emmarquem els inicis de l'ECMO (oxigenació amb membrana extracorpòria) pels nadons amb destret respiratori. Ràpidament l'ECMO fou aplicada a aquells nadons amb hèrnia que no responien al tractament amb hiperventilació (amb ventilació mecànica convencional) i alcalinització.

També és a la dècada dels 80 quan s'inicia la teràpia fetal experimental per a l'HD. El fonament de la cirurgia fetal en aquell moment es basava en la idea que es tractava d'una malformació amb diagnòstic prenatal la reparació intraúter de la qual evitaria el desenvolupament de la hipoplàsia pulmonar i la hipertensió pulmonar associades a l'HD. En aquesta primera fase s'intentava una reparació fetal completa de la malformació, similar a la cirurgia convencional del nounat. Més tard, dedicaré tot un apartat a explicar l'evolució dels tractaments fetals.

Des de la dècada dels 90 i fins ara, podem considerar que ens trobem en la cinquena etapa de l'HD. La hiperventilació i l'alcalinització característiques de l'etapa anterior s'assolien al preu de grans pressions de ventilació i d'un gran risc de barotrauma secundari. L'any 1985, Wung *et al* publiquen un treball on una sèrie de nadons amb hipertensió pulmonar persistent assolia una supervivència del 100% quan es limitava la pressió de la ventilació mecànica i s'ignorava la hipercapnia (*"permissive hypercapnia"*)(16). Aquesta idea es va traslladar a l'HD i, a poc a poc, va substituir el maneig anterior. El mateix Wung va publicar, el 1995, supervivències superiors al 90% en nounats amb HD (diagnosticades abans de les 12 hores de vida) seguint els principis d'evitar el barotrauma, hipercapnia permissiva i cirurgia diferida(17). Molts altres centres han confirmat millors resultats amb aquesta estratègia, que avui en dia és l'estàndard del tractament de l'hèrnia diafragmàtica a la majoria dels centres de tercer nivell de tot el món.

Aquells primers intents de reparació d'una HD mitjançant una cirurgia fetal oberta van fracassar. La cirurgia fetal era factible i tenia bons resultats només en les HD de bon pronòstic (sense herniació hepàtica). En aquests casos, però, el resultat del tractament convencional ja era igualment bo sense les complicacions de la cirurgia fetal: una cirurgia uterina agressiva per a la mare i la prematuritat del nadó. Els únics pacients per als quals la cirurgia fetal tenia sentit (aquells amb el fetge herniat al tòrax) eren impossibles de corregir. Els intents per reduir el fetge a l'abdomen comportaven una reposició angulada de la vena umbilical, el flux de la qual quedava parcial o totalment

obstruït, cosa que causava la mort del fetus(18). Així, doncs, la cirurgia fetal oberta per a l'HD es va abandonar definitivament(19).

A mitjans de la dècada dels 90, però, sorgeix una nova tècnica de tractament fetal per a l'HD: l'oclusió traqueal. D'aquest tema, en parlaré extensament una mica més endavant.

**Taula 1:** Resum de les principals fites en la història de l'HD

| <b>Període</b>   | <b>Esdeveniments fonamentals</b>  |
|------------------|---|
| Fins al 1900     | - Primeres descripcions de la malformació.  |
| 1900-1940        | - Primeres reparacions quirúrgiques (èxits aïllats; la mort dels pacients segueix essent la norma).   |
| 1940-1980        | - Treballs de Ladd i Gross.<br>- L'HD és considerada una emergència quirúrgica.<br>- Per primera vegada hi ha bons resultats de forma consistent.   |
| 1980-1990        | - Evidència que la reparació immediata només permet rescatar un petit grup de pacients (inferior al que s'esperava).<br>- Canvi d'estratègia: estabilització inicial i cirurgia diferida.<br>- Hiperventilació i alcalinització com a pauta d'estabilització.<br>- Inici de l'ECMO.<br>- Primers intents de cirurgia fetal oberta (correcció completa). |
| A partir de 1990 | - Canvi d'objectiu en l'estabilització inicial: evitar el barotrauma, hipercàpnia permissiva.<br>- Fracàs de la cirurgia fetal oberta per a l'HD, que s'abandona definitivament.<br>- Desenvolupament de l'oclusió traqueal com a teràpia fetal.  |

## 2. Epidemiologia:

És molt difícil oferir dades epidemiològiques que ens donin l'abast del què suposa aquesta malformació. L'any 1978, Harrison va introduir el concepte de la mortalitat oculta de l'HD(20). Amb aquesta idea feia referència a l'aparent discrepància entre les taxes de supervivència que llavors publicaven els centres de prestigi i la realitat. La realitat és que hi ha molts casos d'HD que no arriben a tractar-se perquè s'han mort o s'han perdut abans. Quan només es tenen en compte els casos tractats o operats, el resultat final sempre és molt millor. Aquells fetus amb hèrnia la gestació dels quals s'ha interromput, o que neixen morts, o bé moren en néixer, o durant al trasllat als centres de referència no queden reflectits en les estadístiques dels centres terciaris. Aquests són els casos d'HD que s'inclouen en la mortalitat oculta. Només quan estudiem tots els casos d'HD a la població (incloent els avortaments, fetus i nounats morts) som conscients de la veritable gravetat d'aquesta patologia. Per exemple, un estudi poblacional publicat l'any 2011 ofereix una supervivència global a l'any de vida de només un 42% de tots els casos d'HD(21).

La prevalença de la malformació segons es deriva d'una meta-anàlisi sobre 14 estudis poblacionals és d'1/4000 naixements(22). Aquest mateix estudi conclou que la mortalitat d'aquells amb diagnòstic prenatal és del 75%, la mortalitat de tots els casos de la població d'un 58%, i la mortalitat postnatal oculta a la població (aquells nadons que no arriben al centre de referència) un 35% del total dels casos. És a dir, encara ara, l'hèrnia diafragmàtica és una malformació terrible, amb un molt mal pronòstic global. Els estudis poblacionals demostren que, malgrat la introducció de mesures de suport molt sofisticades (com l'ECMO), la mortalitat global de l'hèrnia diafragmàtica encara es troba entre el 50% i el 60% de tots els casos, i no ha variat gairebé gens en els darrers anys(22-25). Aquestes xifres de mortalitat tan altes són degudes a l'alt índex de gestacions interrompudes davant del diagnòstic prenatal d'hèrnia diafragmàtica.

L'hèrnia diafragmàtica aïllada és aquella en què l'hèrnia és l'única malformació major aparent. Hi ha altres anomalies, tals com la hipoplàsia pulmonar, la malrotació intestinal, o la hipoplàsia de cavitats esquerres, que sovint coexisteixen amb l'hèrnia i poden considerar-se part de la seqüència de la malformació(26).

Les hèrnies diafragmàtiques complexes associen altres malformacions majors, i formen part d'alguna síndrome o alteració cromosòmica o bé tenen una constel·lació de malformacions associades. Suposen un 30-40% dels casos d'hèrnia(22). La seva

mortalitat, igualment, és molt més elevada degut a què augmenta el nombre d'avortaments, el dels fetus morts, sovint les malformacions associades comporten una mortalitat neonatal superior o bé, simplement, a aquests tipus de pacients no se'ls ofereix un tractament tan agressiu.

### 3. Etiopatogènia: per què té lloc l'HD?

Encara hi ha moltes incògnites sobre quin és el desencadenant tant de l'hèrnia diafragmàtica com de la hipoplàsia pulmonar i de la hipertensió pulmonar associades a aquesta malformació. Com ja hem vist, durant molts anys es va creure que la simple compressió de les vísceres era la responsable de la hipoplàsia pulmonar i del mal pronòstic secundari de l'HD, per això s'havia proposat la reparació urgent. Tanmateix, l'ús de diversos models animals d'hèrnia ens ha fet comprendre millor la seva patogènia. Avui en dia, circulen diverses teories sobre la causa primera de l'hèrnia diafragmàtica. Les següents són algunes de les més representatives:

- Iritani(27) suggereix que la greu situació que comporta l'hèrnia diafragmàtica es deu a un mal desenvolupament del pulmó ipsilateral. El fonament de la teoria rau en què en el seu treball sobre un model murí d'HD amb nitrofè observa que les anormalitats als pulmons tenen lloc abans i tot que el diafragma es comenci a formar. Altres autors també han confirmat aquestes troballes: el mal desenvolupament del pulmó precedeix al del diafragma en el mateix model d'HD(28;29). Tot i això, podem trobar treballs recents que no confirmen aquesta suposició(30).
- També s'havia suggerit que el nervi frènic podia tenir un paper en l'hèrnia diafragmàtica, i que en alguns casos l'HD podria arribar a ser la conseqüència d'una alteració del desenvolupament d'aquest nervi(31). Tanmateix, ha quedat demostrat que l'atròfia del nervi frènic és més la conseqüència de l'HD que no pas la seva causa(32).
- Alguns autors es preguntaven si l'hèrnia diafragmàtica podria respondre a un defecte de les fibres musculars del diafragma, ja fos perquè fossin molt escasses o bé més dèbils. Cap model animal no ha pogut demostrar aquesta hipòtesi(33).
- Seguint una idea bàsica de l'embriologia del diafragma (que tot seguit explicarem), s'havia postulat que l'hèrnia diafragmàtica podria ser la conseqüència de l'absència de tancament dels canals pleuroperitoneals. Tanmateix, els estudis amb un model d'HD i nitrofè demostren que el defecte diafragmàtic resultant en aquests casos és més medial del que s'esperaria trobar amb una manca de tancament dels canals pleuroperitoneals i ja s'observen altres anomalies abans i tot que aquests canals es tanquin(34).

- De manera més subtil, una altra teoria sobre l'origen de l'HD apunta a la part mesenquimatosa amuscular del diafragma, que deriva dels plec pleuroperitoneals, com a responsable del defecte diafragmàtic(35).
- Unificant algunes de les teories anteriors, una teoria mixta, postulada per Keijzer(29), suggereix que la situació final dels nadons amb HD és la resultant de dos accidents independents (*dual-hit hypothesis*). El primer d'aquests accidents (*first hit*) actua sobre el desenvolupament del pulmó. D'aquesta manera, ja hi ha una hipoplàsia pulmonar de base que és bilateral. Sobre aquesta base anatòmica alterada, la compressió toràcica que provoquen les vísceres herniades és el segon impacte (*second hit*). Aquest segon insult actua principalment sobre la banda afectada, i és la conseqüència de l'alteració de la formació del diafragma. Alguns autors rebutgen aquesta hipòtesi, i suggereixen que el primer impacte només és la conseqüència de l'exposició al nitrofè, i no pas de la seva relació amb el desenvolupament de l'HD(30).

La recerca de la causa primera que desencadena tota la malformació encara es pot portar un pas més enrere. Malgrat que l'estudi exhaustiu s'escapa a l'objectiu d'aquesta revisió, hi ha prou evidència per pensar que en alguns casos d'hèrnia diafragmàtica, si no en molts, la genètica hi té un paper clau. Aquesta evidència és més clara en els casos sindròmics d'hèrnia diafragmàtica, alguns dels quals presenten una alteració genètica ja coneguda. També s'ha suggerit una causa genètica en alguns casos aïllats d'HD. Aquesta idea es basa en què hi ha famílies on apareixen molts casos d'HD aparentment aïllades, hi ha models genètics d'HD en ratolins transgènics, i fins i tot un gen, el FOG2, identificat i relacionat amb una HD aïllada tant en ratolins com en humans(36).

A més a més, hi ha models animals que han demostrat gens comuns regulant el desenvolupament del diafragma i dels pulmons. Això avala la teoria que la hipoplàsia pulmonar de l'HD també es pot produir de forma primària per afectació d'algun d'aquests gens(36-38).

A partir d'aquí, alguns investigadors pronostiquen que les mutacions en un o diversos gens, de forma aïllada o com a resultat de la seva interacció amb factors ambientals, seran identificades com a desencadenants de l'HD. Aquests gens hauran de ser estudiats i determinar si es corresponen a diferents baules d'una cadena de transmissió de senyals i també si poden ser útils com a dianes per a futures teràpies(26).



**Taula 2:** Resum de l'evidència que implica la genètica com a causa de l'HD(26)

| TABLE I. Summary of Evidence Supporting Genetic Causation of CDH |  |
|--|--|
| Evidence of genetic contributions to human CDH                   | Examples   |
| Genetic mouse models of CDH                                      | <i>Fog2<sup>a</sup>, Coupff2, Wt1<sup>a</sup>, Slit3, Gata4</i>  |
| Monogenic syndromes associated with CDH                          | Syndromes caused by known genes: de Lange, Simpson-Golabi-Behmel, Spondylocostostal dysplasia<br>Syndromes caused by unknown genes: Fryns, Donnai-Barrow |
| Multiplex human kindreds with CDH                                | Familial clustering consistent with AR and XL inheritance  |
| Co-occurrence of CDH with other congenital malformations         | CDH co-exists with CVMs, NTDs, and limb defects more often than expected by chance   |
| Recurring chromosome abnormalities and CDH                       | 'Large' aneuploidy-iso12p, trisomy 18;<br>'Small' aneuploidy-del 15(q26), del 8(p23)   |

AR, autosomal recessive; CVMs, cardiovascular malformations; NTDs, neural tube defects; XL, X-linked.  
<sup>a</sup>Mutation in human homologue found in association with CDH.

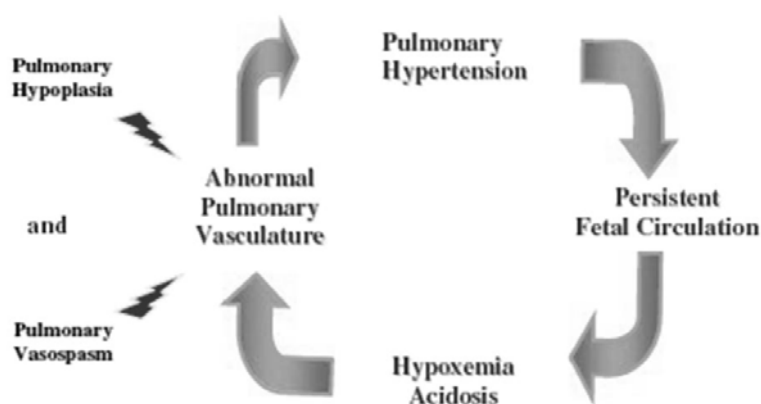
Hi ha excel·lents revisions bibliogràfiques sobre el “*el gen de l'HD*” que sintetitzen les diferents síndromes genètiques associades a HD així com les mutacions que s'han relacionat amb aquesta malformació. En aquest sentit voldria destacar els treballs de Pober(26;39), Beurskens(40), Holder(41) i Kantarci(42).

#### 4. Fisiopatologia:

L'hèrnia diafragmàtica és una malformació que es caracteritza per una situació fetal i neonatal d'hipoplàsia pulmonar bilateral (més a la banda afectada), tant parenquimatosa com vascular(43). Precisament, la hipoplàsia pulmonar i la hipertensió pulmonar persistent són les principals causes de mort en l'hèrnia diafragmàtica(44-46).

La coexistència d'aquests dos fenòmens (hipoplàsia pulmonar i hipertensió pulmonar) és lògica, considerant que l'arbre vascular es desenvolupa de forma paral·lela a l'arbre bronquial(43;47;48) .

De forma pràctica, quan el nadó amb hèrnia neix, ho fa amb uns vasos pulmonars molt sensibles als canvis metabòlics com ara la hipòxia, l'acidosi, la hipercàpnia o la hipocàpnia(49). Aquesta resposta vascular exagerada en un pacient amb hipoplàsia pulmonar (i un intercanvi de gasos compromès) és la que dóna lloc a una situació d'hipertensió pulmonar (HTP). La HTP és la responsable del manteniment d'una circulació fetal, amb *shunt* de sang de dreta a esquerra a través del ductus arteriós permeable i del foramen oval. La manca d'unitats alveolars efectives per a fer un recanvi de gasos eficient és responsable de la hipercàpnia, mentre que la hipertensió pulmonar probablement ho és de la hipoxèmia, degut al *shunt* dreta-esquerra. Degut a l'extrema sensibilitat del to vascular pulmonar la hipoxèmia genera un cercle viciós que perpetua la hipertensió pulmonar i, novament, més hipoxèmia. Les crisis mantingudes i refractàries d'hipertensió pulmonar són les que portaran el pacient a la mort. El següent esquema, resumeix aquest cercle viciós(45).



**Figura 1:** Fisiopatologia de la hipertensió pulmonar persistent a l'HD.

El maneig neonatal actual pretén, inicialment, establir el pacient. Això vol dir evitar que aquest cercle es desencadeni, o intentar trencar-lo o minimitzar-ne els seus efectes. Podem actuar a diversos nivells sobre aquesta situació condicionada per l'HD(50;51). Per exemple:

- La hipercàpnia permissiva, i la ventilació amb alta freqüència pretenen minimitzar el barotrauma. D'aquesta manera podem reclutar de forma efectiva el màxim d'unitats respiratòries de què disposi el pacient.
- L'òxid nítric és un modulador del to vascular pulmonar i promou una caiguda de les resistències pulmonars. Quan es produeix una HTP sostinguda, amb *shunt* de sang de dreta a esquerra, l'ús de l'òxid nítric inhalat ha demostrat la seva utilitat. A llarg termini, hi ha altres fàrmacs, com el sildenafil, que també tenen com a efecte disminuir la HTP.
- L'ECMO és una tècnica de suport vital de rescat, molt invasiva i que pretén deixar tranquils els pulmons i l'arbre vascular mentre es dona temps a què es resolgui la situació d'hipertensió pulmonar inicial. Aquesta teràpia és controvertida en l'HD i, conceptualment, cal aplicar-la només a aquells pacients en què es consideri que la situació d'HTP és transitòria i que podria arribar a millorar si l'organisme es veu descarregat de l'esforç ventilatori i circulatori.
- Els casos més greus d'HD tenen una base anatòmica tan pobre que resulta incompatible amb la vida. Això ho poden provocar uns pulmons tan hipoplàsics que no continguin ni les mínimes unitats respiratòries necessàries per a fer un intercanvi de gasos suficient per suportar la vida, o bé uns vasos pulmonars extraordinàriament poc reactius i rígids, sense capacitat de distendre's en cap situació, ni tan sols després de l'administració de fàrmacs vasodilatadors. A la pràctica, aquesta situació s'observa en nònats que en cap moment no han aconseguit una saturació d'oxigen adequada (Sat O<sub>2</sub> preductal superior a 80% en algun moment de la vida) malgrat tots els nostres esforços; també es pot veure en pacients que tot i ser capaços d'oxigenar i rentar el CO<sub>2</sub> de forma acceptable mantenen una hipertensió pulmonar suprasistèmica de forma fixa i invariable, cosa que condiona un empitjorament de la situació respiratòria, hemodinàmica i, finalment, la mort. Aquests pacients sense un substrat anatòmic suficient no són candidats a ECMO.

## 5. Embriologia dels pulmons i el diafragma

Els nadons amb HD han sofert un error en el desenvolupament dels pulmons i del diafragma. Saber com es formen aquests òrgans en el subjecte sa és bàsic per tal de poder entendre què passa en el cas d'una hèrnia diafragmàtica amb aquestes estructures.

L'embriologia clàssica, que trobem en la majoria de llibres publicats, està basada en l'estudi descriptiu de fetus en diverses fases de maduració. Explica que el diafragma deriva de la fusió de 4 estructures embrionàries: el septum transversum, les membranes pleuroperitoneals, el mesoderm de la paret del cos i el mesènquima que envolta l'esòfag. Segons la descripció clàssica, el ribet muscular perifèric provindria del mesoderm de la paret del cos, mentre que el mesènquima esofàgic donaria lloc als pilars del diafragma(52-54).

Els models experimentals amb ratolins *knockout* permeten veure quin és l'efecte real de la supressió d'algun gen regulador clau(55;56). Gràcies a ells, hem hagut de revisar les idees embriològiques clàssiques. Per exemple, sabem que tot el teixit muscular del diafragma prové de cèl·lules miogèniques que han migrat fins a una estructura diana: els plects pleuroperitoneals. Aquestes cèl·lules arrossegueu la seva inervació: els corresponents axons del nervi frènic. Des dels plects pleuroperitoneals, les fibres musculars es distribueixen per tot el diafragma(57;58).

A continuació, ofereixo una visió integrada de l'embriologia del diafragma i els pulmons tal i com jo l'entenc (fusionant els conceptes clàssics amb l'evidència científica actual).

### a. La formació del diafragma(54)

El diafragma es forma entre la quarta i la vuitena setmana d'edat embrionària(44). El nostre punt de partida és un embrió en forma de disc pla. Aquest disc creix i es plega sobre si mateix per donar lloc a una estructura en forma de fus, com un peix. El seu creixement posterior és asimètric i més ràpid al cap, cosa que condiona un plec cefàlic. Per tant, algunes estructures que s'han format a nivell cervical són arrossegades per aquest plec cefàlic cap a una posició més caudal. Aquest és el cas del *septum transversum*, que serà una de les estructures més importants en la formació del diafragma. El *septum transversum* és un engruïment del mesoderm cefàlic que apareix el dia 22 de gestació. El plegament cefàlic, però, l'acabarà situant

entre la regió cardiogènica i el coll del sac vitel·lí (més planerament, entre el cor i el futur cordó umbilical). El creixement del *septum transversum* dividirà la cavitat celòmica en una cavitat toràcica i una peritoneal. El *septum transversum* es fixa per davant i els costats a la paret del cos, mentre que posteriorment s'adhereix al mesènquima de l'intestí anterior (el futur esòfag).

Gairebé de forma simultània, durant la 5ena setmana, apareixen dos septes en el pla sagital que separaran la cavitat pericàrdica primitiva en les cavitats pleurals i pericàrdica. Aquests septes creixen entre el cor i els pulmons en desenvolupament, fins que al final de la 5ena setmana es fusionen amb el mesènquima de l'intestí anterior. D'aquesta forma, la cavitat toràcica queda dividida en dues cavitats pleurals i una cavitat pericàrdica totalment tancada. Les cavitats pleurals primitives i la cavitat peritoneal estan comunicades per dos grans forats dorsolaterals: els canals pleuroperitoneals.

Encara hi ha una tercera estructura important en la formació del diafragma. Es tracta d'unes membranes o plecs pleuroperitoneals (PPF o *pleuroperitoneal folds*) que apareixen al llarg de la 5ena setmana. Connecten l'arrel de la 12ena costella amb les puntes de les costelles 7-12. Aquestes *membranes* pleuroperitoneals creixen ventralment fins a fusionar-se amb el *septum transversum*, al final de la 7ena setmana. D'aquesta manera es tanquen definitivament els canals pleuroperitoneals, al voltant de la vuitena setmana. El canal pleuroperitoneal esquerre és més gran i es tanca més tard que el dret.

S'ha vist que els plecs pleuroperitoneals són importants perquè són el teixit diana d'una població de cèl·lules immigrants que donaran lloc a tot el teixit muscular del diafragma. Aquestes cèl·lules musculars precursors (mioblasts) tenen el seu origen en els miòtoms cervicals 3-5, i arrossegaran la seva inervació segmentària, els axons del nervi frènic (que per això té un origen en les arrels cervicals anteriors C3-C5)(57;59). Des dels plecs pleuroperitoneals, aquestes cèl·lules musculars s'estendran fins a poblar tot el diafragma.

En models animals d'HD (fonamentalment el de rosegadors tractats amb nitrofè) s'ha vist que els fetus amb HD tenen una alteració en el desenvolupament dels plecs pleuroperitoneals(34;35;55;58).

Alguns autors diferencien dins de les anomenades membranes pleuroperitoneals una part específica que anomenen PHMP (de l'anglès *posthepatic mesenchymal plate*). Per ells, els PPF només són una petita part, de forma triangular, que participa en la

formació del diafragma i que està en íntima relació amb el PHMP. La idea subjacent és la mateixa, però amb una mica més de detall. És el PHMP el que concretament queda afectat en els fetus amb HD, mentre que per aquests autors, els PPF no es modifiquen en aquesta malformació(30). Amb independència de com anomenem aquesta estructura (PHMP o PPF), el que sí que és constant és la seva identificació com a la part més alterada en el desenvolupament del diafragma als fetus amb HD.

Tot aquest procés tan complex de formació del diafragma està acabat sobre la setmana 10 d'embriogènesi. Sembla clar que l'HD s'ha de originar abans d'aquesta setmana.

#### b. El desenvolupament pulmonar(52;53;60)

Aproximadament el dia 22 postconcepció apareix una protrusió ventral de l'intestí anterior: el primordi respiratori, que creixerà en sentit ventrocaudal.

Entre els dies 26-28 es produeix la primera divisió, donant lloc a les gemmes bronquials dreta i esquerra. D'aquesta manera es defineix la laringe i la tràquea per sobre d'aquesta ramificació (la carina), i els bronquis principals dret i esquerre caudalment. La següent divisió, al principi de la 5ena setmana, dona lloc a tres gemmes bronquials secundàries a la dreta i dues a l'esquerra, cosa que determinarà els futurs lòbuls pulmonars. A la sisena setmana aquests bronquis lobars generaran els bronquis segmentaris (deu a cada banda). Aquestes ramificacions principals són les que tenen lloc durant el període embrionari de desenvolupament pulmonar.

Entre la 6ena i 16ena setmana, durant el període pseudoglandular, l'arbre respiratori experimentarà fins a 14 ramificacions més, essent la darrera els bronquíols terminals. Així doncs, entre la 4a i la 16ena setmana de gestació (corresponents als períodes embrionari i pseudoglandular del desenvolupament pulmonar) l'arbre traqueobronquial ha experimentat una nova divisió bronquial per cada setmana de gestació, aproximadament.

La següent fase en el desenvolupament pulmonar normal succeeix entre les 13 i 25 setmanes de gestació. És l'anomenat període canalicular. La seva aparició té lloc en direcció cefalocaudal, és a dir, succeeix primer en els bronquíols més cefàlics. No ens ha d'estranyar, doncs, que hi hagi una coincidència temporal amb el final de la fase prèvia. En aquesta fase els bronquíols terminals es divideixen en dos o més bronquíols

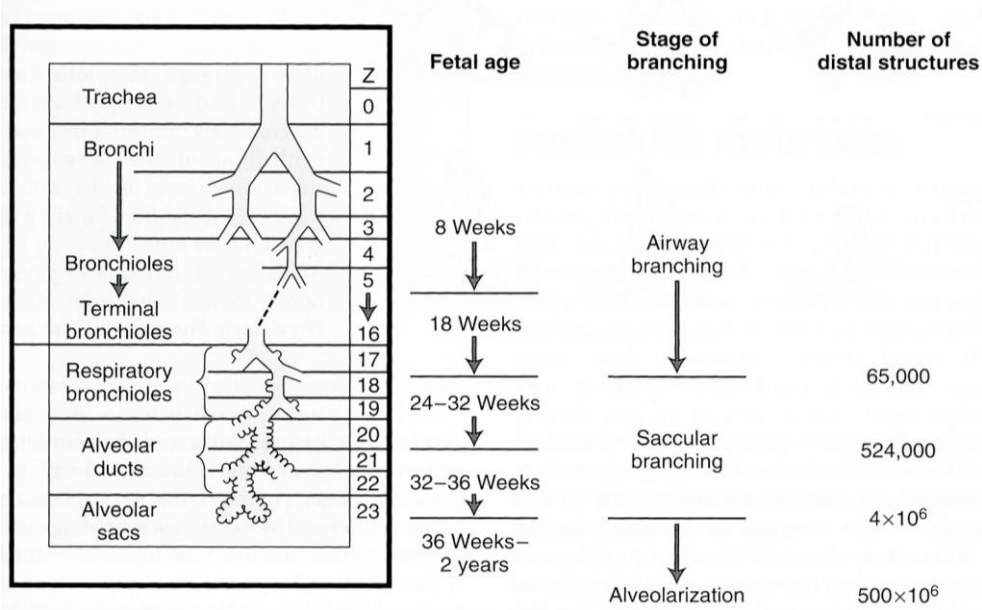
respiratoris, alhora que el mesoderma que envolta aquestes estructures es vascularitza intensament.

Les setmanes des de la 24 fins al naixement comprenen el període sacular. En aquesta fase els bronquíols respiratoris produeixen una darrera generació de branques romes: els sacs terminals. La formació de sacs terminals no s'acaba fins ben entrada la infància: just abans del naixement hi ha entre 20 i 70 milions de sacs terminals, mentre que el pulmó adult en conté entre 300 i 400 milions. En aquesta fase hi ha dos canvis molt significatius que permetrien una respiració relativament eficaç en cas de part prematur:

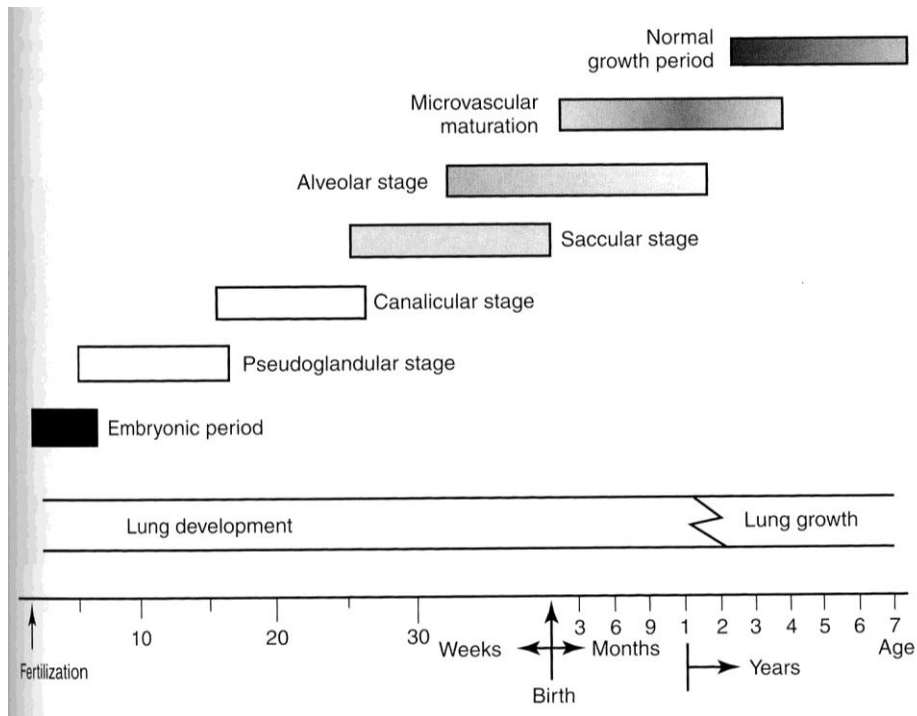
- Un aprimament de l'epiteli cúbic dels espais respiratoris juntament amb l'aparició de pneumòcits tipus II, que secretaran surfactant.
- Una proliferació dels capil·lars sanguinis pulmonars, que ja protrueixen cap als sacs terminals. Aquest fet és indicatiu de la màxima proximitat entre la via respiratòria i la circulació pulmonar.

La darrera fase del desenvolupament pulmonar, el període alveolar, comprèn des de les 29 setmanes fins als 8 anys. Es caracteritza per la maduració dels sacs terminals. Els sacs es revesteixen d'una densa xarxa de capil·lars i formen els alvèols primitius. L'epiteli dels alvèols primitius s'anirà aprimant progressivament (ja després del naixement) per donar lloc als alvèols madurs. La formació d'alvèols immadurs té lloc fins als 8 anys d'edat. Gairebé no hi ha cap alvèol madur al nadó, la maduració definitiva dels alvèols es produirà més endavant.

**Figura 2:** Esquema del desenvolupament de l'arbre traqueobronquial(61)



**Figura 3:** Fases del desenvolupament pulmonar(61)





**Taula 3:** Resum cronològic de l'embriologia dels pulmons i del diafragma

|  | <b>Període de desenvolupament pulmonar*</b> | <b>Principals esdeveniments</b>   |
|--|---|---|
| <b>Dia 22</b><br><b>4 SG</b><br><b>5 SG</b><br><b>6 SG</b> | Embrionari (4 a 6 SG)                       | Aparició septum transversum i primordi respiratori.<br>Primeres ramificacions: laringe, tràquea, carina, bronquis principals dret i esquerre.<br>Separació cavitats pericàrdica i pleurals (canals pleuroperitoneals oberts).<br>Desenvolupament dels plecs pleuroperitoneals.<br>Bronquis lobars principals (3 dreta i 2 esquerra).<br>Bronquis segmentaris (3a generació de bronquis) |
| <b>10 SG</b><br><b>6-16</b>                                | Pseudoglandular (6-16 SG)                   | Tancament definitiu diafragma (8-10 SG)<br>14 ordres de ramificació bronquial més (16 generacions bronquials fins a arribar als bronquíols terminals).<br>Les artèries bronquials es divideixen i ramifiquen en paral·lel als bronquis.   |
| <b>13-25 SG</b>  | Canalicular                                 | Ramificació dels bronquíols terminals en bronquíols respiratoris (17-19 ordres de divisió bronquial)<br>Intensa vascularització al voltant d'aquests.   |
| <b>24- naixement</b>                                       | Sacular                                     | Aparició dels sacs terminals (20 divisions bronquials)<br>Aprimament epitel·li respiratori. Comencen a aparèixer pneumòcits II.<br>Els capil·lars pulmonars protrueixen cap als sacs respiratoris.  |
| <b>29SG - 8 anys</b>                                       | Alveolar                                    | Alvèols immadurs (20-22 generacions bronquials).<br>Alvèols madurs (23 divisions bronquials)<br>Capil·lars al voltant dels alvèols. La interfase aire-sang es limita a la paret cel·lular del pneumòcit i l'endoteli vascular.  |

\*Com ja hem explicat, hi ha un solapament entre les diferents fases de maduració bronquial.

### c. El desenvolupament vascular pulmonar(61)

El desenvolupament vascular pulmonar comença durant la fase embrionària de desenvolupament pulmonar. El *truncus arteriosus* es divideix en l'aorta i l'artèria pulmonar durant la 8ena setmana de gestació, mitjançant el creixement en forma espiral del septe aortopulmonar. L'artèria pulmonar primitiva connectarà amb els arcs pulmonars, les artèries del 6è arc branquial. El mesènquima que envolta les gemmes pulmonars es desenvoluparà cap a teixit vascular. En aquest procés es produeixen tant els fenòmens de vasculogènesi com d'angiogènesi. La vasculogènesi fa referència a la formació i organització *de novo* de vasos sanguinis per diferenciació *in situ* dels precursors endotelilals (angioblasts) a partir del mesènquima. Per angiogènesi entenem el procés de ramificació de vasos existents per formar-ne de nous. Hi ha múltiples factors de creixement que regulen aquests processos, dels quals podem esmentar el factor de creixement vascular endotelial (VEGF), el factor de creixement

transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de creixement de fibroblasts (FGF), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) i l'angiopoietina, entre d'altres.

Hi ha una sincronització entre el desenvolupament de l'arbre bronquial i el vascular. Les branques arterials preacíniques, ja estan presents a la setmana 20 de gestació. Les branques intraacíniques, en canvi, es desenvoluparan més tard i fins i tot després del naixement.

Les venes es desenvolupen en paral·lel a les artèries, però emergeixen del mesènquima lliure que hi ha als septes pulmonars, i per això van a fusionar-se amb l'aurícula esquerra.

Cap al final de la gestació, el nombre de petites artèries pulmonars augmenta molt, tant en termes absoluts com per unitat de volum. Al fetus, hi ha una hipertensió pulmonar fisiològica (el fetus no respira). La major part de la despesa cardíaca dreta se salta la circulació pulmonar, a través del *ductus arteriosus*. En aquest moment, les resistències vasculars pulmonars són molt elevades, i la pressió pulmonar és similar a la sistèmica. Segurament el mecanisme clau que manté aquestes altes resistències és la baixa pressió d'oxigen de la sang fetal, al voltant de 25 mmHg. Per exemple, la regulació d'alguns enzims claus per al manteniment d'aquest to vascular elevat, com l'òxid nítric sintasa, depèn de la pressió parcial d'oxigen.

Quan el nadó neix, hi ha una caiguda brusca de les resistències vasculars, cosa que permet dirigir la meitat de la despesa cardíaca total cap als pulmons. Això determina que la circulació pulmonar augmenti de 8 a 10 cops el seu volum/minut. El retorn venós cap a l'aurícula esquerra també augmenta, i d'aquesta manera es tanca la vàlvula unidireccional del *foramen ovale*. Les resistències vasculars sistèmiques, augmenten en desaparèixer el sistema de baixa pressió placentari. Tot això passa ràpidament després del naixement, tot i que les resistències vasculars pulmonars continuen disminuint durant mesos fins a arribar als nivells de l'adult. Com que les resistències pulmonars cauen fins molt per sota de les sistèmiques, el flux de sang a través del *ductus* s'inverteix; finalment, el *ductus arteriosus* es tanca funcionalment al llarg de les primeres hores de vida.

Els principals estímuls que afavoreixen la caiguda de les resistències pulmonars són la ventilació i distensió dels pulmons amb aire i l'augment de la pressió parcial d'oxigen en sang.

## **6. El desenvolupament en una situació d'hèrnia diafragmàtica. Justificació de la hipoplàsia pulmonar i la hipertensió pulmonar associades.**

Tant si ja hi ha una afectació primària del pulmó en l'HD com si no hi és, el desenvolupament pulmonar es veu alterat per la presència de les vísceres abdominals al tòrax en la fase pseudoglandular precoç. El procés de ramificació bronquial és el principal esdeveniment en aquest període, moment en què també culmina el tancament definitiu del diafragma en condicions normals (10 SG). L'ocupació toràcica per l'HD compromet aquest procés de ramificació, de tal manera que les ramificacions bronquials (preacíniques) estan disminuïdes en 1/3 o 2/3 en tots dos pulmons, més a la banda afecta(43). Thibeault i col·laboradors van demostrar que el volum pulmonar està globalment reduït entre un 10 i un 30% en aquells que moren en menys de 24h(62).

Aquesta afectació de la ramificació pulmonar és la base de la hipoplàsia pulmonar associada a l'HD. Tots els models quirúrgics d'hèrnia diafragmàtica existents (com el que hem fet nosaltres) són capaços de generar una hipoplàsia pulmonar. La gran diferència és que la confecció quirúrgica del defecte diafragmàtic té lloc de manera més tardana que el que succeeix de forma espontània en els casos d'HD.

Chapin, a partir d'un model d'HD i OT en rata, especula que l'HD causa hipoplàsia pulmonar per dos mecanismes. Un d'ells, ja comentat, és la compressió dels pulmons i el compromís del seu desenvolupament per la presència de vísceres abdominals al tòrax. L'altra causa d'hipoplàsia pulmonar en els pacients amb HD és més subtil. L'HD impedeix els moviments respiratoris cíclics. És molt probable que l'individu amb HD faci aquests moviments inefectius. Quan això passa, l'individu obre la glotis. El balanç global és el d'una pèrdua de líquid pulmonar, cosa que disminueix la pressió de sobredistensió, que és un estímul per fer créixer els pulmons(63).

El desenvolupament de l'arbre vascular pulmonar s'altera a partir de les 12-14 SG. Els vasos són més petits en relació amb el volum pulmonar(64). Com que la secció de l'arbre vascular disminueix, augmenta la seva resistència al flux de sang, cosa que contribueix a la hipertensió pulmonar persistent de l'HD. El canvi patològic més cridaner en els casos d'HD amb hipertensió pulmonar persistent és l'augment del gruix de la túnica mitja (capa muscular) i adventícia de la paret arterial dels vasos pulmonars. De fet, les arterioles poden estar muscularitzades en excés fins a arribar a nivell intraacínic (on de manera normal identificarem les arterioles per la seva paret elàstica, no muscular). La hipertròfia de la capa muscular és proporcional al grau d'hipoplàsia pulmonar(64).

## 7. El tractament prenatal de l'hèrnia diafragmàtica.

Quan un nadó amb HD neix, el grau d'hipoplàsia pulmonar i HTP que presenti serà determinant per a la seva supervivència. En els casos més greus, malgrat tots els avenços moderns, no serà possible fer res per salvar la vida del pacient. És en aquests casos que està indicada la teràpia fetal.

### a. Tractaments fetals: 50 anys d'història(65).

La teràpia fetal es proposa per aquells trastorns amb diagnòstic prenatal el tractament dels quals no pot diferir-se fins al naixement sense que s'hagi produït la mort o seqüeles greus(65). Els procediments poden ser tan senzills com l'administració de glucocorticoides a la mare perquè arribin al nadó de forma transplacentària i hi estimulin la maduració pulmonar. Aquest procediment, que fou descrit inicialment el 1972 per Liggins i Howie(66), és tan comú avui en dia que ja ens oblidem de considerar-lo com a un tractament fetal. En aquest apartat, però, del què ens ocuparem serà dels procediments fetals invasius.

Aquesta història comença el 1961 amb una transfusió a un fetus(67). En aquell moment encara no s'havien desenvolupat els ecògrafs i es va tractar d'una punció fetal a cegues. Però per realitzar una exsanguinotransfusió, per exemple, es requeria l'accés directe a la circulació fetal. Això fou possible a través d'una histerotomia(68) i ja més endavant, guiats per fetoscòpia(69).

La història moderna de la cirurgia fetal comença a San Francisco de la mà del Dr. Michael R. Harrison. Des del primer moment, l'hèrnia diafragmàtica constituirà l'objectiu de la seva experimentació, tot i que pel camí s'han obert portes a moltes altres patologies i camps d'actuació. D'entrada calia establir uns criteris que havien de complir aquelles patologies susceptibles de rebre un tractament prenatal. Aquests criteris foren consensuats per la Societat Internacional de Medicina i Cirurgia Fetal (IFMSS) l'any 1982(70). La taula següent ens els presenta:

#### Taula 4: Requisits d'una patologia per a ser susceptible de tractament prenatal(65)

|  |
|--|
| 1. Diagnòstic i valoració de la gravetat acurats, amb l'exclusió d'altres anomalies associades.  |
| 2. Història natural de la malaltia ben documentada, i amb un pronòstic establert.  |
| 3. Manca d'una teràpia postnatal efectiva en el moment actual.   |
| 4. La cirurgia <i>in utero</i> ha d'haver-se demostrat eficaç en models animals, on s'han d'haver revertit els efectes nocius de la malformació.   |
| 5. Les intervencions han de ser realitzades a càrrec d'un equip especialitzat multidisciplinari en un centre de cirurgia fetal, sota protocols estrictes, amb l'aprovació dels comitès locals d'ètica i amb el consentiment informat de la mare o familiars. |

Iniciar un programa de cirurgia fetal requeria superar moltes dificultats. La més important era com entrar i sortir de la cavitat uterina per poder accedir al fetus sense risc. Per això la història de la cirurgia fetal és una història de cirurgia experimental, en què els models animals hi tenen un paper cabdal. La ruptura prematura de membranes i el part prematur encara són, avui en dia, el gran taló d'Aquil·les i el principal fre de la cirurgia fetal(65;71).

Ja abans de la Segona Guerra Mundial, Barron realitzà nombrosos experiments sobre fetus d'ovella, als quals hi accedia a través d'una histerotomia que segellava amb una bossa de tabac(72). Jost, el 1946, fou capaç de manipular fetus de conill (els realitzava una orquiectomia per demostrar que això comprometia el desenvolupament endocrí). Més tard, Louw i Barnard (1955) van aconseguir el primer model d'una malformació fetal, reproduint una atresia intestinal per isquèmia intestinal(73). Els models quirúrgics de coartació d'aorta, hèrnia diafragmàtica i hidronefrosi foren assolits més tard. Aquests models servien per conèixer la fisiopatologia de la malformació, però més tard també van tenir la utilitat d'assajar possibles tractaments fetals. Per últim, i com a pas previ al tractament en humans, fou necessària l'experimentació de moltes tècniques sobre primats no humans(74;75).

La primera cirurgia fetal oberta es realitzà a San Francisco i va consistir en un cas d'obstrucció ureterovesical bilateral. Es van realitzar dues ureterostomies. Tot i que no hi hagueren complicacions maternes, el fetus mai va produir orina. Aquest mateix grup de San Francisco ja va observar que la majoria dels pacients amb una obstrucció urinària podien ser descomprimits de forma efectiva amb una derivació vesicoamniòtica(76;77). Els *shunts* també es van proposar per al tractament de la hidrocefàlia, però els experiments animals mai van donar cap resultat positiu(78)

La taula 5 exposa les indicacions de cirurgia fetal acceptades en l'actualitat(65). Respecte les primeres patologies que es van tractar observem dos canvis significatius:

- la cirurgia fetal oberta gairebé no té cap indicació, (llevat de la reparació del mielomeningocele –sense que hi hagi un consens absolut- i alguns tumors toràcics o el teratoma sacrococcigi amb insuficiència cardíaca);
- hi ha un ampli grup de pacients, d'altra manera sans, afectes de problemes a la placenta, el cordó o les membranes als quals se'ls ofereix la possibilitat de tractament fetal. El paradigma d'aquest grup el constitueix la síndrome de transfusió fetofetal en gestacions gemelars monocoriòniques. El fet que aquestes patologies (que ni apareixien en les indicacions inicials) constitueixin ara una de les aplicacions més inqüestionables de la cirurgia fetal s'ha produït per la gran implicació dels obstetres en el camp de la medicina fetal.

**Taula 5:** Indicacions actuals de cirurgia fetal (oberta o mínimament invasiva)

| <b>Cirurgia fetal</b>   | <b>Criteri pel tractament fetal</b>  |
|---|--|
| <i>Cirurgia sobre el fetus</i>  |  |
| Hèrnia diafragmàtica  | Revertir la hipoplàsia pulmonar i evitar la hipertensió pulmonar   |
| Teratoma sacrococcigi   | Finalitzar el fenomen de robatori de sang pel tumor, revertir la insuficiència cardíaca associada i prevenir el polihidramni   |
| Lesions toràciques ocupants d'espai   | Evitar la hipoplàsia pulmonar i/o revertir la insuficiència cardíaca i el polihidramni   |
| Obstrucció del tracte urinari inferior  | Prevenició de la insuficiència renal i la hipoplàsia pulmonar  |
| Malformacions cardíques   | Prevenició de la hipoplàsia cardíaca o del dany progressiu i irreversible de la funció miocàrdica sobre el cor en desenvolupament  |
| Mielomeningocele  | Cobrir la medul·la exposada i eliminar la pèrdua de LCR per tal d'evitar la hidrocefàlia, la malformació d'Arnold-Chiari i l'afectació neurològica progressiva   |
| <i>Cirurgia sobre la placenta, cordó o membranes</i>  |  |
| <b>Bessonades monocorials complicades:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Twin-twin transfusion syndrome (TTTS)</i></li> <li>- <i>Twin-reversed-arterial-perfusion sequence (TRAP)</i> i altres anomalies amb discordància</li> <li>- <i>Twin anemia polycythaemia sequence</i></li> <li>- Restricció selectiva del creixement intrauterí</li> </ul> | <b>Evitar la transfusió fetofetal i les seves conseqüències:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Evitar el part prematur</li> <li>- Prevenició del dany potencial sobre un o els dos bessons</li> <li>- Revertir la insuficiència cardíaca o polihidramni en alguns casos de TTTS o TRAP</li> <li>- En alguns casos, un feticidi selectiu pot ser l'objectiu per si mateix</li> </ul> |
| Síndrome de brides amniòtiques  | Prevenició de deformitats i pèrdua de funció   |
| Corioangioma  | Prevenir o revertir la insuficiència cardíaca, l'hídrops fetoplacentari i el polihidramni  |

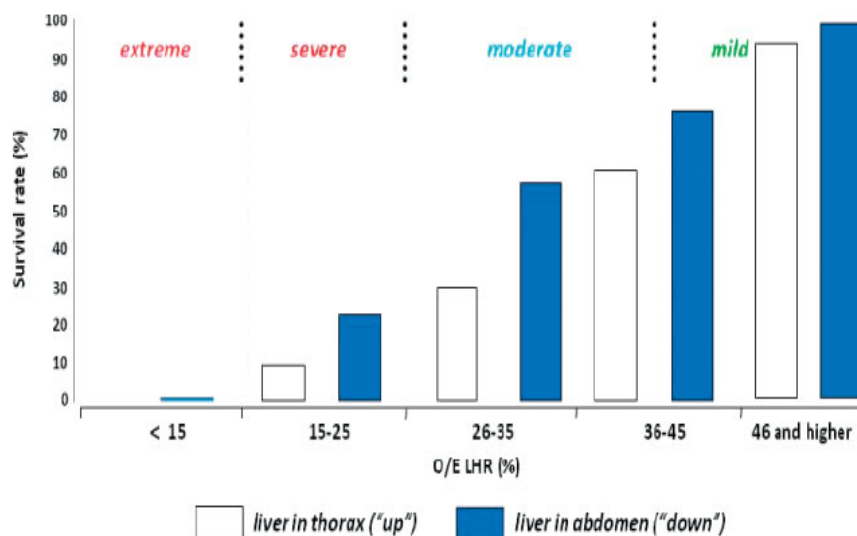
## b. Justificació del tractament fetal de l'HD

Com ja hem comentat, la base ètica que justifica el tractament prenatal de l'hèrnia diafragmàtica és l'existència d'un subgrup de pacients amb molt mal pronòstic i que moren malgrat tots els esforços proporcionats amb la teràpia postnatal. Diversos estudis suggereixen que la proporció d'individus amb hèrnia diafragmàtica aïllada letal se situa entre gairebé el 20 i 30% dels casos o potser més(24;65).

El més important de tot, és que avui en dia som capaços d'identificar aquest subgrup de pacients amb una hèrnia diafragmàtica d'alt risc. Per exemple, el nostre grup (i la majoria dels grups europeus que ofereixen teràpia fetal per l'hèrnia diafragmàtica) estima el risc dels nadons amb hèrnia diafragmàtica mitjançant una combinació de paràmetres. Els més importants són el grau d'hipoplàsia pulmonar i la posició del fetge. La hipoplàsia pulmonar s'estima a partir de la mesura del pulmó contralateral a l'hèrnia en un tall ecogràfic específic i estandarditzat, amb visió de les 4 càmeres cardíques (en casos greus d'hèrnia dreta, el pla de les 4 càmeres pot estar molt desviat i conduir-nos a errors en l'estimació de la grandària del pulmó; podem fer una correcció fixant-nos, per exemple, en què el pla de referència sobre el qual mesurem el pulmó esquerre es mantingui paral·lel a les costelles). Aquesta mesura pulmonar es correlaciona amb el perímetre cranial i s'obté el *lung-to-head ratio* (LHR). La correlació amb el perímetre cranial es fa per tal d'evitar el biaix que suposa l'edat gestacional en aquesta mesura. Durant molts anys aquest paràmetre ha estat la millor referència disponible(79). Tanmateix, es va observar que el LHR sí que oscil·la al llarg de la gestació (per això es recomanava fer la mesura al voltant de les 24 SG). Per tal de compensar aquest efecte, s'ha creat una taula de normalitat del LHR al llarg de la gestació. El paràmetre que es valora actualment és el quocient entre el LHR observat (el del pacient) respecte el LHR esperat per l'edat gestacional i que obtenim de la taula de referència. Aquesta mesura s'anomena *o/e LHR*(80) (*observed-to-expected lung-to-head ratio*), i s'expressa com un %. La posició del fetge (parcialment al tòrax o completament a l'abdomen: *liver up/down*) també es fa servir com a estimador de gravetat. Per exemple, el nostre grup disposa de taules i gràfiques de supervivència (obtingudes amb els resultats de fetus als quals no s'ha realitzat tractament fetal però sí un tractament neonatal de qualitat) per tal d'estimar el risc de mort d'un fetus concret amb HD. La següent figura i taula ho demostren(65).



**Figura 4:** Corba de supervivència dels fetus amb una HD esquerra aïllada en funció de l'o/e LHR i la posició del fetge



**Taula 6:** Simplificació de la Figura 4

| o/e LHR (%) | Posició fetge <sup>a</sup> | Pronòstic            | Supervivència <sup>b</sup> |
|-------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|
| ≤ 25        | Qualsevol                  | Greu                 | < 20%                      |
| 26-35       | Qualsevol                  | Moderat <sup>c</sup> | 20-70%                     |
| 35-45       | Tòrax                      |                      |                            |
|             | Abdomen                    | Bo                   | > 60-70%                   |
| ≥ 46        | Qualsevol                  |                      |                            |

<sup>a</sup>En igualtat d'o/e LHR la localització del fetge al tòrax sempre empitjora el pronòstic, encara que el pacient pugui no variar del grup al qual s'ha adjudicat

<sup>b</sup>Supervivència sense tractament fetal, amb el millor tractament postnatal possible

<sup>c</sup>Òbviament aquest grup és el més heterogeni, on hi caben casos bons o francament desfavorables

Hem observat que les mesures hemodinàmiques també es relacionen amb el pronòstic del fetus. Els paràmetres hemodinàmics més característics són els de l'ona de pols de l'artèria pulmonar (especialment l'índex de pulsatilitat i la presència de flux retrògrad a l'artèria pulmonar) i la fracció de sang que perfon els pulmons. En igualtat de o/e LHR i posició del fetge, aquell fetus amb paràmetres hemodinàmics de mal pronòstic té una probabilitat de supervivència molt menor que un altre fetus amb els paràmetres hemodinàmics bons(81-83).

Finalment, també té valor la resposta observada al tractament fetal; el pronòstic empitjora si no milloren els paràmetres hemodinàmics(81).

### c. Models animals d'HD.

Ja hem comentat que un requisit que ha de satisfer una malformació per a poder ser tractada prenatalment és un bon model animal. La reparació fetal del model ha de corregir la malformació o bé disminuir la gravetat de les seves conseqüències.

Els primers models que van fer servir els investigadors per estudiar l'HD foren models quirúrgics. Anteriorment ja s'havia descobert algun altre model d'hèrnia (com la que es produeix en els cadells de rates que han estat privades de vitamina A durant la gestació)(84-86).

Els models quirúrgics confeccionen una hèrnia diafragmàtica mitjançant una intervenció fetal en què es crea un defecte al diafragma. De tots els animals emprats, l'ovella ha estat, per la grandària del seu fetus, el més utilitzat pels cirurgians per demostrar l'aplicabilitat de les diferents tècniques quirúrgiques. Altres animals que s'han fet servir són: gossos, conills i primats, aquests últims com a pas previ a les intervencions fetals en humans.

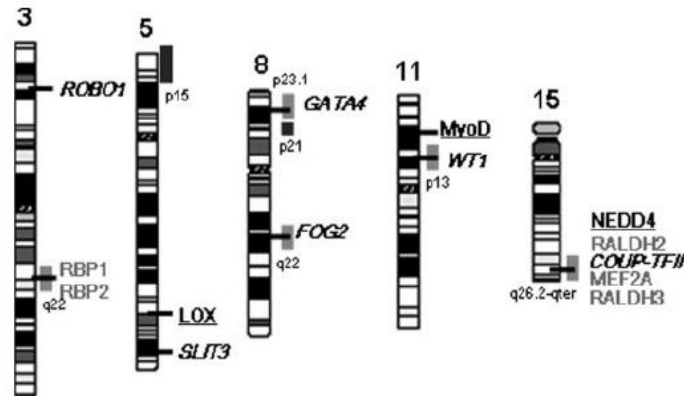
Des d'un punt de vista patogènic, els models quirúrgics tenen el desavantatge que parteixen d'uns pulmons i diafragma normals fins al moment de la intervenció. Perquè el model sigui el més semblant possible al que té lloc en l'humà, cal que la confecció del defecte sigui el més precoç possible(87). Tanmateix sempre proporcionaran menys informació sobre l'etiologia i els mecanismes responsables del defecte diafragmàtic i del compromís en el creixement i maduració del pulmó(40). Tot i això, partir d'un animal se té l'avantatge que s'evita la interferència sobre altres mecanismes del desenvolupament que els teratògens, dèficits vitamínics o mutacions genètiques puguin tenir.

El model genètic d'HD, en canvi, sí que ens aporta una informació valuosa sobre els mecanismes etiològics i de desenvolupament que mencionàvem abans. Això és especialment cert en ratolins *knockout*, dissenyats perquè no expressin algun gen clau que molt freqüentment es troba deleccionat o duplicat en els pacients humans amb HD.

La figura 5, per exemple, ens ensenya les regions del genoma humà amb algun dels gens que més freqüentment s'han vist relacionats amb l'aparició d'HD. Molts d'aquests gens han servit per dissenyar animals transgènics com a model d'HD. De totes maneres, la correlació de les troballes d'aquests models animals a l'HD en humans és difícil, ja que cada model limita a una única mutació genètica la seva capacitat de generar una HD. Com ja hem comentat, fins ara només s'ha identificat un pacient

humà que presenti la mateixa mutació observada en un model experimental: la del gen FOG2(36).

**Figura 5:** Alguns dels gens implicats en l'D de l'ésser humà(40)



**Figure 2.** Most important commonly deleted or duplicated regions in human patients and their candidate genes are indicated by bars beside the chromosomes. Grey bar: deleted region. Black bar: duplicated region. Gene names in italics: muscularization defect in animal model. Gene names underlined: diaphragm defect in animal model. Gene names in grey: no animal model known, candidate gene based on cytogenetic position and/or function.

La contribució específica que cada model d'HD ha aportat al corpus de coneixement de la malformació és una informació excessiva que sobrepasa aquesta introducció. Algunes pinzellades ja han estat esmentades, o ho seran al llarg de les properes seccions. Les següents cites corresponen a revisions que excel·leixen en algun(s) dels models d'HD: (40;55;88-90).

Probablement el model animal en què més estudis s'han dut a terme és el model teratogènic d'HD amb nitrofenol en rosegadors (ratolins i rates). El nitrofenol és el nom habitual de l'herbicida 2,4-diclor-*p*-nitrodifenil éter. El seu ús com a herbicida està prohibit a la majoria de països desenvolupats pel seu potencial carcinogen. En rosegadors és un potent agent teratogènic. Hi induïx hèrnia diafragmàtica, un ampli espectre de malformacions cardiovasculars i agenèsia de les glàndules de Harderian (una membrana que envolta el nervi òptic dels rosegadors i produeix melatonina, lípids i protoporfirina IX en resposta a l'estrès)(91). En aquest model tant la dosi de nitrofenol com el moment en què s'administra són claus per reproduir l'espectre de malformacions de l'HD(90). Per exemple, en rates s'obtenen HD esquerres quan s'administra el nitrofenol el dia 9,5 de gestació, mentre que majoritàriament són dretes quan aquest tòxic s'administra en el dia 12,5(34;92;93). Els estudis realitzats sobre aquest model han permès conèixer en profunditat diferents vies metabòliques que regulen el desenvolupament fetal. De totes aquestes vies metabòliques en relació amb l'HD, la via de l'àcid retinoic és la més estudiada. En aquest sentit, el model d'hèrnia diafragmàtica per déficit de vitamina A és força similar al del nitrofenol.

#### d. Història de la cirurgia fetal experimental de l'HD

Si bé els models teratogènics o genètics d'HD són els que ens han aportat un grau de coneixement més gran de la fisiopatologia de l'HD, els models quirúrgics, especialment en animals grossos (com les ovelles), han estat el banc de proves de totes les tècniques quirúrgiques i procediments fetals realitzats.

Un dels primers passos que van demostrar els pioners de la medicina fetal fou que la hipoplàsia pulmonar de l'HD podia millorar o revertir-se per una intervenció fetal.

Haller, l'any 1976, va crear un model d'hipoplàsia pulmonar en ovelles molt elegant(94). Va simular una hèrnia diafragmàtica tot inflant un baló dins del tòrax dels fetus. Un cop validat aquest model, els autors van comprovar que desinflant aquest baló es revertia la hipoplàsia pulmonar(95;96). En un model d'HD en ovelles, seguidament, es va comprovar que la correcció quirúrgica fetal de l'HD era factible tècnicament(76).

Per això, a finals de la dècada dels 80s, es van intervenir els primers fetus humans amb HD als Estats Units(97) i, durant un breu període de temps, també a París(98). En un grup de fetus amb HD i fetge de localització abdominal, s'assolia una reparació fetal efectiva, i amb una bona supervivència postnatal. Tanmateix, un assaig clínic va demostrar que en aquest grup de pacients amb HD i el fetge a baix, la correcció fetal de l'HD no ofería cap avantatge sobre el maneig postnatal habitual. Al contrari, el grup tractat prenatalment patia un 21% de seqüeles neurològiques(19). Aquest grup de pacients, doncs, fou descartat com a beneficiari d'una intervenció fetal.

El grup de pacients amb HD i el fetge herniat al tòrax, en canvi, fou assenyalat com a bon candidat al tractament prenatal, ja que el seu pronòstic era pitjor(99). El problema era que, malgrat tots els esforços, la reducció del fetge herniat a l'abdomen comportava un pinçament de la vena umbilical i això conduïa, irremissiblement, cap a la mort fetal(18). Aquesta doble realitat va fer que la cirurgia fetal oberta per l'HD quedés suspesa definitivament.

Paral·lelament, es produeixen dos fets significatius: un redescobriments dels treballs clàssics de Carmel(100) i l'observació dels fetus afectats de *CHAOS (congenital high airway obstruction syndrome)*.

Carmel havia experimentat que la lligadura de la tràquea fetal promovia un creixement dels pulmons; contràriament, el drenatge crònic del líquid pulmonar (per exemple, a través d'una traqueotomia) provocava hipoplàsia pulmonar(100).

Els fetus afectats per la síndrome CHAOS (per exemple, a causa d'una atrèsia de laringe) tenen una obstrucció intrínseca de la via aèria principal. Característicament,

els pulmons d'aquests individus són molt grossos, pesen més i arriben a evertir les cúpules dels diafragmes cap al abdomen.

Di Fiore (1994) fou el primer en suggerir que l'oclusió traqueal temporal en els fetus amb HD podria revertir la hipoplàsia pulmonar letal d'aquests nadons(101). Des d'aquest moment, s'ha investigat àmpliament la dinàmica del líquid pulmonar i els efectes de l'oclusió traqueal, sobre tot en els casos d'hèrnia diafragmàtica. El nostre treball n'és un exemple. Al mateix temps, també s'ha fet molta recerca i innovació sobre la tècnica que permeti l'oclusió traqueal d'una manera més senzilla i eficient en els nostres pacients. Aquestes investigacions han donat altres fruits, com la tècnica de l'EXIT (*ex utero intrapartum treatment*), que té una aplicació pràctica que trascendeix el propòsit per al qual fou dissenyada.

#### e. L'evidència científica de l'oclusió traqueal en l'HD

El paper del líquid pulmonar i les modificacions que ocasiona l'oclusió traqueal han estat extensament estudiats en diversos models animals. Hi ha excel·lents revisions d'aquest tema, com la oferta per Khan, que em serveix com a base per a desenvolupar aquesta secció(102).

És sabut que tant els canvis de pressió pulmonar cíclics causats pels moviments respiratoris com la distensió pulmonar mantinguda i tònica (que produeix la pressió hidrostàtica del líquid pulmonar contra la glotis tancada) contribueixen al creixement i desenvolupament pulmonar. Per exemple: diversos treballs han demostrat que l'absència de líquid pulmonar condueix a pulmons mal desenvolupats(103;104); o bé que la secció de la columna cervical per sobre del nervi frènic, i la paràlisi dels moviments respiratoris, també provoca hipoplàsia pulmonar (en conills i ovelles)(103;105).

Aquests experiments suggereixen que la distensió alveolar causada pel líquid intrapulmonar participa de manera clau en la maduració dels pulmons. Aquest líquid és produït per l'epiteli pulmonar i predomina especialment a partir de la segona meitat de la gestació(106).

És interessant observar que la major part de la vida fetal transcorre en una situació d'apnea, amb la glotis tancada. Això provoca un gradient de pressió positiu entre els espais aeris i la cavitat amniota(107).

Si aquest gradient de pressió desapareix, arribarem a una situació d'hipoplàsia pulmonar. Això pot aconseguir-se, per exemple, a través d'una traqueostomia o d'un drenatge del líquid pulmonar a través de la laringe fetal(108).

En canvi, quan aquest gradient es porta al màxim, com per exemple amb l'oclusió traqueal, observem els efectes inversos, similars als dels nadons amb CHAOS (afectats d'una obstrucció congènita de la via aèria)(101;109-112). Els pulmons dels nadons afectes de CHAOS són hiperplàsics, inverteixen el diafragma, tenen un pes en sec més gran del què els correspondria, uns alvèols més grans i presenten més ramificacions aèries(113).

La primera descripció d'una oclusió traqueal fou el 1965(100). Posteriorment, s'ha demostrat que l'oclusió traqueal millora la funció pulmonar en diferents models d'hipoplàsia pulmonar, molt especialment en l'HD (63;114-117).

Gairebé tots els models d'oclusió traqueal (al igual que a la pràctica clínica habitual) han treballat a partir d'un bloqueig de la tràquea en un moment relativament tardà de la gestació. L'oclusió traqueal afecta el creixement dels pulmons a les fases canalicular i, sobretot, sacular. Aquest és un període crític en el desenvolupament pulmonar, ja que hi apareixen les primeres unitats funcionals capaces de realitzar l'intercanvi de gasos de manera efectiva. En aquest període (sacular) el pulmó no només creix en volum, sinó que augmenta exponencialment el nivell de septació o de compartiments dels sacs respiratoris (pseudoalvèols), hi ha un aprimament del teixit intersticial i un gran desenvolupament de la microvascularització pulmonar.

A més a més, l'oclusió traqueal promou l'expressió de trofoelastina i la síntesi d'elastina com a resposta a la distensió. Això comporta que el pulmó no només augmenti de volum, sinó que s'afavoreix la diferenciació d'unitats funcionals que faciliten l'intercanvi de gasos (alvèols)(118).

L'oclusió traqueal s'ha estudiat a partir de diversos models animals. En destaco els següents:

- L'ovella:

És el model d'oclusió traqueal i HD més utilitzat, en part també perquè la grandària del seu fetus permet entrenar les tècniques quirúrgiques utilitzades en els humans.

En quin moment és millor realitzar l'oclusió traqueal ha estat molt estudiat amb aquest model. Per exemple, l'OT a mitja gestació (76-90 dies de gestació; terme=144 dies) indueix un creixement del pulmó superior al que s'observa amb una OT tardana (114-128 dies de gestació). En contrapartida, produeix hídrops fetal i canvis en l'estructura pulmonar que fan ineficaç l'intercanvi de

gasos, ja que augmenta el gruix del mesènquima entre l'endoteli vascular i l'espai aeri(119).

Curiosament, però, la síntesi d'ADN que desencadena l'OT als 125-127 dies és superior a la que presenta quan l'OT es realitza entre els 112-114 dies de gestació. Es pensa que això és degut a què el pulmó secreta una quantitat de líquid superior en aquesta fase més tardana de la gestació(120).

Podríem estar temptats a creure que la sobredistensió pulmonar és l'únic estímul per fer créixer el pulmó com a resposta a l'OT. Hi ha un treball molt elegant on diàriament se substituïa el líquid pulmonar per la mateixa quantitat de sèrum fisiològic. En aquestes ovelles, el creixement pulmonar que indueix l'OT quedava abolit. D'aquesta manera es demostra que els factors que naturalment s'alliberen al líquid pulmonar són els que desencadenen la resposta a l'OT(121).

Algun dels factors de creixement pulmonar que s'han estudiat i que participen en la resposta a l'OT són: IGF1(122) i IGF2(123), TGF- $\beta$ 2(124). També s'ha demostrat l'augment d'expressió de mRNA calmodulina(125) i trofoelastina(118).

D'altra banda, s'ha observat que l'OT provoca una pèrdua de pneumòcits tipus II (PII). El recompte de PII disminueix 3 cops tot just a partir del 2on dia d'oclusió, alhora que apareixen unes cèl·lules intermediàries no diferenciades; l'augment de pneumòcits I (PI) succeeix més tard, cosa que suggereix una diferenciació dels PII cap a PI (passant per aquelles cèl·lules intermediàries)(126;127)

Tanmateix, l'alliberació de l'OT abans del moment del part(128) o el tractament amb esteroids(129) poden rescatar la població dels PII.

També s'ha observat que l'OT no només corregeix el dèficit de creixement pulmonar associat amb l'HD, sinó que redueix la muscularització excessiva de les petites arterioles pulmonars dels individus amb HD no tractada(130;131).

Curiosament, quan s'intenta reproduir l'efecte de l'OT només sobre el pulmó esquerre mitjançant l'oclusió selectiva del bronqui principal esquerre (en un model d'HD esquerra en ovelles) s'observa un creixement d'aquest pulmó, però sense anar associat a la maduració pulmonar observada en els casos d'OT(132).

- El conill:

El model d'hèrnia diafragmàtica i oclusió traqueal en conills és, en essència, el que hem reproduït nosaltres en aquest treball.

Al conill, s'observa, com en tots els models, una hiperplàsia pulmonar i un augment de la maduració secundària a l'OT(133). També es troba una davallada de la quantitat de pneumòcits II (PII). La magnitud de l'efecte aconseguit, així com la repercussió sobre els PII depèn del moment en què té lloc l'OT. Es creu que és més important el moment en què es realitza l'oclusió que la seva duració. La resposta és òptima amb una oclusió tardana, ja que l'epiteli pulmonar és més madur i secretor(134).

Això també ho constaten altres autors. Als fetus amb HD i posterior oclusió traqueal hi ha una proliferació de PII, seguida d'una davallada posterior i una pèrdua de cèl·lules intersticials. Una oclusió traqueal tardana corregeix la morfologia de l'HD i conserva els PII(135). També es corregeix el gruix de les arterioles preacíniques i acíniques(135).

A partir d'aquestes dades, es considera que millorar la hipoplàsia pulmonar no és tan important com promoure la maduració i diferenciació funcional durant el tractament prenatal amb OT. Per tant, és més important que l'OT tingui lloc de forma tardana en la gestació i sigui de curta durada. Així es desencadenen els mecanismes de maduració pulmonar, alhora que es preserva la població de PII. De fet, aquesta estratègia és la que es fa servir en la pràctica clínica actual.

Un altre avantatge dels treballs realitzats en conills és que en aquesta espècie, com en l'home, l'alveolarització s'inicia intraúter. Això no passa ni a les rates ni als ratolins. En aquest sentit, el model de conill és més fidel a la realitat de l'home.

Un desavantatge important del model de conill (i que hem sofert en aquest treball) és la limitada disposició d'anticossos específics, proteïnes i gens. Per exemple: bona part dels treballs comentats que mesuren els PII sobre conills s'han realitzat amb un anticòs contra la proteïna A del surfactant, desenvolupat específicament i puntualment per aquest propòsit al Japó; aquest anticòs no està comercialitzat i, malauradament, no l'hem tingut a la nostra disposició.

- La rata:

Tant la rata com el ratolí tenen el gran avantatge que permet usar el model teratogènic d'HD amb nitrofè. Aquest compost crea una HD d'aparició molt precoç a l'embriogènesi, a diferència dels models quirúrgics, cosa que la fa més similar al que passa espontàniament a l'home.



En aquest model, l'OT augmenta el volum pulmonar, la seva superfície efectiva, el volum del parènquima, el nombre de sacs terminals i el recompte alveolar radial, tot això sense que hi hagi un augment del nombre de divisions bronquials efectives(63).

- El ratolí:

S'ha demostrat que 24 hores de lligadura traqueal al ratolí fan avançar el desenvolupament pulmonar almenys 3 dies, des d'un punt de vista morfològic. Si l'OT s'allarga a 36 hores, el desenvolupament pulmonar s'accelera 5 dies(136).

Com sembla lògic, els canvis induïts per l'OT a nivell molecular i cel·lular precedeixen als que poden observar-se a nivell morfològic. Aquests canvis inclouen una alteració en el patró de creixement normal del pulmó; d'aquesta manera, el balanç entre proliferació cel·lular i apoptosi dona lloc a una acceleració del creixement pulmonar(137).

Per últim, cal comentar que l'OT també ha demostrat que promou el creixement i maduració arterial (amb una disminució del gruix de la capa muscular) tant en ovelles(130;138), com en conills(117) o rates(116).

El VEGF, factor de creixement vascular endotelial, és un mediador clau en aquest aspecte vascular. La síntesi de VEGF també es troba augmentada com a resposta a l'OT(139).

f. La pràctica de l'oclusió traqueal fins als nostres dies(65;140)

Després d'observar que la lligadura traqueal evitava la hipoplàsia pulmonar provocada amb un model de nefrectomia fetal, de manera lògica i conseqüent, es va suggerir que aquesta tècnica podria aplicar-se a altres causes d'hipoplàsia pulmonar, com l'HD(109). L'any 1994 es demostra, per primer cop, que l'oclusió traqueal pot revertir la hipoplàsia pulmonar greu ocasionada per l'hèrnia diafragmàtica(101). Aviat, aquest concepte fou conegut com a *PLUG (plug the lung until it grows) strategy*(110).

El principi d'aquesta nova aproximació es va caracteritzar per la recerca del millor material que pogués obstruir la tràquea amb les mínimes seqüeles. Es van provar clips metàl·lics, escumes i polímers que obturaven la llum traqueal, balons, paraigües o dispositius magnètics. Es tractava de trobar un sistema d'oclusió traqueal segur,

senzill, reversible o fàcil de posar i treure, que no produís lesions locals i que fos acceptable. Ja el 1995, a Lovaina (Bèlgica), es va començar a experimentar en ovelles l'oclusió traqueal amb un baló que es col·locava a la tràquea fetal per fetoscòpia(141-143).

La primera oclusió traqueal en humans es realitzà mitjançant una laparotomia materna, seguida d'una histerotomia, de la dissecció del coll fetal i l'aplicació d'un clip a la tràquea(144).

El naixement d'un nadó amb la tràquea lligada plantejava un problema obvi que calia resoldre. Es va desenvolupar una nova tècnica, anomenada EXIT (*ex utero intrapartum treatment*), que permetia retirar el clip traqueal i assegurar la via aèria mentre el fetus encara restava sota el suport de la circulació uteroplacentària(111). En essència, l'EXIT és una cesària modificada de tal manera que puguem garantir que el fetus manté l'oxigenació a través dels vasos umbilicals, alhora que s'assegura la seva via aèria. Les modificacions més importants que cal fer són(61):

- Mantenir l'úter relaxat, per permetre la circulació uteroplacentària eficient pel fetus. Es fan servir anestèsics inhalats i una anestèsia general profunda per a la mare. Tot i això cal que la mare mantingui una pressió sanguínia adequada; d'això en depèn el benestar fetal. L'EXIT ens dóna uns 20-25 minuts de bona relaxació uterina per a poder treballar sobre el fetus i assegurar la via aèria, el principal objectiu d'aquesta tècnica. Podem allargar aquest temps de relaxació uterina, però amb un augment del risc de complicacions maternes o fetals (cm ara atonia uterina, despreniment de placenta, mort o seqüeles del fetus).
- Assegurar una bona hemostàsia de les vores de la histerotomia (l'úter està relaxat cosa que afavoreix el sagnat). Hi ha una grapadora específica per a la paret uterina.
- No extreure el fetus completament durant el temps en què duri l'EXIT. Cal preservar el volum uterí per tal d'evitar el despreniment de la placenta i la contracció de l'úter, la qual cosa faria impossible mantenir l'oxigenació fetal. Ens limitem a exposar el cap i el coll, per poder treballar sobre la via aèria, i un braç, per monitoritzar la saturació i freqüència cardíaca fetal (cosa que també pot fer-se sota control ecogràfic).
- Subministrar el nivell just d'anestèsia fetal per poder-lo intervenir sense produir una depressió cardíaca.

- Garantir una contracció ràpida i eficient de l'úter un cop finalitzat el procediment i extret el nadó per tal d'evitar una atonia uterina i una hemorràgia materna greu.
- Una cesària convencional, en canvi, és un procediment que pot fer-se amb anestèsia regional i en què no ens interessa que els agents anestèsics passin al fetus. Es realitza relativament ràpid i el fetus s'extreu completament, es pinça el cordó umbilical i se l'estimula perquè respiri de manera autònoma. L'úter s'ha de contraure ràpidament de forma tònica, perquè s'obliterin els petits vasos que podrien produir una hemorràgia materna important.

L'EXIT implica un gran treball d'equip, sincronitzat i multidisciplinari. Formen part d'aquest equip: un o dos obstetres o especialistes en medicina maternofetal (i en ecografia fetal), un o dos cirurgians pediàtrics (o otorrinolaringòlegs pediàtrics), un neonatòleg, un o dos anestesistes (per la mare i el fetus), dues infermeres de quiròfan especialitzades, dues infermeres circulants. Si ens hi fixem, l'equip suma un mínim de 10 persones; habitualment el procediment atrau molta atenció i encara se n'hi afegeixen més. És freqüent arribar a comptar més de 20 persones al quiròfan on té lloc un EXIT. Per això la coordinació entre el nucli dels professionals involucrats ha de ser total.

Aquesta tècnica, que va permetre retirar els clips de la tràquea dels nadons amb HD amb seguretat i sense pressa, de seguida va utilitzar-se per a altres nadons amb un compromís de la via aèria. Assegurar la via aèria fetal és l'objectiu final de la tècnica. Hi ha diverses maneres d'assolir-ho i cal actuar amb eficiència (el temps importa) i amb la mínima morbiditat fetal. De menys a més agressivitat els procediments per tal d'obtenir una via aèria segura són: laringoscòpia directa i intubació orotraqueal; broncoscòpia (flexible o rígida) i intubació a través del broncoscopi; intubació retrògrada (passar una guia a través d'una petita traqueotomia fins a ser visible per l'orofaringe i, amb aquest ajut, fer una intubació orotraqueal); traqueotomia reglada; resecció de la massa tumoral.

Aquestes són les indicacions actuals de l'EXIT(61;145):

**Taula 7:** indicacions actuals de l'*ex utero intrapartum treatment*<sup>1</sup>

|  |  |
|--|--|
| <p>1.- Masses orals i cervicals</p> <p>Teratoma cervical i/o facial</p> <p>Limfangioma</p> <p>Altres tumors: hemangioma, goll, neuroblas-toma</p>  | <p>3.- Revertir l'oclusió traqueal</p> <p>Retirada del baló traqueal i rentats amb surfactant de l'arbre traqueobronquial<sup>3</sup></p>  |
| <p>2.- <i>EXIT-to-resection</i><sup>2</sup></p> <p>Masses mediastíniques</p> <p>Teratoma</p> <p>Limfangioma</p> <p>Masses pulmonars</p> <p>Malformació adenomatoidea quística</p> <p>Segrest broncopulmonar</p> <p>Altres masses</p> | <p>4.- <i>EXIT-to-ECMO</i><sup>4</sup></p> <p>HD greus</p> <p>Malformacions cardíques (alguns casos d'hipoplàsia de cavitats esquerres o estenosi aòrtica amb septe auricular intacte o restrictiu)</p> <p>HD + malformació cardíaca</p>                                 |
|  | <p>5.- Altres indicacions<sup>5</sup></p> <p><i>EXIT-to-separation</i> (per siamesos)</p> <p>Síndrome d'obstrucció congènita de la via aèria (CHAOS)</p> <p>Atrèsia de tràquea</p> <p>Atrèsia de laringe</p> <p><i>EXIT-to-airway</i> per a pacients amb micrognàtia</p> |

1. *Adaptació de la taula presentada al llibre Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine (9a Edició; 2011) d'acord amb la nostra pròpia experiència.*
2. *Al nostre grup hem fet la resecció de tumors de la cavitat oral, com epignatus, que dificultaven la intubació traqueal; fins ara, mai no s'ha donat el cas o la necessitat d'haver de reseccar una massa toràcica.*
3. *També hem indicat un EXIT per fer un rentat broncopulmonar en una pacient amb un líquid amniòtic hemàtic; la nostra experiència en altres casos similars demostra que aquests fetus tenen un risc important de destret respiratori posterior.*
4. *La transició de l'EXIT a l'ECMO no forma part del nostre protocol habitual ni a l'HD ni a les malformacions cardíques. L'he inclòs a la llista perquè és una indicació d'EXIT a altres centres del món.*
5. *Igual que en l'apartat anterior, per nosaltres l'EXIT no té una indicació principal en aquests casos. Fins ara no hem indicat mai l'EXIT per cap d'aquestes patologies.*

Aviat es va fer un pas més, eliminant la necessitat d'una cirurgia fetal oberta per a les oclusions traqueals. Encara a través d'una laparotomia, es col·locaven diversos ports sobre la paret uterina per a realitzar la dissecció i clipatge de la tràquea(146-148).

Els clips traqueals, però, deixaven seqüeles sobre aquest òrgan, com ara una malàcia greu(140). Per això foren substituïts per l'oclusió traqueal amb baló, amb una tècnica similar a la que havia descrit el grup europeu(141;142). Els primers casos es van realitzar amb l'ús d'un sol trocar de 4,5mm inserit directament sobre l'úter (que s'havia exposat a través d'una laparotomia materna)(149). Quintero, l'any 2000, fou el primer

en intentar una oclusió traqueal percutània guiada per fetoscòpia (malauradament el procediment no ser reeixit i el nadó va morir en néixer)(65).

A l'altra banda de l'Atlàntic, a Europa, van ser capaços de realitzar l'oclusió traqueal per fetoscòpia a través d'un únic port de 3,3 mm de diàmetre. El baló traqueal, inicialment, es retirava al moment del part, que tenia lloc segons la tècnica d'EXIT ja descrita. Aviat, però, el procediment es va millorar i va passar a realitzar-se sota sedació i anestèsia local (en comptes d'anestèsia general materna); els balons es retiraven per punció o per una segona fetoscòpia. Això va permetre que els nadons amb HD i tractament fetal (i les seves mares) poguessin beneficiar-se, també, d'un part vaginal.

Aquest procediment, amb les millores descrites, és el que s'ha acabat imposant i es realitza a gairebé tots els centres que ofereixen tractament fetal per l'hèrnia diafragmàtica.

Avui, l'oclusió traqueal (inicialment realitzada entre les 24 i 28 SG) s'ha retardat fins a les 30-32 SG en els casos moderats o 28-30 SG en els casos més greus; la retirada del baló es realitza al voltant de les 34 SG. Tot plegat, ha fet que la incidència de ruptura prematura de membranes i part preterme (< 34 SG) disminuís del 100% en els primers casos a un 25% amb l'estratègia actual(150).

La supervivència actual després de l'oclusió traqueal amb un fetus amb HD de mal pronòstic (LHR < 1.0 o o/e LHR < 26%) és del 50%, aproximadament; sense tractament, aquest grup de pacients tenen una probabilitat de supervivència molt baixa <10%(151).

Com en molts altres camps de la medicina, la teràpia fetal per l'HD s'ha basat molt més en experiments i experiències que en una evidència científica sòlida, construïda sobre estudis clínics randomitzats o metaanàlisis. El fet que molts dels fetus tractats tinguin una expectativa de supervivència molt baixa i que presentin malformacions (relativament) poc freqüents ha dificultat poder realitzar estudis de qualitat amb un nombre suficient de casos.

Cal destacar, però, algunes evidències.

Després de comprovar la inviabilitat de la cirurgia fetal oberta per als casos amb herniació hepàtica(18), es va dur a terme un estudi prospectiu que comparava la correcció fetal de l'hèrnia diafragmàtica (amb cirurgia oberta) respecte el millor tractament postnatal possible(19). Tot i que la cirurgia fetal era factible, les complicacions tant maternes com neonatals (sobre tot la prematuritat associada) van determinar que s'abandonés definitivament la cirurgia fetal oberta.

L'any 2003 es va publicar el millor estudi randomitzat en medicina fetal fins ara(152). En ell es comparava el tractament prenatal amb oclusió traqueal amb el tractament postnatal aïllat. Després de tot just 24 casos enrolats, l'estudi es va interrompre degut a la bona supervivència del braç de no tractament fetal. L'estudi fou encapçalat per Harrison, a San Francisco. La selecció dels casos és el que va determinar el resultat observat. S'hi incloïen dones amb fetus únics amb HD sense altres malformacions amb un LHR per sota d'1,4. La gran majoria dels casos enrolats es corresponien, segons les nostres taules de valoració actuals, a fetus amb HD de bon pronòstic. Tècnicament, la majoria de dones foren tractades a través de la inserció d'un tròcar a l'úter de 5mm de diàmetre, cosa que afavoria la prematuritat entre els fetus tractats (els primers casos de la sèrie van rebre un tractament més agressiu).

Aquest resultat inesperat feu que als Estats Units també es qüestionés el tractament prenatal per fetoscòpia de l'HD. Europa, doncs, va poder ser capdavantera en el tractament fetal de l'HD. Els grups europeus tractaven les gestants amb fetus amb HD de mal pronòstic (LHR<1.0). Tècnicament van depurar el procediment fent servir anestèsia local i sedació, i només una entrada de 3,3mm. Amb això, l'agressivitat materna fou molt menor i les complicacions com la ruptura prematura de membranes o la prematuritat van disminuir.

Tanmateix, la crítica que sempre s'ha fet és que aquesta pràctica es basa en sèries de casos i en la comparació amb sèries històriques o d'altres centres. Per tal de conèixer l'efecte real del tractament prenatal de l'HD, i per poder acceptar i recomanar el tractament amb una base sòlida i científica cal el suport d'un estudi randomitzat ben dissenyat. Això és el que es duu a terme a través del projecte *TOTAL (Tracheal Occlusion To Accelerate Lung Growth) trial*, amb participació dels principals centres de referència europeus i nord americans(153;154). Es realitzaran dos estudis randomitzats, segons si es correspon a un cas de pronòstic moderat (o/e LHR 25-34,9% o bé o/e LHR 35-44,9% amb fetge herniat) o greu (o/e LHR < 25%)(155).

Ruano *et al* (des de São Paulo, Brazil) han publicat un estudi randomitzat on es compara l'oclusió traqueal per fetoscòpia en els casos greus d'HD (LHR < 1.0 i herniació hepàtica) amb la no intervenció fetal. En funció del tractament rebut, els nounats tractats amb oclusió traqueal tenen una supervivència del 52,6% respecte només el 5,3% dels no tractats (RR, 10.0 (95% CI, 1,4-70,6) P<0,01)(156).

El resultat del *TOTAL trial* encara està pendent.

## II. JUSTIFICACIÓ

Així com el tractament de l'atrèsia d'esòfag representa per molts l'essència de la cirurgia pediàtrica, l'hèrnia diafragmàtica suposa el mateix en el camp de la medicina fetal. El desenvolupament i el progrés en aquesta nova especialitat van lligats a l'hèrnia diafragmàtica. Com ja hem vist, els pioners de la medicina fetal han treballat en l'HD i n'han fet valuoses contribucions. Fins i tot s'han desenvolupat recursos tan útils com l'EXIT. Però encara hi ha un gran desconeixement sobre molts aspectes relacionats amb aquesta malformació.

L'hèrnia diafragmàtica és una malformació molt greu. La seva morbimortalitat principal es deu principalment a la hipoplàsia pulmonar i a la hipertensió pulmonar associades. Quan el risc d'un fetus amb HD de sofrir aquestes complicacions és molt elevat, el tractament fetal pot ser l'única opció per millorar el seu pronòstic.

L'oclusió traqueal promou la maduració dels espais aeris, indueix la proliferació bronquial i, en última instància, augmenta el nombre total d'alvèols funcionals(101;102;157). En aquells fetus amb una hèrnia diafragmàtica al caire de la viabilitat, el tractament amb oclusió traqueal pot revertir el grau d'hipoplàsia pulmonar i, per tant, augmentar la probabilitat de supervivència.

A més a més, l'oclusió traqueal promou el creixement i desenvolupament vascular. L'oclusió traqueal redueix el gruix de la capa muscular de les arterioles pulmonars, tal i com s'ha demostrat en els models d'hèrnia diafragmàtica en ovella, conill i rata(63;114-117;130). Un treball preliminar derivat d'aquesta tesi, centrat en la vessant hemodinàmica(158), ha servit per demostrar la milloria dels paràmetres hemodinàmics en els fetus de conill amb hèrnia diafragmàtica sotmesos a oclusió traqueal. La maduració vascular, tant funcional com anatòmica, que condiciona l'oclusió traqueal persegueix l'objectiu d'alleujar la hipertensió pulmonar.

Globalment, s'espera que els fetus que presenten un creixement significatiu dels seus pulmons després del tractament amb oclusió traqueal demostrin una estabilitat hemodinàmica superior. A vegades però, en el dia a dia de la clínica pràctica hi ha casos en què això no succeeix. És més, cap estudi ha demostrat l'existència d'una correlació entre les respostes hemodinàmica, vascular i morfològica a l'oclusió traqueal. Això és el que ens proposem amb aquest treball.

### **III. HIPÒTESIS I OBJECTIUS**

#### **Hipòtesis:**

Aquest treball parteix de la hipòtesi que, en un model d'hèrnia diafragmàtica en conill, el tractament amb oclusió traqueal tardana reverteix la hipoplàsia pulmonar i disminueix la hipertensió pulmonar que presenten els fetus amb hèrnia diafragmàtica no tractats.

De forma més concreta pretenem demostrar que en el model d'HD en conill:

1. L'OT tardana millora el tant desenvolupament dels espais aeris com el vascular. En conseqüència, els nounats amb una HD tractada amb OT presentaran una situació neonatal inicial més satisfactòria.
2. Hi ha una correlació entre els valors dels paràmetres morfològics que estimen la hipoplàsia pulmonar, els paràmetres histològics suggestius d'hipertensió pulmonar, les mesures hemodinàmiques sobre els fetus vius i l'avaluació funcional neonatal.

#### **Objectius:**

En el model d'HD en conill:

1. Estudiar les conseqüències hemodinàmiques de l'OT en la circulació pulmonar fetal.
2. Avaluar els signes vitals i l'activitat durant la primera hora de vida dels animals tractats amb OT tardana.
3. Estudiar els canvis morfològics a nivell dels espais aeris i de les arterioles dels pulmons tractats.
4. Estudiar la participació de diversos factors de creixement implicats en el desenvolupament pulmonar.
5. Buscar correlacions entre els paràmetres hemodinàmics, els morfomètrics, els moleculars i la vitalitat neonatal.



## **IV. MATERIAL I MÈTODE**

### **1. Àmbit, acreditació, col·laboradors, permisos i finançament**

L'experiment s'ha desenvolupat a l'estabulari que la Universitat de Barcelona disposa a la seu Sant Joan de Déu. Totes les intervencions quirúrgiques dels conills, tant maternes com fetals, han estat realitzades per un equip de cinc cirurgians pediàtrics de l'Hospital de Sant Joan de Déu; almenys tres cirurgians (un dels quals assumia la funció d'anestèsista) participaven en cada procediment quirúrgic. Tots els implicats en les operacions dels conills disposem del Curs d'Investigadors amb Animals de Laboratori. Les mesures ecogràfiques han estat realitzades per metges del grup de recerca del Departament de Medicina Fetal i Perinatal de l'Hospital Clínic-IDIBAPS.

Abans d'iniciar l'experiment, vam obtenir l'aprovació del projecte per part del Comitè Ètic d'Experimentació Animal (Universitat de Barcelona).

El processament i l'estudi posterior de les mostres s'ha desenvolupat a les instal·lacions del departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic; una part de les mesures morfològiques dels pulmons també s'ha realitzat al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Sant Joan de Déu.

Aquest estudi ha comptat amb el finançament d'una beca del *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS PI 06/0865) i un Ajut Fi de Residència (Jordi Prat Ortells), atorgat per la Fundació Sant Joan de Déu.

### **2. Subjectes d'estudi**

Les cries de conill neozelandès blanc des del dia 23 de gestació fins a la primera hora de vida després del seu naixement per cesària electiva.

### **3. Disseny**

Es tracta d'un estudi experimental en què es comparen dos grups d'animals: HD (segons el model d'hèrnia diafragmàtica en conill) i OT (animals HD, tractats posteriorment amb oclusió traqueal). Prenatalment, s'ha fet un estudi hemodinàmic de la circulació pulmonar dels animals. En néixer, es va mesurar la situació neonatal de les cries. Els animals foren autopsiats poc després, i es va recollir informació del seu desenvolupament pulmonar, tant pel que fa als espais aeris com a la vascularització. Hem comparat i analitzat les variables estudiades entre ambdós grups; igualment s'ha estudiat la correlació entre totes les combinacions de parells de variables

(hemodinàmiques, de desenvolupament dels espais aeris i de maduració vascular pulmonar).

També hem recollit una mostra d'animals no intervinguts que hem fet servir, de manera orientativa, com a estàndard de normalitat.

#### 4. Variables de l'estudi

**Taula 8:** Resum de les variables de l'estudi

|   |   |  |
|---|---|--|
| <b>a) Variables hemodinàmiques:</b>                                 |   |  |
| <b>PI</b>   | <i>Pulsatility index</i>  | Estima la resistència vascular   |
| <b>FMBV</b>   | <i>Fractional moving blood volume</i>   | Valora la perfusió d'un teixit (pulmó)   |
| <b>PEDRF, PMSSF</b>   | <i>Peak of early diastolic reversed flow; Peak of maximum systolic speed flow</i> | No són rellevants en aquest estudi   |
| <b>b) Variables que estimen la hipoplàsia pulmonar:</b>             |   |  |
| <b>LBWR</b>   | <i>Lung to bodyweight ratio</i>   |  |
| <b>RAC</b>  | <i>Radial alveolar count</i>  | Més sensible que LBWR; informa del grau de maduresa dels espais aeris  |
| <b>c) Variables morfològiques de desenvolupament vascular*:</b>     |   |  |
| <b>DE, DI</b>   | Diàmetre extern i intern  | Bàsicament només serveixen per al càlcul de l'AMT  |
| <b>AMT</b>  | <i>Arterial muscular thickness</i>  | Permet valorar el grau de maduresa vascular; també l'hem fet servir com estimador morfològic de la resistència del teixit al flux vascular |
| <b>d) Variables utilitzades per a estimar la situació neonatal:</b> |   |  |
| <b>FC</b>   | Freqüència cardíaca   |  |
| <b>SaO<sub>2</sub></b>  | Saturació d'oxigen  |  |

\*Des d'un punt de vista funcional, el desenvolupament vascular el mesura l'hemodinàmica.

## 5. Metodologia detallada

Les conilles gestants foren traslladades al nostre centre el dia 19-20 de la gestació (la durada total de la qual són 31 dies) procedents d'una granja especialitzada (Granja Cunicola San Bernardo S.L., carretera de Tarazona s/n, Tulebras, Navarra). Van romandre en condicions estàndard fins a la data de la intervenció quirúrgica.

### a. Primera cirurgia fetal

Pretén reproduir una hèrnia diafragmàtica esquerra. Es realitza el dia 23 de la gestació (equivalent al segon trimestre de la gestació humana). La cirurgia té lloc en condicions estèrils, al quiròfan de l'estabulari de l'Edifici Docent de l'Hospital Sant Joan de Déu i d'acord amb un protocol que ja ha demostrat l'èxit en experiments anteriors en cirurgia fetal en conill(135;159).

El procediment comença administrant un sedant a la conilla gestant: una barreja de ketamina (20 mg/kg) i clorpromacina (2,5 mg/kg) per via intramuscular (el pes de l'animal volta els 5 kg). Seguidament es rasura el pèl de l'abdomen de l'animal. També s'administra una dosi profilàctica de cefazolina (50 mg/kg) i depoprogesterona (6 µg/kg) com a inhibidor de la dinàmica uterina. L'animal és traslladat a la taula d'operacions, on se li canalitza un accés venós a l'orella. L'anestèsia és inhalatòria amb isoflurà (al voltant d'un 2,5% de volum amb un flux d'oxigen d'1 litre/minut, variant-ho a demanda segons la profunditat de les respiracions). El control del dolor s'aconsegueix amb l'administració de una dosi d'1 mL de Meloxicam (un antiinflamatori no esteroïdal del grup dels inhibidors de la ciclooxigenasa, d'ús exclusiu veterinari) just abans de la intervenció i fentanil ev en petits bolus durant el procediment quirúrgic, segons les necessitats.

Realitzem una laparotomia mitja. Les conilles tenen un úter bicorni i un nombre variable de fetus, habitualment entre sis i deu (de tres a cinc a cada banya). En aquest moment es prenen mesures hemodinàmiques dels fetus mitjançant una ecografia amb doppler aplicant el transductor directament sobre l'úter matern amb un protector estèril (un guant). Aquest punt requereix un ecògraf d'alta resolució i la participació d'un expert en ecografia fetal, qui prendrà totes les dades hemodinàmiques de forma sistemàtica.

Exterioritzem una de les banyes de l'úter. Escollim el fetus de l'extrem per a ser operat, ja que sol ser el de major grandària(160) i perquè es pugui identificar immediatament en la segona intervenció. Es realitza una histerotomia en una zona lliure de vasos uterins i propera al coll del fetus. Per fer-ho, cal identificar el cap del fetus i la seva

posició i tenir en compte la localització de la placenta, que sempre s'implanta a la banda del mesoúter. Fixem les membranes amniòtiques a la paret uterina amb uns punts de 5/0, per tal de facilitar un tancament estanc al final de la intervenció. A través de la histerotomia, s'exterioritza la meitat cranial del fetus. És molt important evitar que l'úter es contregui i el fetus surti del tot ja que aquest fet suposa el despreniment de la placenta i la mort fetal; això s'aconsegueix extremant la delicadesa en la manipulació de l'úter, per tal de no estimular-lo. Procurem evitar una pèrdua de calor excessiva irrigant sovint el fetus amb sèrum tebi. Es realitza una toracotomia esquerra baixa, cosa que ens permet caure sobre el diafragma. Uns retractors específics, construïts expressament amb uns clips per paper, són els millors instruments per a separar les costelles i el pulmó i veure clarament el múscul diafragmàtic. La unió entre el centre tendinós i el ribet muscular perifèric s'observa com una línia entre una part blanquinosa i una més vermella al diafragma. Aquest és el punt on s'incideix el diafragma i hi creem un defecte ampli. El risc principal de la cirurgia en aquest moment és la lesió del fetge subjacent (el lòbul esquerre hepàtic és molt prominent) ja que si la càpsula hepàtica resulta lesionada, la mort del fetus és gairebé segura. Tot sovint ja s'observa en aquest moment de la cirurgia l'herniació del fetge cap al tòrax. La toracotomia fetal es tanca en un sol pla, amb un o dos punts irreabsorbibles de 6-0. El fetus es reintrodueix a la cavitat amniòtica i tanquem la histerotomia (i la bossa amniòtica) amb una sutura contínua entrellaçada de seda de 4-0. Abans de finalitzar la sutura fem una amnioinfusió amb sèrum fisiològic tebi per deixar la bossa amniòtica del fetus intervingut a una pressió similar a la dels seus veïns. Acostumem a intervenir tres o quatre fetus de cada conilla: els dos de l'extrem i un o dos més, sempre deixant almenys un fetus no intervingut entre dos d'operats.

La laparotomia materna es tanca en dos plànols. El procediment dura com a màxim 1 hora. Acabada la intervenció, la conilla es deixa reposar a la seva caixa de transport, i comprovem que es trobi bé i torni a estar reactiva abans de traslladar-la a la seva gàbia.

A les 18 hores de la intervenció (l'endemà al matí) la conilla rep una altra dosi de Meloxicam im.

#### b. Segona cirurgia fetal

Té lloc el dia 28 de gestació, que correspondria a la segona meitat del tercer trimestre en la gestació humana. També requereix la participació d'un mínim de tres persones de l'equip habitual. La inducció anestèsica es realitza de la mateixa manera. Un cop sedada la conilla, fem una primera ecografia (amb el transductor recolzat sobre l'abdomen matern) per comprovar la viabilitat dels fetus intervinguts. Si cap d'ells és viu, sacrificarem la conilla amb una sobredosi de tiopental sòdic iv. En cas d'observar fetus vius amb hèrnia diafragmàtica, l'anestesiarem i farem una laparotomia mitja seguint el mateix protocol descrit anteriorment. Tornem a prendre mesures hemodinàmiques dels fetus, aquest cop amb el transductor ecogràfic directament sobre l'úter. Seleccionem, aproximadament, la meitat dels fetus viables per a ser sotmesos a oclusió traqueal. En aquest segon procediment, tots els fetus són més grossos, i les seves bosses amniòtiques a vegades se solapen pels extrems. Degut al desplaçament dels fetus pel seu creixement, la histerotomia prèvia no sol ser una bona via d'abordatge per a aquesta nova intervenció. Es requereix una segona histerotomia sobre el cap del fetus seleccionat i cal tenir cura de no obrir, accidentalment, el sac amniòtic del fetus adjacent al que volem operar. S'exterioritza el cap del fetus i fem una cervicotomia transversa. La tràquea resulta fàcil d'identificar entre les dues venes jugulars anteriors. Llavors es disseca, se separa de l'esòfag i es lliga amb una seda de 3-0 o de 2-0. Fer servir una sutura gruixuda per lligar la tràquea disminueix el risc que aquesta estructura se'ns trenqui en nuar-la. Tallem llargs els extrems de la lligadura per poder accedir a la tràquea ràpidament quan els fetus neixin. És innecessari suturar la ferida cervical. La resta de la intervenció té lloc com s'ha descrit per la primera cirurgia fetal.

#### c. Recollida dels fetus

La recollida dels fetus es programa pel dia 30, un abans del terme de la gestació. No es permet el seu naixement de forma espontània, ja que la conilla canibalitza les cries que observa defectuoses. S'indueix l'anestèsia de la mateixa manera. En aquesta darrera intervenció cal prendre mesures hemodinàmiques de tots els fetus intervinguts (hèrnies diafragmàtiques i hèrnies tractades amb lligadura traqueal) i també d'alguns fetus no operats. Realitzem una cesària i extraiem tots els fetus presents, de cop o un a un, en funció de l'equip humà disponible per a fer-se càrrec de cadascun dels fetus. La mare conilla, finalment, se sacrifica seccionant-li la vena cava al final del procediment.

#### d. Avaluació funcional

Els fetus amb lligadura traqueal requereixen una atenció immediata. Els seccionem la tràquea i la intubem directament amb un catèter de teflon de 20G.

Els nounats es diposen dins d'una campana calenta i amb oxigen i se'ls col·loca un pulsioxímetre Nellcor N-595 (Tyco Healthcare Group LP; Nellcor Puritan Bennett Division, Pleasanton, CA, USA). La localització del pulsioxímetre al voltant del coll és un dels millors llocs perquè capti les dades correctament. Mesurem la freqüència cardíaca i la saturació d'O<sub>2</sub> en néixer, als 5, 20, 40 i 60 minuts de vida. Es pesen els nounats i se n'observa l'aparença, color i mobilitat.

#### e. Processament de les mostres

Si no han mort, els fetus se sacrifiquen a l'hora de vida amb una sobredosi de tiopental sòdic intraperitoneal. L'autòpsia dels fetus es fa seguint el següent protocol:

- Laparotomia mitja amb extensió subcostal bilateral. Aquest abordatge permet una exposició màxima del diafragma, la confirmació de l'hèrnia diafragmàtica i l'observació de quines vísceres s'han herniat cap al tòrax.
- Esternotomia mitja ampliada amb una toracotomia esquerra baixa per a respectar la inserció del diafragma i valorar el defecte diafragmàtic creat.
- Realització de fotografies de les cavitats abdominal i toràcica.
- Registre de les vísceres abdominals s'han herniat cap al tòrax i en quina mesura, així com l'estat dels pulmons (inflats d'aire o atelectàsics, un indicador de què aquells pulmons mai no han respirat).
- Extirpació d'ambdós pulmons per separat. Es pesen amb una balança de 0,01g de precisió. Els pulmons es col·loquen en un tub d'Eppendorf i es congelen sobtadament per immersió en nitrogen líquid (la temperatura d'ebullició del qual és de -198,5°C sota una atmosfera de pressió). Aquesta congelació tan ultraràpida permet que els teixits tinguin menys artefactes en l'estudi microscòpic. Posteriorment, les mostres es conserven a -70°C fins al moment de la seva utilització.

Es calcula el LBWR d'acord amb la fórmula:  $LBWR = (\text{pes pulmó esquerre} + \text{pes pulmó dret}) / \text{pes corporal} \times 100$ .

#### f. Estudi hemodinàmic

Hem fet servir un ecògraf d'alta resolució (Siemens Sonoline Antares, de Siemens Medical Systems, Malvern, PA, USA) equipat amb un transductor lineal de 13MHz. Un membre de l'equip, expert en ecografia fetal diagnòstica, ha estat el responsable de realitzar totes les mesures hemodinàmiques de l'estudi de manera sistemàtica.

Totes les mesures han estat preses sobre el pulmó dret, el contralateral a l'hèrnia, per tres raons: el pulmó dret és més gros i està menys distorsionat per la presència de vísceres al tòrax, l'esquerre és massa hipoplàsic per a permetre l'estudi hemodinàmic i perquè en la pràctica clínica amb fetus humans també es mesura el pulmó contralateral a l'hèrnia. Quan el fetus està girat i no ens ofereix aquest pulmó amb facilitat, el manipulem suaument perquè l'hemitòrax dret s'apropi a la paret uterina. Llavors, s'identifica l'artèria pulmonar dreta just quan acaba d'entrar al pulmó en un tall transversal del tòrax al nivell de les quatre càmeres cardíaques. Els paràmetres característics de l'ona de pols de l'artèria pulmonar es mesuren en un moment en què trobem almenys tres cicles d'ones sense els artefactes que poden produir els moviments fetals. Aquests paràmetres inclouen: l'índex de pulsatilitat (PI), el pic màxim de flux revers diastòlic (PEDRF o *peak of early diastolic reversed flow*) i el pic de màxima velocitat sistòlica (PMSSF o *peak of maximum systolic speed flow*). Fent servir la tecnologia power doppler, també obtenim la fracció de sang en moviment (FMBV) que perfora el pulmó dret. Es van obtenir almenys cinc mesures de cada individu. El valor assignat a la variable per a cada registre correspon a la mitjana de les mesures obtingudes.

En aquells apartats en què es fa una correlació dels valors de l'estudi hemodinàmic amb les altres variables només s'han considerat les mesures de PI i FMBV preses just abans de la cesària. Com que l'ecografia es realitza directament sobre el fetus abans de la seva extracció, aquest és l'únic moment en què podem identificar amb tota seguretat a quin fetus correspon cada mesura i, per tant, relacionar-la amb els altres paràmetres d'aquest animal.

#### g. Estudi histològic

Totes les mostres pulmonars s'han processat al laboratori d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic. Hem examinat seccions de cada pulmó esquerre (el més afectat per l'hèrnia diafragmàtica) tenyides amb hematoxilina-eosina. Per a l'estudi s'ha seleccionat aquella lamineta que inclou la màxima secció del pulmó i que permeti observar tant el lòbul superior com l'inferior. De cada lamineta hem analitzat:

- Recompte alveolar radial: estima el grau d'hipoplàsia pulmonar. Ens dóna una idea del volum d'un lobulett respiratori. El recompte alveolar radial representa el nombre d'alvèols que travessa la línia perpendicular entre un bronquioll respiratori i el septe interlobulillar més proper. S'ha adoptat el mètode de mesura descrit originalment per Emery(161). El bronquioll respiratori és aquell on l'epiteli columnar canvia a epiteli respiratori. El septe més proper sol ser o bé la pleura o bé una paret venosa. Si la línia passa per l'envà entre dos alvèols en comptarem només un. Si es dóna el cas que el septe més proper es troba més enllà de 20 alvèols assumim que aquest septe no és representatiu d'aquest lobulett respiratori i, per tant, aquesta mesura serà descartada. S'han pres, almenys, deu mesures de recompte alveolar radial de cada pulmó i se n'ha obtingut la mitjana. Amb això pretenem minimitzar els errors atribuïbles a la variabilitat del plànol de secció sobre una estructura tridimensional com és un lobulett respiratori. Totes les mesures de recompte alveolar han estat fotografiades i validades per un patòleg expert.
- Mesura del gruix proporcional de la capa muscular arteriolar: Es mesura el diàmetre extern de l'arteriola o DE (per fora de la túnica mitja) i el diàmetre intern o DI (la llum de l'arteriola). El gruix proporcional de la capa muscular o AMT (*arterial muscular thickness*) es calcula segons la fórmula:  $AMT = (DE - DI) / DE \times 100$ . Almenys 50 arterioles d'un diàmetre màxim de 150  $\mu\text{m}$  són mesurades de cada pulmó esquerre. En aquells vasos la secció dels quals no era perfectament rodona hem considerat el seu diàmetre menor. S'han rebutjat les arterioles en què el seu diàmetre màxim era més del doble que el diàmetre més curt, per tal de minimitzar el biaix que podrien ocasionar els vasos de secció transversal (que poden incloure més gruix de paret muscular en la seva secció).

#### h. Estudi immunohistoquímic

S'ha fet una anàlisi immunohistoquímica estàndard per a determinar l'expressió dels factors de creixement VEGF i TGF- $\beta$ 3. Aquests dos són els únics factors relacionats amb el desenvolupament pulmonar contra els quals hi ha anticossos disponibles per a mostres de conill: anticòs monoclonal anti-VEGF ab46154 (Abcam Inc. Cambridge, MA, USA) i anticòs monoclonal anti-TGF- $\beta$ 3, Clone Xn-12 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA).



Si l'anàlisi immunohistoquímica no fos satisfactòria, es realitzarà un Western blot com a tècnica alternativa sempre que sigui possible. S'ha planificat una tècnica de Western blot estàndard que utilitza una peroxidasa anti-ratolí com a segon anticòs: sheep anti-mouse horseradish-peroxidase-conjugated antibody (Amersham, Aylesbury, UK). Les imatges del Western blot es prendran amb una càmera Fuji Film Image Reader LAS 3000 i es quantificaran amb el programa Image J 1.45s (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

i. Càlculs estadístics

Les variables s'han comparat entre grups. S'ha utilitzat el programa d'anàlisi estadístic Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 20.0; SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Al capítol de Resultats s'especifiquen les proves estadístiques emprades en cada estudi. S'ha acceptat com a significativa una probabilitat  $p < 0,05$ . Finalment s'han aparellat les variables i s'han dibuixat les correlacions lineals.

## V. RESULTATS

### 1. El model animal

Hem intervingut 40 conilles gestants. Entre les mares conilles, hem tingut dues morts durant la intervenció quirúrgica. Les morts maternes han estat degudes a una depressió respiratòria (cal recordar que les conilles es mantenen amb una anestèsia inhalatòria amb ventilació espontània).

Hem intervingut 133 fetus, segons el protocol descrit a Material i Mètodes. Després de 50 temptatives sense èxit, 36 de 83 fetus van sobreviure a la confecció d'una hèrnia diafragmàtica. A disset d'aquests fetus se'ls va realitzar una oclusió traqueal. Vint-i-cinc fetus van arribar vius al terme de l'experiment, dels quals dinou han estat individus vàlids per al nostre treball. Sis fetus foren exclosos per raons diverses: en tres casos tots els espais aeris estaven plens de leucòcits (recordava una pneumònia massiva o una corioamnionitis), cosa que feia impossible l'estudi morfològic; hi havia un fetus del grup OT que no presentava hèrnia diafragmàtica; un altre fetus del grup HD, tot i tenir un defecte diafragmàtic, fou exclòs perquè no tenia cap víscera herniada al tòrax; un darrer fetus fou eliminat per una mala identificació de les seves mostres.

Finalment, els grups d'estudi han quedat constituïts d'aquesta manera:

- Grup HD (d'hèrnia diafragmàtica): 9 individus.
- Grup OT (d'oclusió traqueal): 10 individus.
- També s'han analitzat 17 individus no intervinguts.

### 2. Estudi hemodinàmic

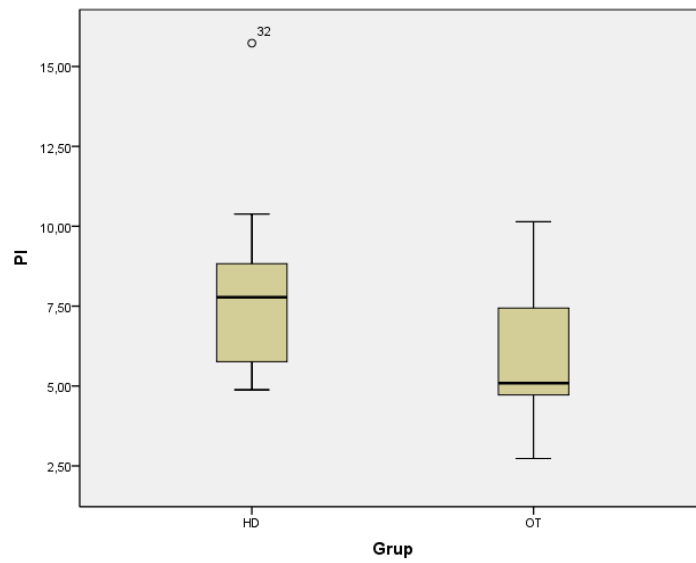
L'índex de pulsatilitat (PI) del grup HD era significativament més alt que el del grup OT ( $11.4 \pm 3.8$  vs  $5.5 \pm 2.2$ ;  $p=0,018$  amb la prova U de Mann-Whitney).

La fracció de sang en moviment (FMBV) del grup OT era superior a la del grup HD ( $TO=28 \pm 7.2\%$  vs  $DH=15.6 \pm 7.3\%$ ;  $p=0,001$  amb la U de Mann-Whitney).

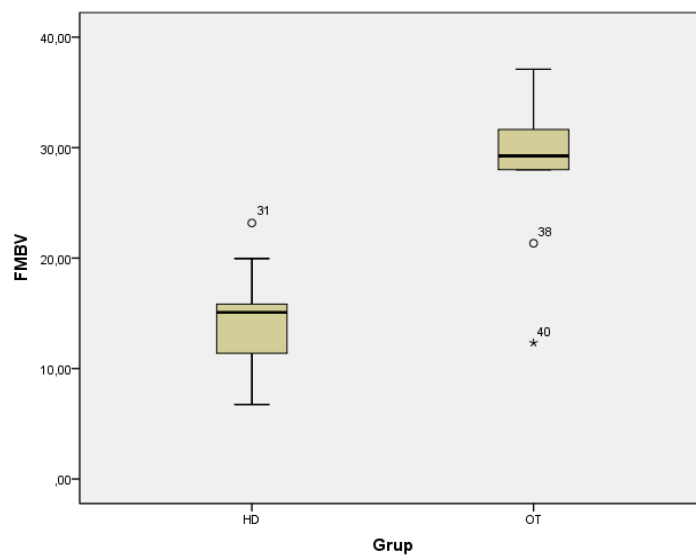
Ni el PEDRF ni el PMSSF han presentat diferències significatives entre ambdós grups.

Les gràfiques següents resumeixen aquestes troballes:

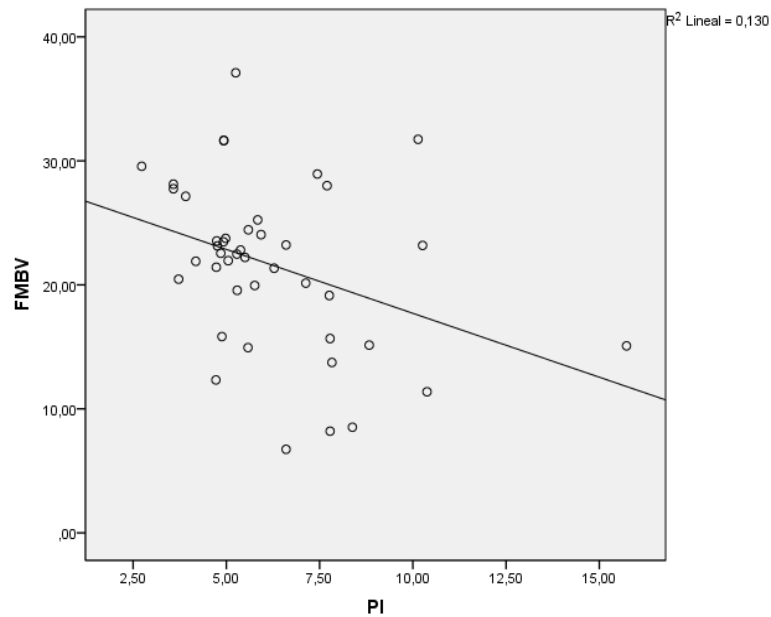
**Figura 6:** Distribució del PI segons els grups



**Figura 7:** Distribució del FMBV segons els grups



- Hi ha una correlació lineal moderada entre els dos principals paràmetres hemodinàmics PI i FMBV ( $r=-0,361$   $p=0,018$ ).



**Figura 8:** Correlació entre el PI i FMBV

### 3. Situació neonatal

L'hem estimat a través de mesures objectives com la saturació d'O<sub>2</sub> i la freqüència cardíaca, i aspectes subjectius com el color o la vitalitat del nounat. Tots aquests són paràmetres que valoraríem en una versió simplificada del test d'Apgar. Hem donat més pes als valors objectius i quantificables.

Disposem de les dades de l'oxigenació neonatal de 5 nounats del grup HD i 3 nounats del grup OT. Podem comparar aquests resultats amb els dels seus germans no intervinguts (N). La taula següent reflecteix el que hem observat, juntament amb algunes mesures d'hipoplàsia pulmonar i la morfologia arterial:

Taula 9: Resum de les dades de situació neonatal

| Grup | Millor Sat O <sub>2</sub> <sup>a</sup> | Millor FC <sup>b</sup> | LBWR <sup>c</sup> | RAC <sup>d</sup> | AMT <sup>e</sup> |
|------|--|------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| 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            |
| OT   | 90                                     | 70                     | 2,36              | 2,80             | 46,63            |
| OT   | 65                                     | 60                     | 1,91              | 5,50             | 32,98            |
| OT   | 91                                     | 95                     | 2,07              | 4,60             | 43,68            |
| N    | 91                                     | --                     | 2,46              | 4,08             | 41,80            |
| N    | 100                                    | 190                    | 2,80              | 3,67             | 48,98            |
| N    | 87                                     | 59                     | 2,32              | 4,58             | 46,61            |
| N    | 94                                     | 170                    | 2,20              | 5,46             | 39,51            |
| N    | 84                                     | 160                    | --                | 5,20             | 45,44            |
| N    | 74                                     | 168                    | 0,99              | 4,10             | 36,86            |
| N    | 90                                     | 155                    | 1,87              | 3,83             | 44,67            |
| N    | 96                                     | 85                     | 2,09              | 4,60             | 49,35            |

\*S'han inclòs aquests fetus en aquest apartat, malgrat no disposar de dades numèriques objectives, perquè eren fetus vius que es movien a l'estímul. No es comptabilitzen a les gràfiques, però se'n parlarà a la discussió.

<sup>a</sup> Sat O<sub>2</sub>: saturació d'oxigen.

<sup>b</sup> FC: freqüència cardíaca.

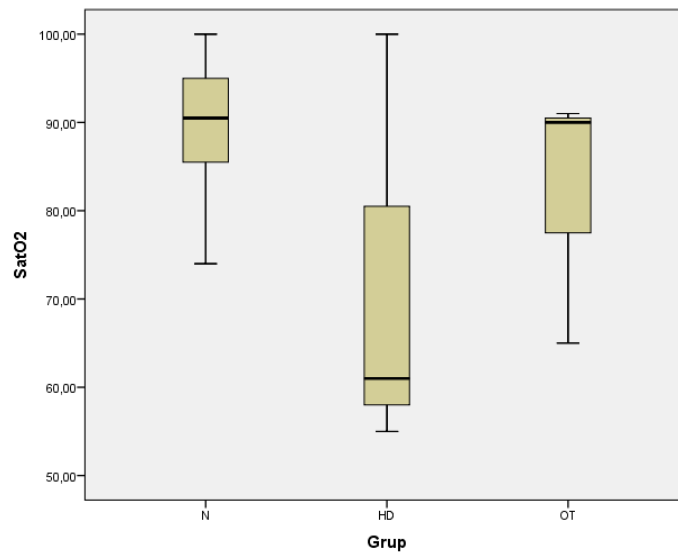
<sup>c</sup> LBWR (*lung to body weight ratio*) fa referència a la relació entre el pes pulmonar i el pes corporal. És una mesura d'hipoplàsia pulmonar. L'apartat 4 dels Resultats en parla específicament.

<sup>d</sup> RAC (*radial alveolar count*) és una mesura d'hipoplàsia pulmonar que també detallo a l'apartat 4

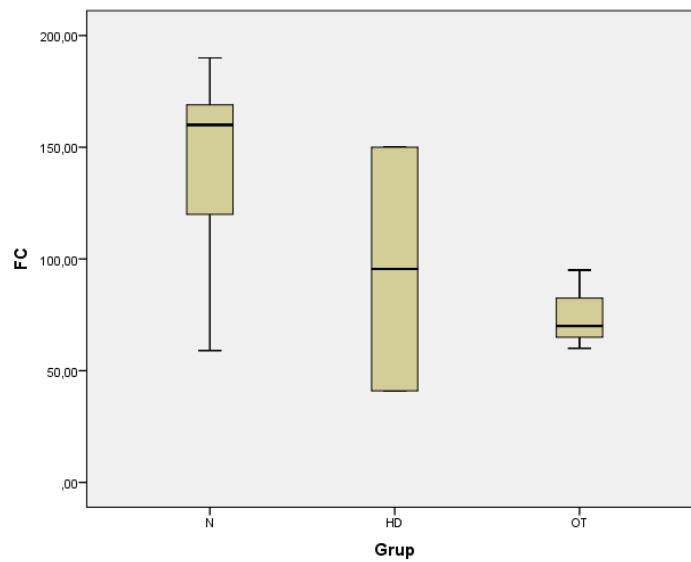
<sup>e</sup> AMT (*arterial muscular thickness*) mesura el gruix de la capa muscular i dóna una idea del grau de maduresa de les arterioles.

- Tot i ser una dada subjectiva, la vitalitat i la mobilitat dels individus de cada grup ha estat fàcil d'avaluar. Els nounats amb hèrnia diafragmàtica arribaven a l'hora de vida morts o moribunds i amb un color grisós. Els no operats eren normals, de color rosat i es movien activament. L'aspecte dels nounats amb oclusió traqueal se situava entre els extrems anteriors: tenien mal color (sense arribar al gris) i es movien sense força a l'estímul.
- Les gràfiques següents resumeixen les dades més significatives de la taula prèvia. Com que fan referència a molt pocs individus, he incorporat el grup no operat i he obviat qualsevol anàlisi estadística dels resultats.

**Figura 9:** Distribució de la saturació d'oxigen segons els grups

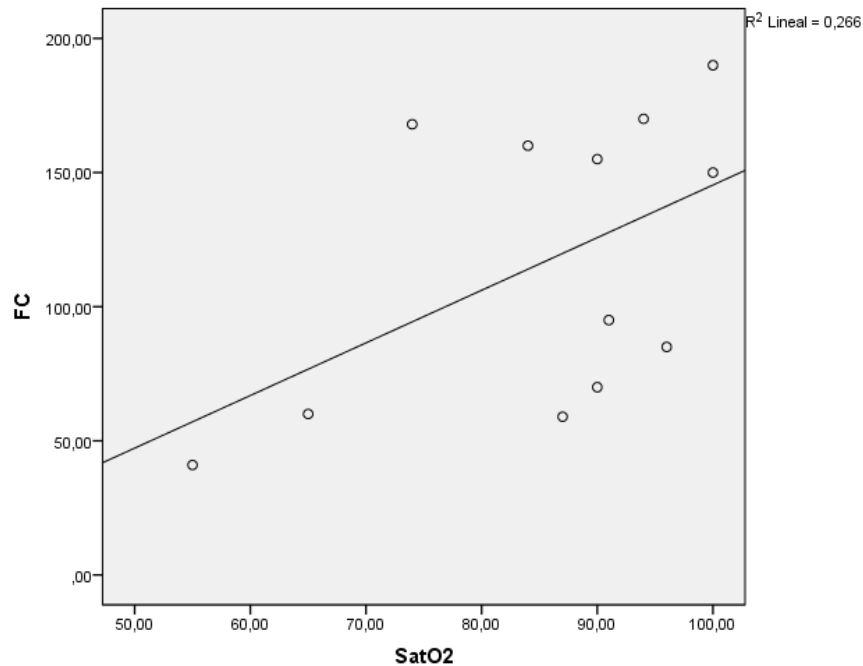


**Figura 10:** Distribució de la freqüència cardíaca segons els grups



- Hi ha una correlació lineal moderada entre els valors observats de la saturació d'O<sub>2</sub> i la freqüència cardíaca ( $r=0,516$  i  $p=0,086$ ).

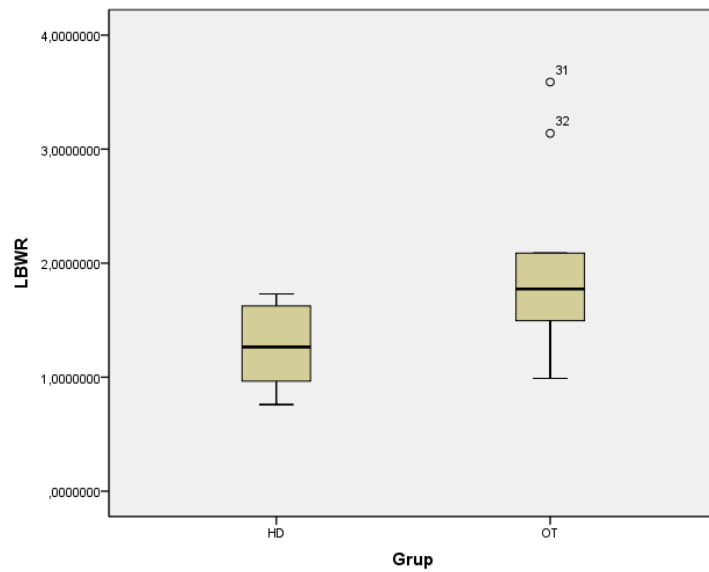
**Figura 11:** Correlació entre la SatO<sub>2</sub> i la FC



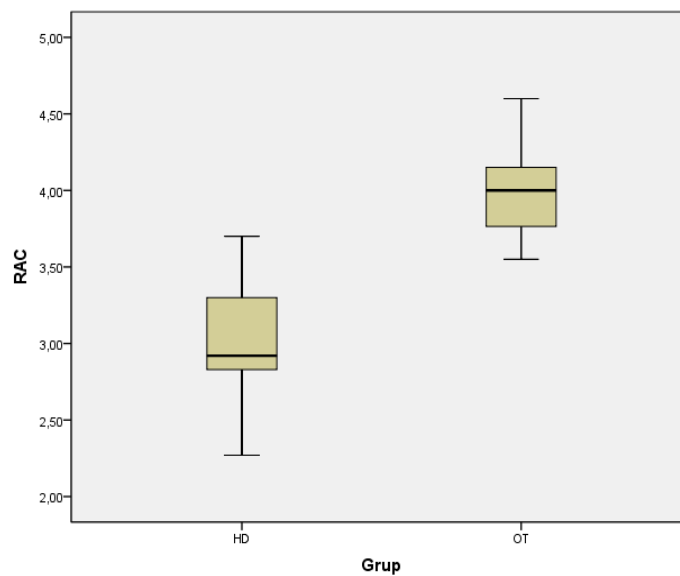
#### 4. Morfologia descriptiva

LBWR i RAC, ambdós estimadors d'hipoplàsia pulmonar, presentaven valors significativament més baixos al grup HD que al grup OT (LBWR:  $1.27 \pm 0.38$  al grup HD vs  $1.96 \pm 0.81$  al grup OT,  $p=0,041$  segons la U de Mann-Whitney; RAC:  $2.8 \pm 0.4$  al grup HD vs  $3.9 \pm 0.34$  al grup OT,  $p=0,001$  segons la U de Mann-Whitney). És més, el valor de RAC al grup OT s'assemblava al dels nounats no intervinguts (RAC individus no intervinguts:  $4.7 \pm 1$ ;  $p=0,80$ ). En canvi, la distribució del LBWR entre els individus del grup N (LBWR:  $2.35 \pm 0.38$ ) i OT presenta diferències significatives ( $p=0,035$ ).

**Figura 12:** Distribució del LBWR segons els grups



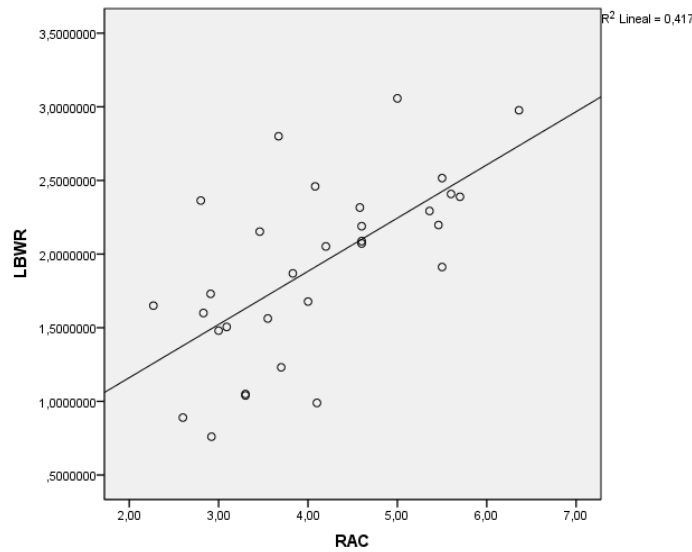
**Figura 13:** Distribució del RAC segons els grups



- Hi ha una correlació lineal forta i clarament significativa entre els dos paràmetres que estimen la hipoplàsia pulmonar: el RAC i el LBWR ( $r=0,684$  i  $p<0,001$ ).

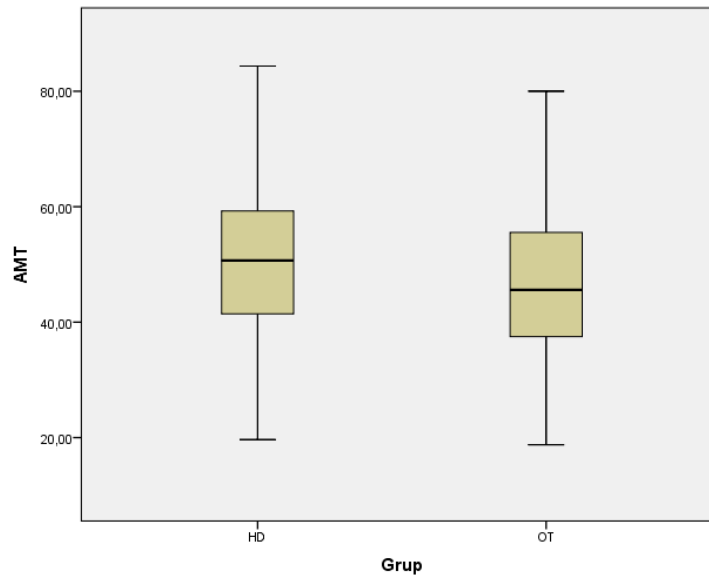


**Figura 14:** Correlació entre el RAC i el LBWR



- Morfologia vascular:
  - Hem realitzat un total de 435 mesures d'arterioles al grup d'individus amb HD; 484 arterioles als individus amb OT; i 812 mesures de subjectes no intervinguts. La distribució de tots els paràmetres estudiats s'ajusta perfectament a una corba de normalitat (d'acord amb les gràfiques Q-Q normal). Tanmateix, les proves de normalitat aplicades a les variables DE (diàmetre extern), DI (diàmetre intern) i AMT (test de Kolmogorov-Smirnov) no permeten acceptar la normalitat en tots els casos. Després de consultar-ho amb un expert en bioestadística, i considerant l'elevat nombre de mesures realitzades, hem pres la decisió de fer servir proves paramètriques per als càlculs estadístics en tots els casos.
  - Les arterioles mesurades al grup d'individus amb HD i OT són homogènies en quant al seu diàmetre extern i llum vascular, amb una  $p=0,22$  i  $p=0,74$ , respectivament. Aquesta homogeneïtat també és extensible a les comparacions amb el grup d'individus no intervinguts (N) i a tot el conjunt (N, HD i OT). L'ANOVA per a la variable DE dóna un valor de  $p=0,196$  i, per a la variable DI, una  $p=0,803$ .
  - La següent gràfica i taula ens ofereixen un resum de la distribució del paràmetre més significatiu: el gruix proporcional de la capa muscular (AMT).

**Figura 15:** Distribució de l'AMT segons els grups

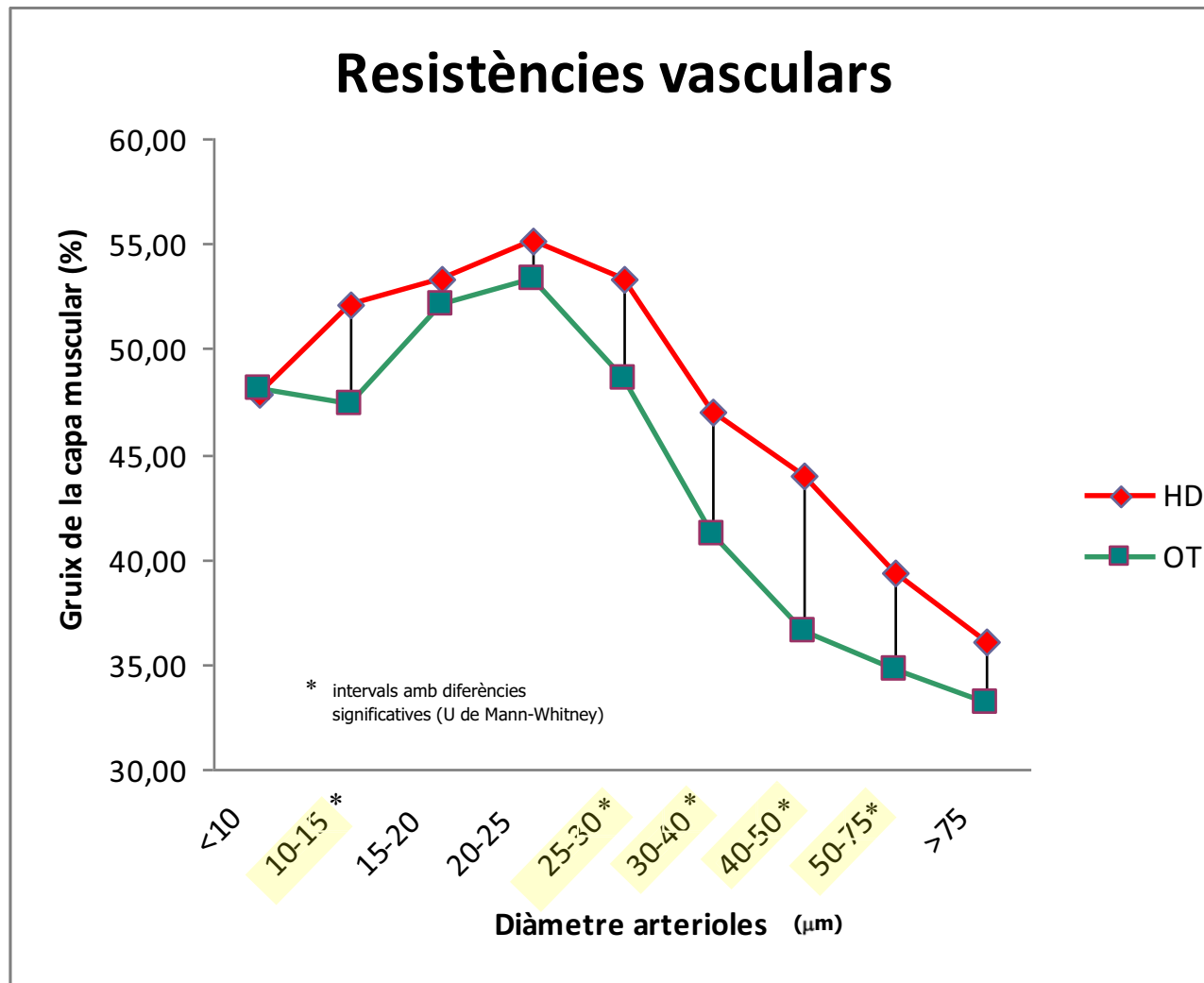


**Taula 10:** Resum de la distribució de l'AMT

|                            | <b>HD</b> | <b>OT</b> |
|----------------------------|-----------|-----------|
| <b>Mitjana</b>             | 50,53     | 46,60     |
| <b>Desviació estàndard</b> | 12,04     | 12,41     |
| <b>Mediana</b>             | 50,68     | 45,59     |
| <b>Interval</b>            | 64,74     | 61,25     |

- La mitjana del gruix de la capa muscular entre els grups HD i OT és significativament diferent amb un valor de la  $p < 0,001$  (prova de la t de Student). La magnitud d'aquesta diferència pot estimar-se en 3,93 punts amb un interval de confiança 95% de 2,34-5,51.
- Amb l'objectiu de demostrar diferències en el grau de muscularització de les arterioles en relació al seu ordre de divisió, s'han distribuït les arterioles en grups d'acord al seu diàmetre. La següent gràfica representa el valor mitjà per a cada interval de diàmetre i en cadascun dels grups. Les arterioles entre 15 i 30  $\mu\text{m}$  són les que ofereixen una major resistència al flux de la sang en el nostre model. Observem diferències estadísticament significatives entre els grups d'HD i OT a la distribució del valor del gruix de la capa muscular de les mostres corresponents als intervals de diàmetre entre 10 i 15  $\mu\text{m}$  ( $p=0,005$ ), 25 i 30  $\mu\text{m}$  ( $p=0,010$ ), 30 i 40  $\mu\text{m}$  ( $p=0,003$ ), 40 i 50  $\mu\text{m}$  ( $p=0,029$ ) i 50 i

75  $\mu\text{m}$  ( $p=0,020$ ). La mateixa gràfica, amb el grup d'individus no intervinguts, també s'adjunta a la discussió.

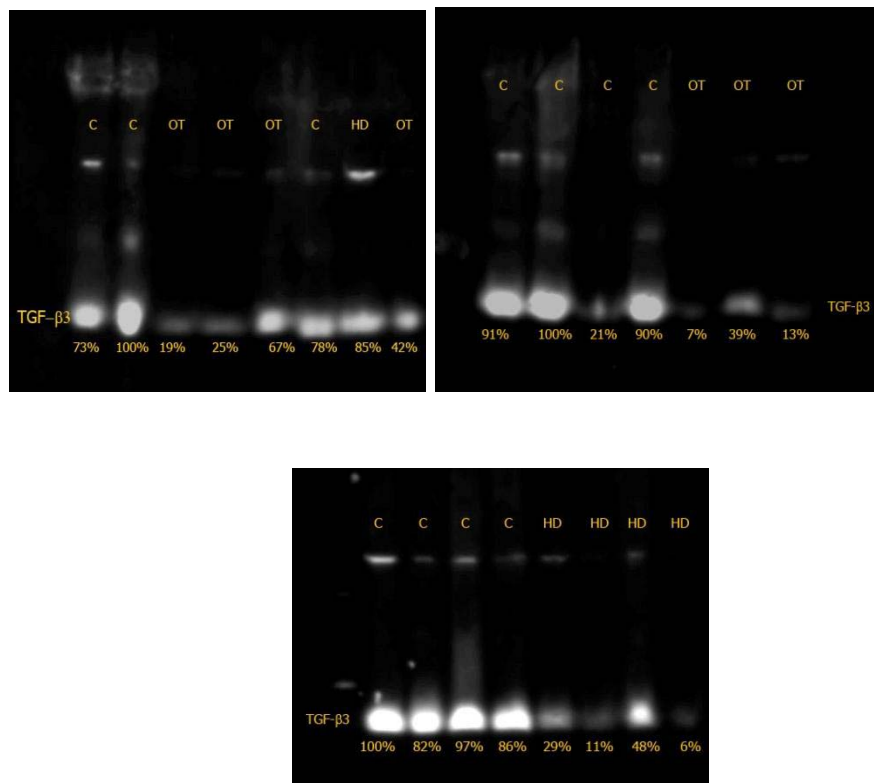


**Figura 16:** Distribució de l'AMT segons el diàmetre de l'arteriola

## 5. Anàlisi immunohistoquímica:

La tinció immunohistoquímica per al VEGF fou massiva i difusa en totes les mostres i en ambdós grups, així com també en els individus normals. La immunohistoquímica per al TGF- $\beta$ 3 presentava una bona tinció però molt inespecífica. A grans trets, no hi havia cap diferència entre les mostres dels grups HD ni OT, ni tampoc entre els individus normals.

El Western blot per al TGF- $\beta$ 3 va demostrar la màxima expressió entre els individus normals, mentre que es trobava disminuïda al grup HD (aproximadament un 65% de la intensitat de l'expressió mesurada en individus normals) i encara més en el grup OT (al voltant d'un 32% respecte als individus normals). El Western blot no fou possible per al VEGF.



**Figura 17:** Western blots. Cadascun dels pous correspon a un individu diferent. La banda més ample que pot observar-se a la part baixa de la imatge és la corresponent al TGF- $\beta$ 3. Mitjançant un programa de tractament d'imatges digitals, hem analitzat quantitativament la intensitat del senyal del TGF- $\beta$ 3 de cada individu. Per fer-ho hem considerat com a 100% el senyal més intens que expressi un dels individus del gel; els altres individus es quantifiquen com una fracció d'aquest individu amb màxim senyal. En tots els gels el 100% correspon a un individu control. La manca d'un estàndard comú entre els cinc gels d'electroforesi que hem fet servir fa molt difícil poder comparar entre si les mostres provinents de gels diferents. Per això, s'ha obviat qualsevol anàlisi estadística. (C= individu sa; HD= individu del grup amb hèrnia diafragmàtica; OT= individu amb HD tractada amb oclusió traqueal).

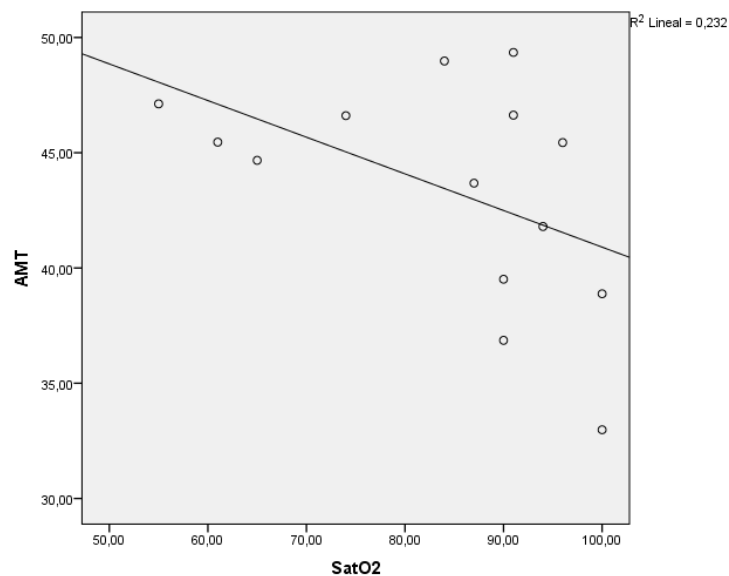
## 6. Correlacions de variables de diferents tipus:

Hem agrupat les variables de l'estudi en quatre categories: les que valoren el grau d'hipoplàsia pulmonar (LBWR i RAC), les variables hemodinàmiques (PI i FMBV), les que valoren el desenvolupament vascular (AMT) i, per últim, les que estimen la situació neonatal (FC i SatO<sub>2</sub>). Com que disposem de poques dades de la situació neonatal, els resultats i l'anàlisi posterior diferencien les correlacions amb aquestes variables de tota la resta.

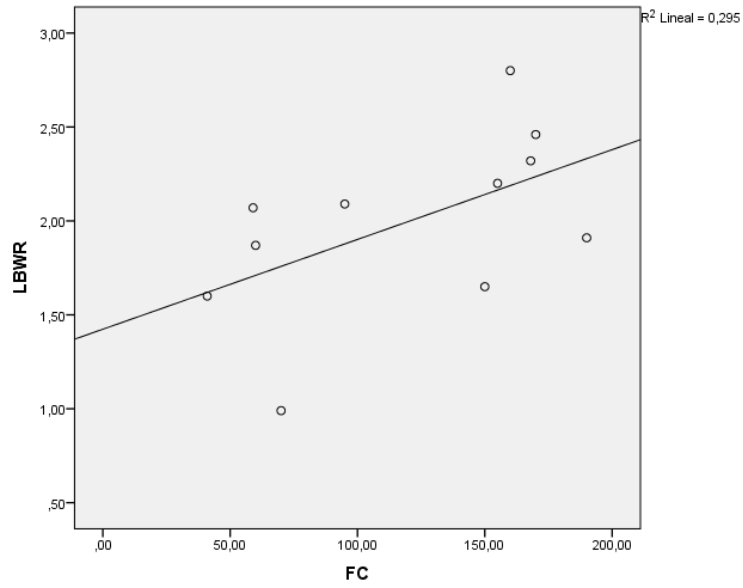
- Correlacions entre les variables de situació neonatal i les altres:

Hi ha una correlació lineal discreta entre SatO<sub>2</sub>/RAC ( $r=0,380$  i  $p=0,18$ ), SatO<sub>2</sub>/AMT ( $r=-0,482$  i  $p=0,081$ ) i FC/LBWR ( $r=0,543$  i  $p=0,084$ ).

**Figura 18:** Correlació entre SatO<sub>2</sub> i AMT



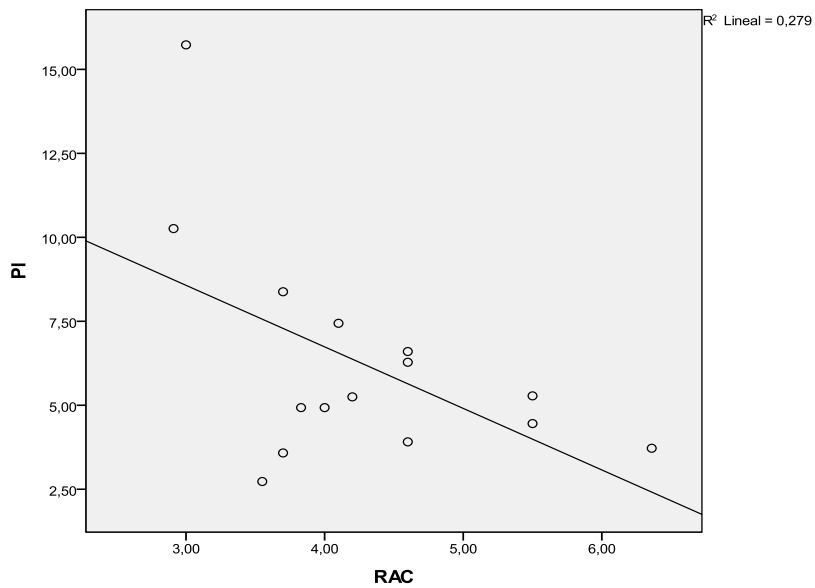
**Figura19:** Correlació entre FC i LBWR



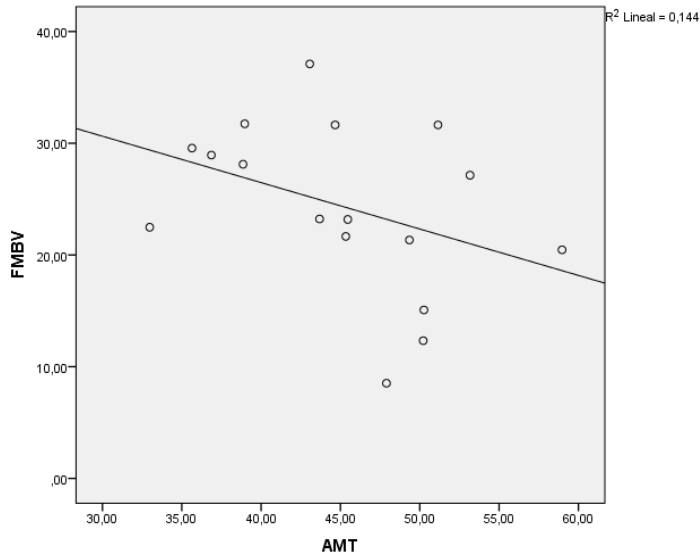
- Correlacions entre els altres grups de variables:

Hi ha una correlació lineal significativa entre RAC i PI ( $r=-0.528$ ,  $p=0.043$ ). AMT també presenta una correlació lleu amb FMBV ( $r=-0.379$ ,  $p=0.133$ ).

**Figura 20:** Correlació entre RAC i PI

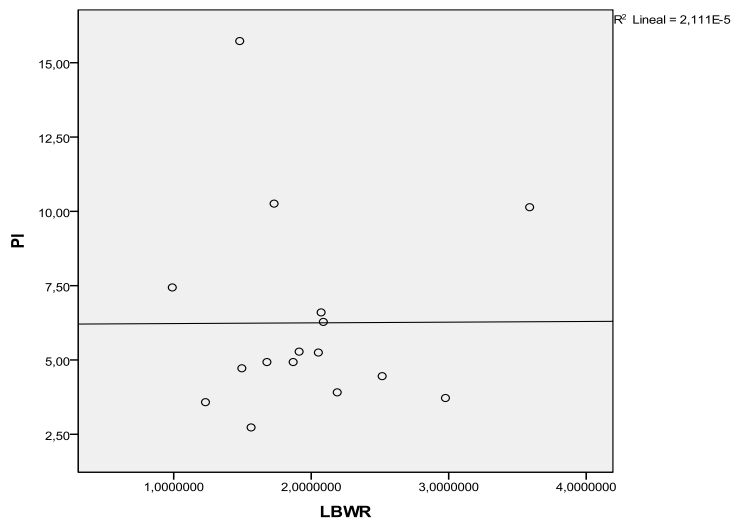


**Figura 21:** Correlació entre AMT i FMBV



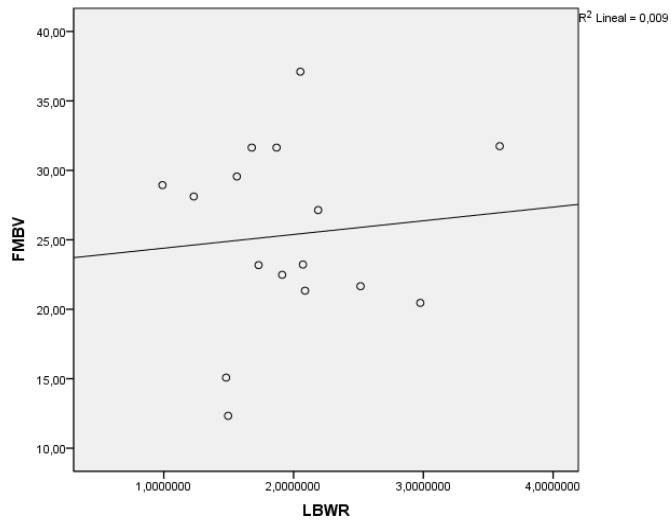
Hi ha una absència de correlació entre qualsevol altre parell de variables: LBWR/PI, LBWR/FMBV, LBWR/AMT, RAC/FMBV, PI/AMT i RAC/AMT. Hem anomenat patró de no correlació o “correlacions planes” a tot aquest conjunt de variables que no mantenen cap correlació aparent entre si.

**Figura 22:** Correlació entre LBWR i PI

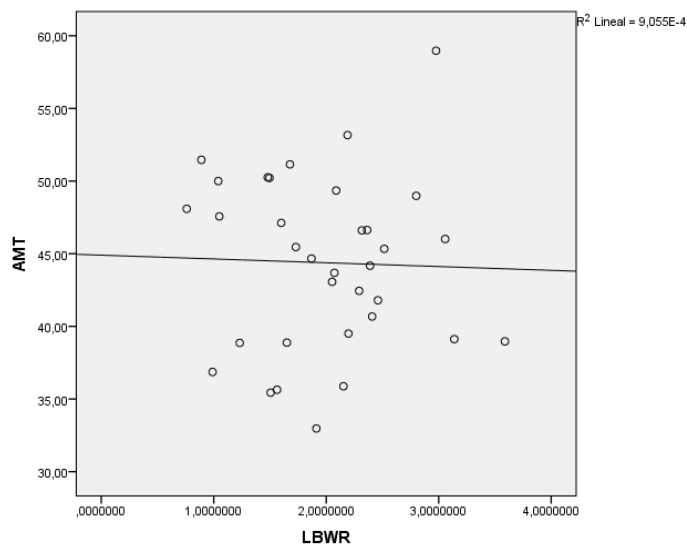




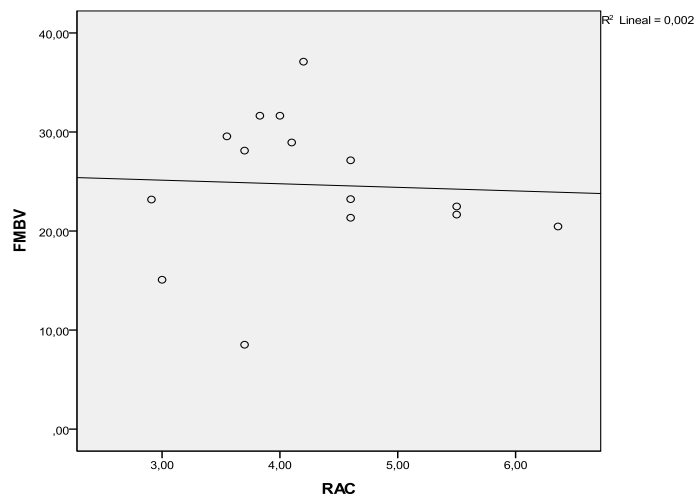
**Figura 23: Correlació entre LBWR i FMBV**



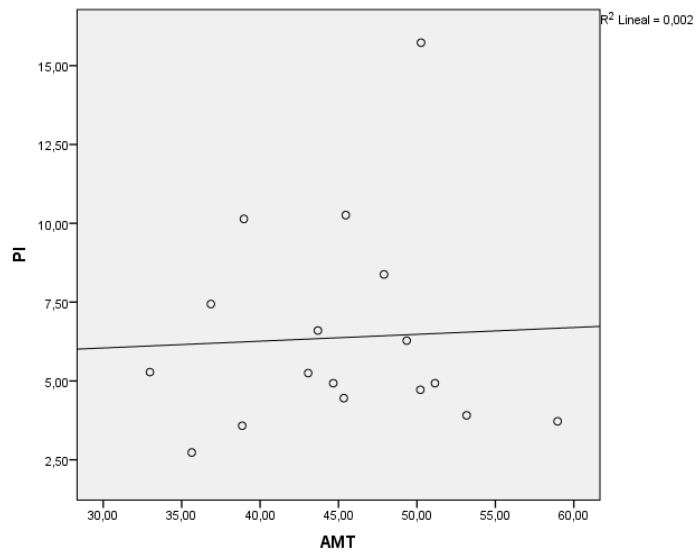
**Figura 24: Correlació entre LBWR i AMT**



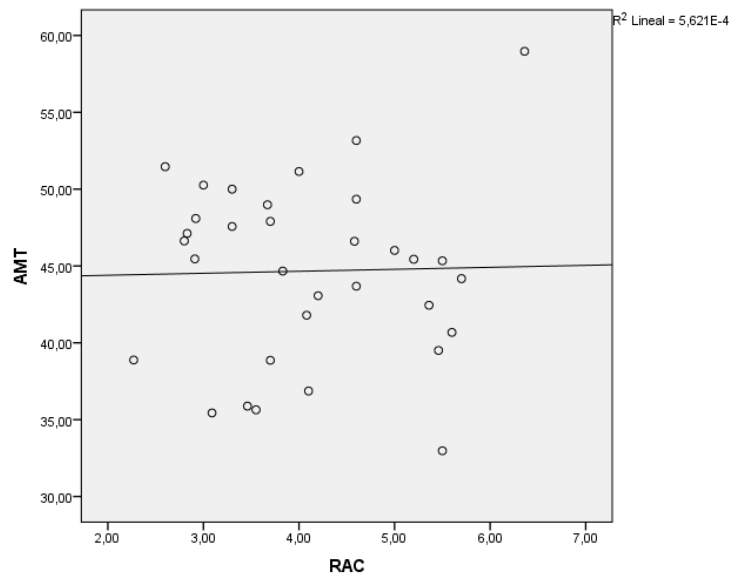
**Figura 25: Correlació entre RAC i FMBV**



**Figura 26:** Correlació entre AMT i PI



**Figura 27:** Correlació entre RAC i AMT



## VI. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

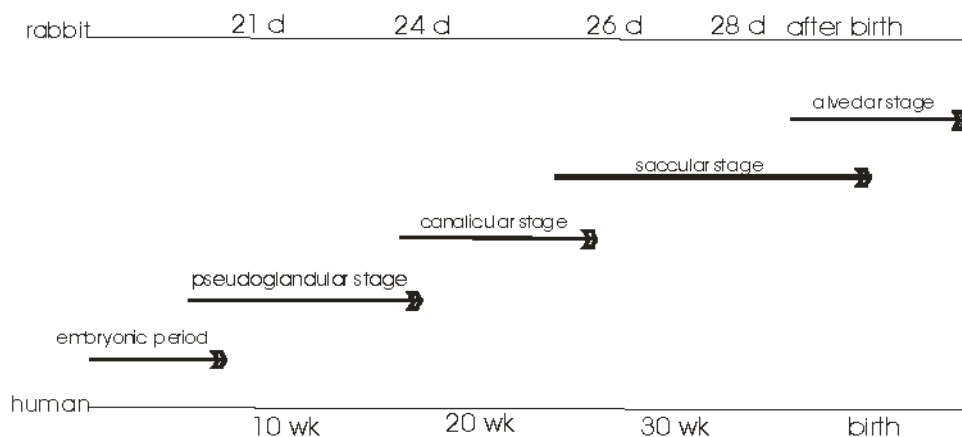
### 1. Anàlisi del model i validesa interna

#### a. Sobre el model animal

En aquest treball, l'estudi hemodinàmic té una importància cabdal. Hem escollit el model d'HD en conill perquè és el més petit i assequible que permet obtenir les mesures hemodinàmiques. En animals més petits, com la rata o el ratolí (en els quals existeix un model teratogènic més senzill d'HD) l'estudi hemodinàmic de l'artèria pulmonar no és factible degut al petit calibre del vas. Els animals més grossos, com l'ovella, requereixen més diners, més temps (la gestació és més llarga) i unes instal·lacions especials de les quals no disposem.

Treballar amb conills també ofereix altres avantatges:

- El desenvolupament pulmonar del conill és força similar a l'humà. Es diferencien en què la fase pseudoglandular s'allarga més al conill, mentre que les fases següents tenen lloc en uns pocs dies(162;163). La gràfica següent compara els períodes de desenvolupament pulmonar al conill i a l'humà(164;165).



**Figura 28:** Comparació entre el desenvolupament pulmonar de l'humà i el conill

- El model d'hèrnia diafragmàtica al conill ja ha estat descrit i validat per altres grups(117;135;166-170).
- L'experiència del nostre grup en l'anestèsia i la cirurgia fetal en conills(159;171-173).

La mortalitat fetal global de l'estudi ha estat elevadíssima. De fet, només el 14% dels fetus intervinguts han estat vàlids per al treball. Aquestes xifres tan extremes podrien aixecar sospites sobre la validesa dels resultats. En realitat, però, això tradueix una corba d'aprenentatge molt marcada. En els primers 50 fetus intervinguts la mortalitat fou del 100%. Llavors vam buscar l'ajut del Dr. J. Jani, un expert que ja havia treballat i publicat experiments realitzats amb aquest model(117;174-178).

El Dr. Jani ens va ensenyar que podíem exterioritzar la meitat del fetus sense por (en tots els primers casos manipulàvem el fetus per extreure, només, l'extremitat anterior esquerra, cosa que finalment resultava més traumàtica pel fetus); també vam aprendre el lloc idoni per fer la incisió al diafragma, que el rendiment millorava si treballàvem amb lupes d'augment i, per últim, la importància de l'amniotomia abans de tancar l'úter.

Després de les seves explicacions vam assolir un èxit del 43% en la primera cirurgia fetal (la més exigent), una xifra coherent i acceptable amb un model tan difícil com aquest, i similar al d'altres experiments amb cirurgia fetal.

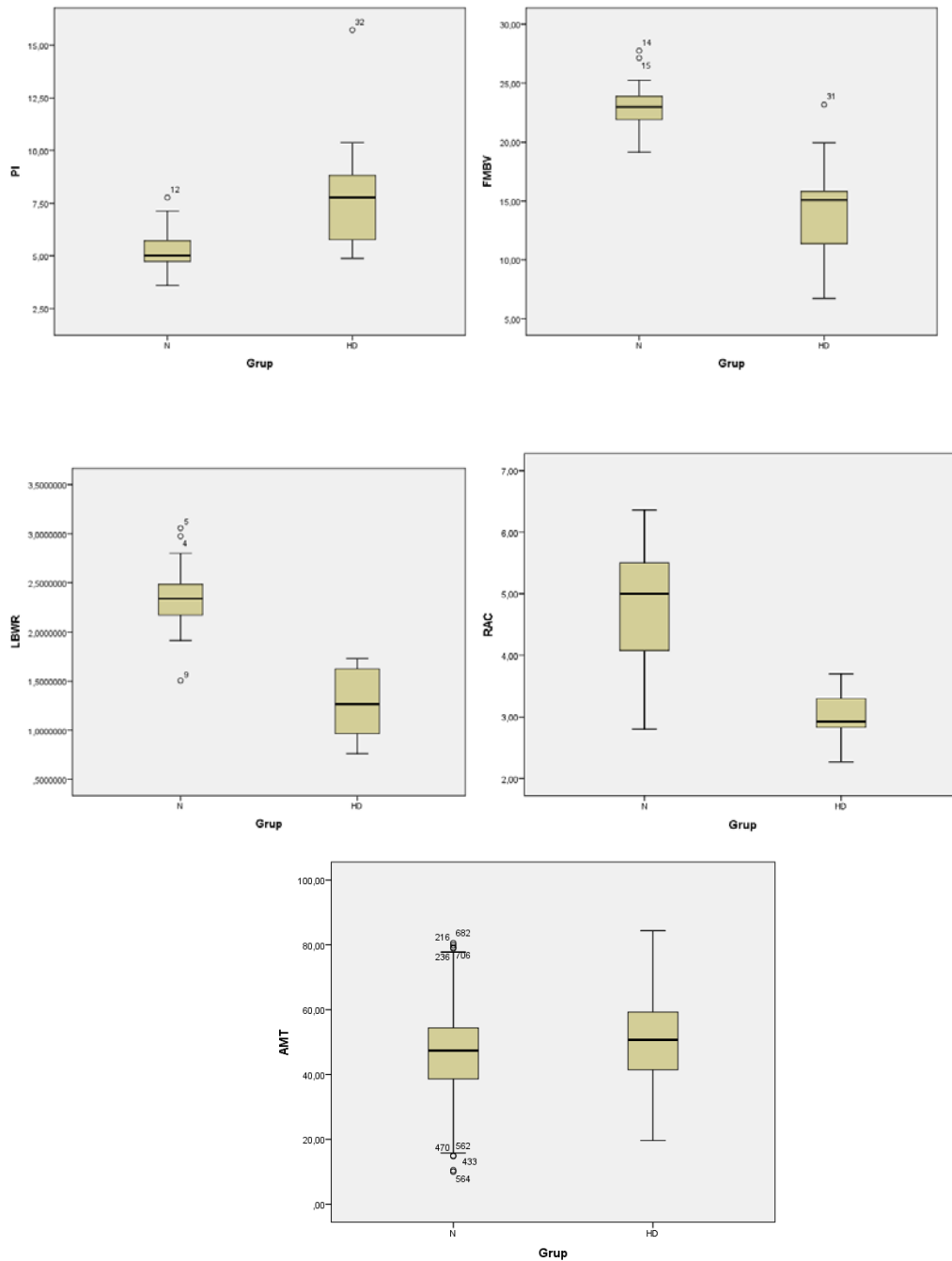
#### b. Validesa del model d'hèrnia diafragmàtica en conill

En aquest model, els individus amb HD que s'obtenen reproduïen les principals característiques de la malformació. Concretament, la validesa del model d'hèrnia diafragmàtica queda demostrada en base a múltiples criteris i ha estat l'objecte de la tesi del nostre company Xavier Tarrado:

- Anatòmicament els nostres subjectes presenten una herniació de les vísceres abdominals al tòrax.
- Els individus que neixen amb HD reproduïen les característiques bàsiques dels pacients humans amb aquesta malformació: destret respiratori greu, hipoplàsia pulmonar i hipertensió pulmonar. Tot això es demostra perquè:
  - o Clínicament i objectivament, tant la saturació d'O<sub>2</sub> com la freqüència cardíaca entre els individus amb HD i els individus sans són marcadament pitjors.
  - o Hemodinàmicament, les HD presenten valors suggestius d'hipertensió pulmonar (representats per l'índex de pulsatilitat i la fracció de sang en moviment), significativament pitjor que els individus normals.

- Els valors de LBWR i de RAC (estimadors d'hipoplàsia pulmonar) també són significativament pitjors que els dels individus normals.
  - Morfològicament, el gruix de la capa muscular de la paret de les arterioles està significativament augmentat als individus amb HD.
- La següent figura resumeix en gràfiques la validesa d'aquest model. En tots els casos, les diferències són significatives amb una  $p < 0,001$ .

**Figura 29:** Resum de les principals gràfiques que comparen els paràmetres més significatius entre els grups HD i N.



Estrictament parlant, el grup d'individus no intervinguts (N) no és un grup control ideal, ja que en no haver estat manipulats presenten més diferències amb el grup HD que l'hèrnia diafragmàtica. Tanmateix, en la present tesi aquests individus només serveixen com a punt de referència de normalitat. A més a més, hi ha altres estudis amb el mateix model animal que si que incorporen un grup control d'animals intervinguts amb una toracotomia fetal sense hèrnia diafragmàtica ("*sham group*") on queda clar que la cirurgia fetal en si mateix no afecta el desenvolupament pulmonar(117;135;167;168).

En tots aquests estudis es demostra, també, la validesa del model, i obtenen uns grups d'animals amb HD i amb OT de característiques molt similars al nostre.

Un cop confirmada la validesa del model d'HD, partirem d'aquests individus amb HD per estudiar l'efecte de l'oclusió traqueal.

El model d'HD en conill comparteix el problema de tots els models quirúrgics: l'HD té lloc en un moment relativament tardà de la gestació. Als humans, com ja hem explicat, l'hèrnia apareix durant el període embrionari i és present des de la formació de les estructures involucrades. Al nostre model, la confecció de l'hèrnia es produeix sobre uns pulmons immersos de ple en el període pseudoglandular.

Malgrat aquestes consideracions, el nostre model d'HD és reproduïble i genera unes conseqüències similars a les que es donen a l'HD de l'humà.

### c. L'oclusió traqueal

Un dels casos exclosos de la sèrie fou un fetus sense hèrnia diafragmàtica al qual, erròniament, vam realitzar una oclusió traqueal. Això reproduïx un model de CHAOS (*Congenital High Airway Obstruction*). Com ja hem comentat, els fetus diagnosticats d'aquesta patologia van inspirar l'aplicació de l'oclusió traqueal als nadons amb HD. Com era d'esperar, els pulmons d'aquest fetus són els més grossos de tota la sèrie; el LBWR d'aquest animal va ser el més alt de tots els individus (3,08%), molt per sobre de la mitjana de LBWR al grup OT (1,97%) o als individus normals (2,36%). Aquest individu dóna coherència al nostre model d'oclusió traqueal.

Els primers models d'OT sobre fetus amb HD que es van desenvolupar van ser en ovelles i conills. Ambdós són models quirúrgics als quals, com ja hem dit, l'hèrnia té

lloc de forma tardana. En aquests models, l'OT provoca una acceleració del creixement pulmonar(133). Kitano es va preguntar si aquest efecte de l'OT també tenia lloc sobre hèrnies diafragmàtiques que es generaven més aviat, com les humanes(115). Utilitzant el model d'HD i nitrofè en rates (que provoca l'HD al període embrionari, com a l'home) va demostrar que l'OT també promou una acceleració del creixement i una maduració pulmonar. Aquest model ha estat, posteriorment, àmpliament utilitzat(116;179-182).

Tot i les limitacions pròpies dels models quirúrgics, els resultats dels grups HD i OT són coherents. Això dona una gran validesa interna al nostre treball.

## 2. Anàlisi dels resultats obtinguts

L'anàlisi dels resultats presenta quatre vessants clarament diferenciades:

- a. Valoració hemodinàmica sobre els fetus vius.
- b. Valoració de l'estat neonatal.
- c. Estudi morfològic macroscòpic i patològic dels subjectes de l'estudi.
- d. Immunohistoquímica.

Hi ha molts treballs que es focalitzen en una sola d'aquestes vessants, especialment la descriptiva. El valor principal d'aquesta tesi és la visió global i integrada de tots quatre àmbits. Igual que a l'exposició dels resultats, discutiré cadascuna d'aquestes vessants per separat i, finalment, n'oferiré una visió conjunta.

### a. La valoració hemodinàmica

Aquest apartat és el més original i innovador. Té el mèrit de valorar la resposta a un tractament sobre un individu viu: el fetus de conill. Les dades de què disposem en aquest apartat són limitades perquè les determinacions hemodinàmiques són difícils de realitzar i molt dependents tant de la disponibilitat de l'ecògraf com de la persona responsable de fer totes les mesures de manera sistemàtica i homogènia.

Els paràmetres hemodinàmics que hem analitzat amb detall són l'índex de pulsatilitat (PI), que utilitzem com a estimador de la resistència pulmonar, i la fracció de sang en moviment (FMBV) una mesura de la perfusió vascular d'un teixit.

Ambdós paràmetres es basen en l'aplicació d'un principi físic: l'efecte doppler. De manera sintètica, l'efecte doppler és el canvi aparent de la freqüència d'una ona que es produeix pel moviment relatiu d'una font emissora respecte al seu observador. Aplicat a l'ecografia, el transductor emet un feix d'ultrasons sobre el torrent sanguini; els eritròcits actuen com a principals elements reflectors dels ultrasons; la longitud d'ona dels ultrasons reflectits pels eritròcits dependrà de la velocitat del flux de sang(183).

La tècnica doppler també permet analitzar l'ona de pols d'un vas. El PI és un paràmetre característic de l'ona de pols d'un vas determinat. És una mesura de la variabilitat de la velocitat de la sang en un vas. Matemàticament, el PI és el quocient de la diferència de velocitats entre el pic sistòlic i el mínim diastòlic per la velocitat



mitjana durant el cicle cardíac. En el nostre cas, hem mesurat el PI de l'artèria pulmonar dreta en el punt en què es fa intrapulmonar. Aquesta artèria té una ona de pols característica, descrita per Laudy(184;185). De fet, la identificar l'artèria pulmonar es basa en la demostració de la seva ona de pols típica.

L'índex de pulsatilitat d'un vas es relaciona amb la resistència vascular del teixit al qual irriga. Thompson i altres, per exemple, van reproduir un model de circulació placentària(186;187). En aquest model, el PI variava quan s'obrien o es tancaven ramificacions de l'arbre placentari, és a dir, a mesura que es modificava la resistència del sistema. D'aquesta manera, es va concloure que el PI era un bon estimador de la resistència vascular que oferia el sistema. L'índex de pulsatilitat també canvia si es modifiquen les característiques de l'impuls vascular, tasca que en un mamífer desenvolupa el cor. Considerant que el cor impulsa la sang d'una manera relativament estable, atribuïm les modificacions del PI als canvis esdevinguts en les resistències vasculares

La tècnica doppler dels ecògrafs moderns també permet el càlcul del FMBV. El FMBV d'una regió determinada no és, però, un paràmetre directe (com el PI) sinó que s'ha de calcular amb un programa específic (*MATLAB software 7.5; The MathWorks, Natick, Mass., USA*).

La fracció de sang en moviment (FMBV) és un mètode quantitatiu que estima la proporció d'un teixit que conté sang en moviment, fent servir una tecnologia d'ultrasons dotada de *power Doppler*. Correspon a la patent americana 5860929 i es va desenvolupar a la Universitat de Michigan, Ann Arbor. El càlcul del FMBV s'inicia identificant una regió d'interès a partir d'una imatge ecogràfica congelada –per exemple el pulmó dret contralateral a una HD-. Paral·lelament, cal identificar un objecte, localitzat a la mateixa profunditat, que tingui un 100% de flux sanguini –posem per cas l'artèria pulmonar principal-. Amb aquest objecte com a estàndard de referència, ponderarem i mesurarem tots els nivells de *power Doppler* de l'interior de la nostra imatge inicial. La fracció de sang en moviment es calcula mitjançant la suma de tots els valors *power Doppler* de la regió que ens interessa i dividint aquesta suma pel nombre total de píxels de la regió d'interès. Si tots el píxels de la imatge oferissin un valor de *power Doppler* de 100, el FMBV seria el 100%.

En tots els nostres casos, l'estimació de la perfusió vascular s'ha fet definint com a àrea d'interès el pla ecogràfic que comprèn tot el pulmó dret a partir del seu hili; hem pres com a referència de vascularització (el 100% del valor), la pròpia artèria pulmonar dreta. A més a més, s'han fet diverses mesures en diferents fases del cicle cardíac,

extraient una mitjana del FMBV per a establir el valor definitiu de la perfusió pulmonar de cada individu.

D'aquesta explicació es dedueix que la mesura aïllada de FMBV d'un pulmó és un valor que no té massa sentit. La comparació estandarditzada de la mateixa àrea d'interès entre diferents individus, i abans i després de realitzar una OT dóna importància a la seqüència de valors que hem obtingut.

Tant el PI com el FMBV han estat utilitzats en la recerca i en la pràctica clínica. Per exemple:

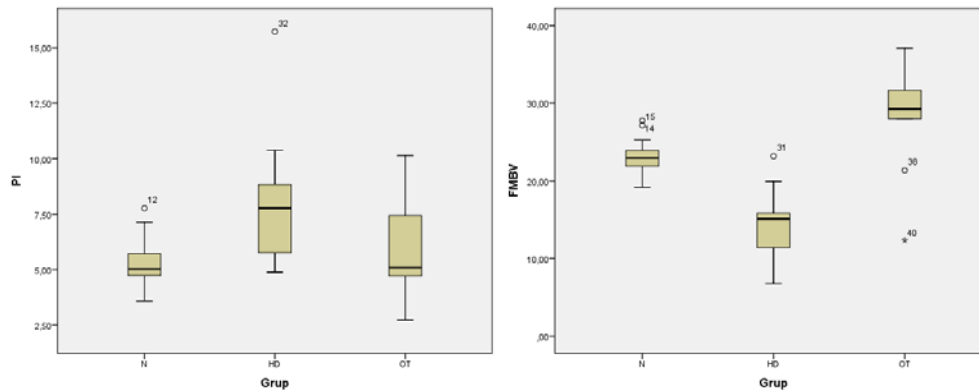
- El PI i el FMBV s'han correlacionat amb els valors d'o/e LHR (*observed to expected Lung to Head Ratio*) en fetus humans amb HD(188). Aquest treball ha demostrat que la grandària del pulmó (estimada a partir de l'o/e LHR) té relació amb les mesures hemodinàmiques: als pulmons més hipoplàstics, els valors de perfusió pulmonar són menors, alhora que les resistències pulmonars augmenten.

El grup de medicina i teràpia fetal al qual pertanyem ha publicat dos treballs en què s'observa una correlació entre els paràmetres hemodinàmics fetals i la supervivència:

- El pic de flux revers al principi de la diàstole (PEDRF o *Peak Early Diastolic Reversed Flow*) és un paràmetre de l'ona de flux de l'artèria pulmonar mesurada per doppler que es correlaciona molt bé amb la grandària pulmonar(189) i permet determinar la probabilitat de supervivència del fetus.
- Un altre estudi realitzat sobre una cohort de 41 fetus amb HD ha conclòs que el millor estimador de la supervivència postnatal dels fetus amb HD és l'o/e LHR. Tanmateix, als fetus amb un o/e LHR <26%, els paràmetres hemodinàmics permeten discriminar quins moriran amb gairebé el 100% de probabilitat (els que tenen uns valors hemodinàmics molt patològics) i quins fetus tenen una probabilitat de supervivència superior (els individus amb uns paràmetres hemodinàmics normals)(83).

Analitzem què passa amb els paràmetres hemodinàmics dels nostres fetus. La situació vascular dels pulmons dels fetus del grup HD és la més crítica: el seu PI és el més elevat mentre que la seva perfusió pulmonar (estimada pel FMBV) és la menor. També comprovem que l'oclusió traqueal ha revertit la situació vascular compromesa dels fetus amb HD i l'aproxima a la normalitat. Tot plegat ho podem observar molt millor si afegim el nostre grup N (d'individus normals) a les gràfiques que resumeixen la distribució dels valors de PI i FMBV.

**Figura 30:** Distribució del PI i el FMBV segons els grups (incloent N)



Hi ha diferències significatives entre el PI del grup HD i els altres dos grups. Tanmateix, la comparació de la distribució del PI entre els grups N i OT és homogènia, amb una  $p=0,713$ .

Quan analitzem la distribució del FMBV, hi ha diferències significatives entre tots tres grups. Com es veu a la gràfica, d'alguna manera, l'oclusió traqueal augmenta la perfusió pulmonar i arriba a compensar en excés la caiguda de perfusió que comporta l'HD.

És a dir, podem afirmar que l'oclusió traqueal d'un fetus amb HD canvia les condicions hemodinàmiques d'aquest fetus. Tot i disposar de poques dades, els resultats són prou significatius com per assegurar que els individus tractats i aquells fetus amb hèrnia diafragmàtica sense oclusió traqueal corresponen a dues poblacions amb un comportament hemodinàmic diferent. Com que s'acosta molt més a la normalitat, la situació hemodinàmica dels fetus amb hèrnia diafragmàtica i oclusió traqueal dona avantatge a aquests individus respecte als fetus amb HD no tractada.

Aquests resultats són analitzats amb detall en un article que vam publicar(158), i han estat presentat en diversos congressos internacionals.

Altres autors també han obtingut troballes similars. Sylvester(190), a partir d'un model d'HD i oclusió traqueal en ovelles, va estudiar la variació de l'índex de pulsilitat. Conclou que l'hèrnia diafragmàtica es relaciona amb la hipoplàsia pulmonar i amb una elevació del PI i que ambdues condicions són revertides per l'oclusió traqueal. A més a més, la reactivitat dels pulmons fetals a prop del terme de la gestació (estimada per la reacció a la hiperoxigenació materna) també estava afectada als fetus amb HD i adoptava un patró més fisiològic als fetus tractats amb OT (disminució de les resistències pulmonars).

Hi ha un treball molt curiós en què es realitzen mesures ecogràfiques de paràmetres hemodinàmics de forma sistemàtica a un grup de fetus d'ovella (sense hèrnia diafragmàtica) sotmesos a una oclusió traqueal(191). Els pulmons d'aquests individus augmenten de volum fins a tres cops respecte als controls. Sorprenentment, els paràmetres hemodinàmics dels fetus amb OT en comparació amb els controls es mantenen pràcticament inalterats. Això implica que, en condicions de normalitat, el creixement vascular secundari a l'OT és proporcional al creixement del teixit pulmonar. El fet que tant nosaltres com altres grups(190) haguem observat una millora en els paràmetres hemodinàmics implica que no només hi ha un creixement proporcional del pulmó i els seus vasos, sinó també una maduració addicional de l'estructura vascular. Més tard veurem com s'expressa aquesta maduració des d'un punt de vista morfològic.

El nostre model no incorpora un grup *sham* (fetus operats de la mateixa manera que els grups intervencionistes però sense que finalment se'ls arribi a fer una HD o oclusió traqueal) com a control. Els controls *sham* són superior als individus no tractats del nostre grup perquè són més iguals als grups intervencionistes. El grup *sham* anul·la el biaix que pugui haver causat la manipulació del fetus. L'efecte beneficiós de l'oclusió traqueal, però, ha estat observat en molts treballs que si que incorporen un grup *sham*(117;135;168;175). És coherent pensar que de la mateixa manera que la manipulació dels fetus no altera per si mateix els resultats observats a nivell morfològic pulmonar o vascular, tampoc no ho faci a nivell de l'hemodinàmica fetal.

Una darrera consideració és pensar que la variació dels paràmetres hemodinàmics podria respondre a altres factors, especialment l'anèmia fetal per sagnat intraoperatori. Tanmateix, hi ha dues dades indirectes que fan pensar que la variació dels valors hemodinàmics mesurats és deguda a la situació d'HD i no a la manipulació o a l'anèmia fetal:

- Després d'haver intervingut més d'un centenar de fetus de conill hem après que si la cirurgia fetal no és perfecta, el fetus mor sense remei. Sempre que un fetus ha sagnat o ha sorgit algun imprevist durant la primera intervenció, l'hem trobat mort al següent procediment. Això ens porta a creure que els fetus que han sobreviscut no tenien cap altra lesió associada, al marge de l'HD.
- El pic màxim de velocitat de flux sanguini és el paràmetre hemodinàmic més sensible per detectar anèmia, segons demostren diversos treballs en fetus, en persones adultes i en animals d'experimentació(192-195). La

distribució del pic màxim de velocitat en els tres grups d'estudi del nostre treball és homogènia, cosa que recolza la idea que l'anèmia no emmascara els resultats obtinguts en la vessant hemodinàmica.

Com a resum del que hem observat en aquesta vessant hemodinàmica, podem afirmar que:

- L'oclusió traqueal com a tractament fetal de l'HD millora la resposta hemodinàmica d'aquests individus i els aproxima a la situació de normalitat.

#### b. L'oxigenació neonatal

Els resultats objectius obtinguts en aquest apartat són els més limitats del treball. Fonamentalment, això es deu a dues dificultats que no havíem previst: la disponibilitat del pulsioxímetre neonatal i la incapacitat d'aquest instrument per mesurar alguns individus, especialment els més greus.

Per exemple: a la Taula 9 (pàgina 60), hi ha tres individus amb HD la freqüència cardíaca i/o saturació d'oxigen dels quals no fou possible mesurar. Aquests tres individus eren els que estaven pitjor de tota la seva camada: tenien molt mal color i feien esforços agònics per respirar (i per això sabem que estaven vius en néixer). Sóc del parer que el pulsioxímetre no va captar la saturació i la freqüència cardíaca d'aquests nadons conills perquè no tenia prou sensibilitat per mesurar el seu pols tan dèbil i determinar la seva probable bradicàrdia. Tots tres van morir en pocs minuts.

Cap d'aquestes consideracions no es reflecteix a les gràfiques que he aportat sobre aquests animals. Això és molt significatiu, perquè hem menyspreat de les gràfiques els tres nounats més greus de la sèrie (dels cinc amb HD sobre els que tenim dades d'oxigenació). Si poguéssim corregir les gràfiques que apareixen a la secció de Resultats i incloure les dades d'aquests tres fetus, demostrariem una correlació clínica més evident entre els nostres casos. Cal considerar, també, que es dona la circumstància que el nounat amb HD que saturava al 100% és potser l'individu de tota la sèrie amb l'hèrnia diafragmàtica macroscòpicament més petita.

Altres factors també poden influir en l'estat dels nounats, com ara l'administració d'anestèsics a la mare conilla durant el seu sacrifici. Aquestes drogues anestèsiques (o altres factors) tindrien un efecte sobre tots els nadons, no selectivament sobre els fetus amb HD. Fins i tot és lògic pensar que és en el grups dels nounats normals on

hauria de fer-se més evident la pèrdua del seu benestar com a conseqüència d'algun factor que passés de la mare al fetus. Aquesta circumstància, no l'hem constatat en cap cas.

Els nadons amb la tràquea lligada no poden respirar en néixer. Immediatament després d'extreure'ls, els seccionàvem la tràquea per intubar-los amb un catèter a través de la pròpia tràquea i els deixàvem respirar espontàniament. (La intubació orotraqueal del fetus de conill era massa lenta, feta a cegues, insegura i provocava lesions). Sembla lògic pensar que aquesta "reanimació" al primer minut de vida podria empitjorar el seu estat neonatal. Objectivament, però, aquests nadons estaven millor que els seus germans amb HD no tractada. Els nounats de la nostra sèrie que pitjor van superar la primera hora de vida foren els que tenien una HD no tractada. Els nadons amb oclusió traqueal estaven una mica millor.

Aquesta secció pot resumir-se afirmant que l'oclusió traqueal millora la situació clínica inicial a les cries de conill amb una hèrnia diafragmàtica.

### c. Descripció morfològica

#### i. Valoració de la hipoplàsia pulmonar

A la dècada dels 50, diversos autors es van fixar en la relació entre l'HD i la hipoplàsia pulmonar(9;196;197).

Areechon fou qui primer va fer un recompte del nombre de ramificacions bronquials dels pulmons dels nadons amb HD. Va trobar que el seu nombre era molt disminuït i equivalent al d'un fetus de 10 o 12 setmanes. Fins llavors, hi havia la idea general que l'HD es produïa en néixer: els òrgans abdominals ascendien al tòrax com a conseqüència de la pressió negativa que exercia el nadó en començar a respirar. Aquest treball demostrava que l'HD havia de tenir lloc molt aviat durant la gestació, almenys des de la setmana 10 o 12(10).

Quantificar les ramificacions bronquials és un procediment difícil i lent. En comptes d'aquesta mesura, el pes dels pulmons i la seva relació amb el pes del fetus (és a dir, el LBWR) i el recompte alveolar radial han estat els paràmetres clàssics per definir la hipoplàsia pulmonar.

Els pulmons amb HD són objectivament més petits que els pulmons normals. L'OT fa créixer els pulmons amb hèrnia fins a valors més propers a la normalitat. Per exemple: els pulmons esquerres (els de la banda de l'hèrnia) dels individus amb HD de la nostra sèrie pesen de mitjana un 45,6% de la mitjana dels pulmons esquerres del grup N. En un altre treball amb un model d'HD en conill, com el nostre, aquesta relació també fou del 46%(169). Aquesta dada també dona coherència al nostre model d'HD.

El pes mitjà del pulmó esquerre dels individus del grup OT ascendeix fins al 75% del pes del pulmó normal (grup N).

A la banda contralateral també hi ha una afectació del pes dels pulmons. Els pulmons drets del grup HD són el 60% dels del grup N (al treball a què tot just fèiem referència, la proporció era del 81%(169)); en els individus sotmesos a OT, el pes del pulmó dret tendeix a normalitzar-se fins a arribar al 93% del pes mitjà dels pulmons drets del grup N.

La tècnica per fer el recompte alveolar radial –RAC, *Radial Alveolar Count*- fou descrita per Emery i Mithal(161). Aquests autors ja van reconèixer aquest mètode com el més fidel per diagnosticar el grau d'hipoplàsia pulmonar. Des de la seva publicació, aquesta tècnica ha experimentat poques variacions. La nostra determinació del RAC s'ha fet de forma pràcticament igual a l'original. Hem pres, com a mínim, deu determinacions de RAC per cada individu. Aquest nombre és el que es va proposar en la descripció original per tal de minimitzar el biaix que suposa mesurar una estructura tridimensional en un sol pla. A la pràctica clínica, si es determina el RAC en una necròpsia cal prendre deu mesures com a estàndard de qualitat. Alguns autors han assenyalat la conveniència d'obtenir fins a 40 mesures per cada pulmó (humà) per tal de millorar la reproductibilitat del mètode(198). En molts dels nostres casos, però, les 10 o 12 mesures de RAC que obteníem esgotaven tots els bronquíols respiratoris a partir dels quals podíem fer aquesta determinació.

Per tal d'evitar discrepàncies entre observadors, les mesures de RAC foren preses, majoritàriament, per parelles d'observadors. Així, ja s'establia un doble control al moment de recollir cadascuna de les dades. Posteriorment, i per tal de validar els nostres resultats, vam obtenir fotografies de (gairebé) tots els recomptes d'alvèols (això suposa més de 300 imatges). Les fotografies van ser validades per un patòleg expert.

Per últim, s'ha vist que preparar els pulmons per a l'estudi histològic tot inflant-los a través de la via aèria a una pressió controlada millora els resultats obtinguts en la determinació del RAC(198;199). Nosaltres no ho hem fet. Els pulmons amb una hipoplàsia greu no modifiquen els seus paràmetres morfomètrics quan es fixen sota

pressió a les vies aèries. En canvi els pulmons sans, quan s'expandeixen sota pressió, si que poden experimentar una variació a les mesures de RAC si no s'han fixat correctament(169). Aquest problema és màxim quan s'analitzen pulmons de fetus que mai no han respirat. Els fetus amb els pulmons més normals (els dels grups OT i N) són precisament aquells que es trobaven més inflats i que més havien respirat. D'aquesta manera l'efecte d'aquest possible error queda minimitzat.

L'any 1979 es va proposar una definició d'hipoplàsia pulmonar en humans basada en els valors de LBWR i RAC que encara ara és acceptada(200). Es considera que hi ha una hipoplàsia pulmonar quan el valor del LBWR és inferior al 67% del valor mitjà acceptat com a normal ( $<0,012$  en humans). Pel que fa al RAC, un valor inferior al 75% de la normalitat ( $<4,1$  en l'humà) també defineix hipoplàsia pulmonar.

Òbviament, no hi ha paràmetres de normalitat en conills per definir la hipoplàsia pulmonar. Si traslладem al conill els criteris de l'humà, conclouríem que, a la nostra mostra, un LBWR inferior a 1,57 (el 67% de 2,35, la mitjana del LBWR del grup N) és el límit per definir hipoplàsia pulmonar. D'acord amb aquesta definició, només el grup HD té hipoplàsia pulmonar, amb un valor mitjà de LBWR d'1,27 (un 53,86% del grup N). El grup OT té una mitjana de LBWR d'1,97 (un 83,32% del grup N). L'oclusió traqueal, d'acord amb aquesta definició, reverteix la hipoplàsia pulmonar que causa l'hèrnia diafragmàtica. Altres investigadors que han treballat amb un model similar al nostre han obtingut unes dades de LBWR comparables a les nostres. En aquests treballs, l'OT també millora aquest paràmetre(117;167;175)

Pel que fa al RAC, que com hem dit és un estimador més acurat d'hipoplàsia pulmonar, el límit inferior de la normalitat se situaria en 3,55 (el 75% del valor de la mitjana del RAC del grup N: 4,74). D'aquesta manera, només el grup HD (amb una mitjana del RAC de 2,98, és a dir, el 63% del RAC del grup N) compleix els criteris d'hipoplàsia pulmonar. El grup OT té un valor del 84% del RAC del grup N (3,99 de mitjana). Novament, observem que l'oclusió traqueal reverteix la hipoplàsia pulmonar de l'hèrnia diafragmàtica.

El propòsit d'aquest criteri no és fer una valoració de grup, sinó aplicar-lo a un individu concret i determinar si té o no hipoplàsia pulmonar. Quan analitzem així els subjectes de la nostra mostra (donant més valor al RAC en cas de discrepància), el criteri es demostra molt vàlid. Té un valor predictiu positiu i negatiu del 100% perquè tots els fetus del grup HD tenen hipoplàsia pulmonar, mentre que cap fetus amb OT en té. Val a dir, però, que la correspondència no és perfecta, ja que tres fetus del grup N



(individus suposadament normals) també presentarien hipoplàsia pulmonar si s'apliqués el mateix principi.

En resum, morfològicament podem afirmar que l'OT reverteix la hipoplàsia pulmonar que condiciona l'HD i acostava aquests individus cap a la normalitat.

## ii. Valoració de les mesures arterials

Al llarg d'aquesta tesi hem comentat diverses vegades que els principals problemes dels nadons amb una HD eren la hipoplàsia pulmonar i la hipertensió pulmonar. Ambdues circumstàncies solen anar de la mà. Tot i això,

la nostra experiència clínica pràctica ens demostra que és la hipertensió pulmonar greu i refractària al tractament la que sol provocar la mort als pacients més crítics.

Tanmateix, s'han dedicat molts més estudis a la valoració morfològica dels pulmons i del seu grau d'hipoplàsia que els que s'han focalitzat en l'aspecte vascular.

Sabem que els pulmons dels individus afectes d'HD tenen menys artèries per unitat de volum pulmonar(64;201). Aquestes artèries es muscularitzen en excés durant la gestació i presenten un engruiximent de l'adventícia i de la túnica mitja(201;202). La muscularització de les arterioles s'estén fins a un nivell molt perifèric i arriba a les arterioles que es troben dins el propi acini pulmonar(201;203;204). Precisament són aquestes darreres arterioles les principals responsables de la resistència pulmonar al flux sanguini(87;205).

En humans, els vasos intraacinars tenen un diàmetre comprès entre els 50 i els 200  $\mu\text{m}$ ; aquestes mesures disminueixen fins als 30-40  $\mu\text{m}$  en animals més petits, com el conill(202;206).

Tots aquests canvis s'han documentat tant en humans com als diferents models animals experimentals.

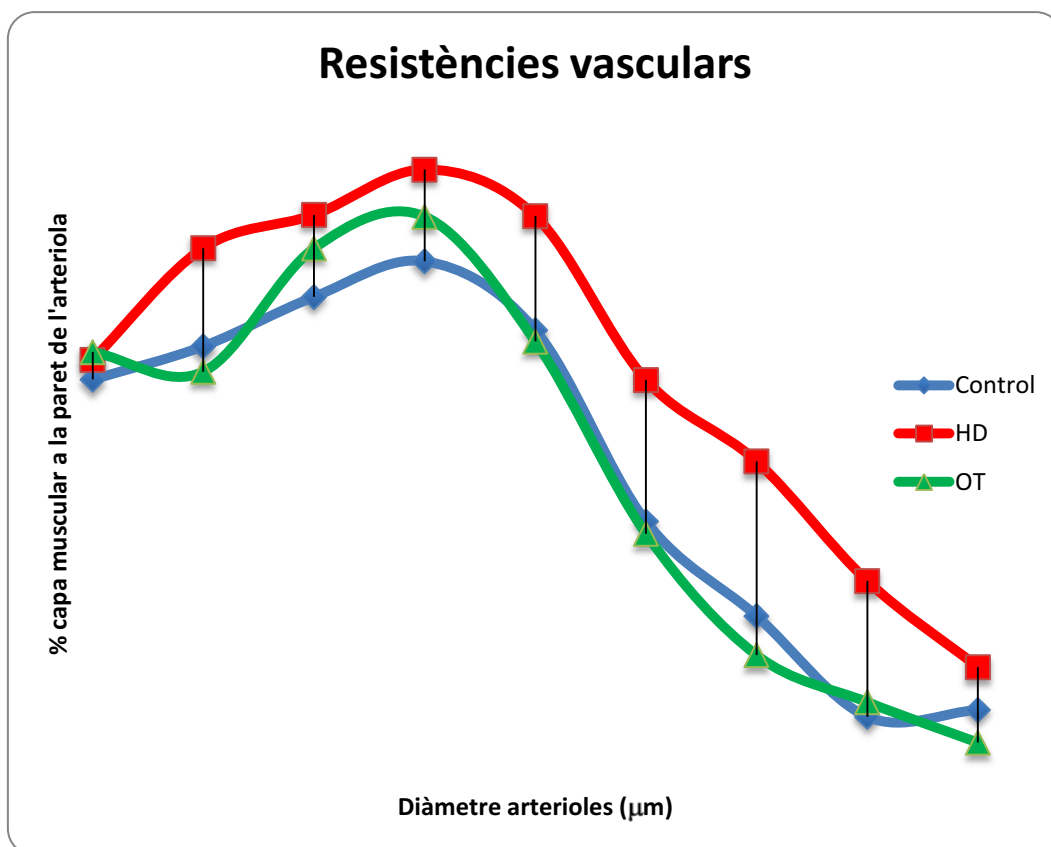
Durant la vida intrauterina els pulmons no tenen la funció que més tard desenvoluparan. Per això, el flux de sang pulmonar es redueix al mínim. I les resistències pulmonars són, de forma fisiològica, molt elevades. Cap al final de la gestació el fetus es prepara per a la vida extrauterina. Les arterioles intraacinars augmenten en nombre, alhora que també augmenta la seva capacitat de distensió. Quan un nadó neix, el flux de sang als seus pulmons s'incrementa fins a deu cops(207).

Els nadons amb una HD també es preparen, a la seva manera, per a la vida extrauterina. Un excel·lent treball de Roubliova (en què es confecciona un model d'HD en conills igual que el nostre i on els fetus són sacrificats en diferents dates al final de la gestació) demostra que l'adaptació al naixement de les artèries dels fetus amb HD també succeeix(168). Per exemple, el gruix de la capa muscular decreix cap al final de la gestació.

Tot seguit reproduïm la gràfica que relaciona el diàmetre vascular amb el gruix de la capa muscular afegint el grup N per fer-la més representativa. Hi ha diversos aspectes d'aquesta gràfica que vull destacar:

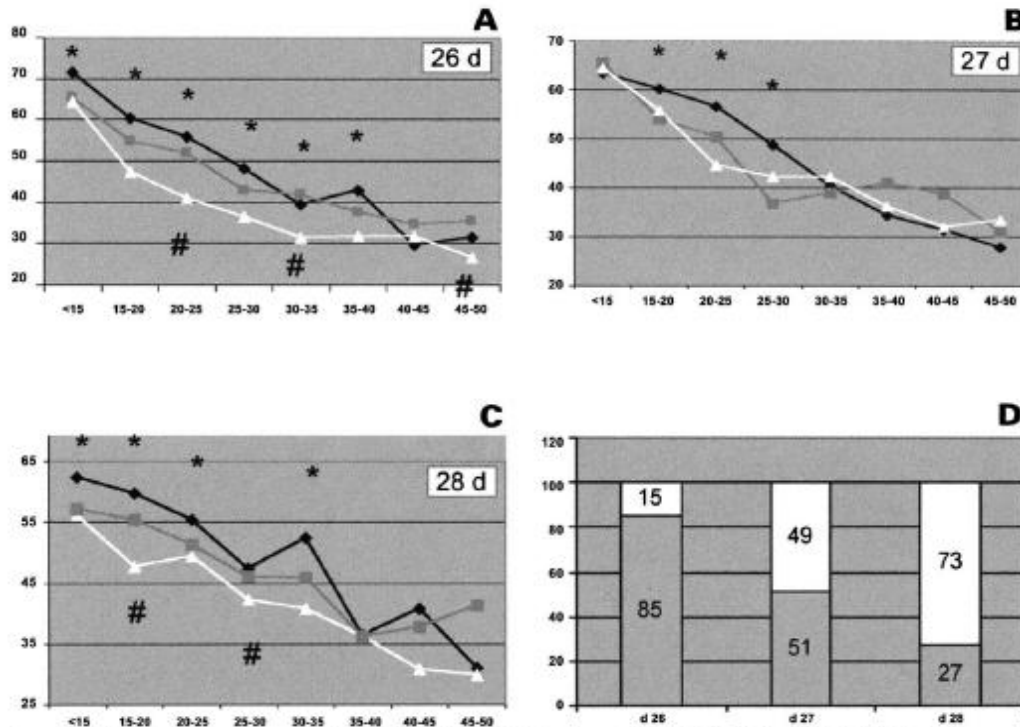
- L'oclusió traqueal tardana reverteix l'engruiximent de la capa muscular fins a valors similars als normals.
- El pic de màxima resistència vascular (entès com el d'aquells vasos amb una paret muscular més gruixuda) se situa entre 15 i 30  $\mu\text{m}$ . Aquest diàmetre vascular coincideix amb el dels vasos intraacinaris.
- La confecció de les corbes corresponents a cada grup (HD, OT i N) està feta per separat. El fet que les tres corbes presentin un dibuix força similar (al marge de petites variacions i que la corba del grup HD es trobi desplaçada sobre l'eix d'ordenades) dóna consistència al nostre treball. En cadascuna de les corbes s'han considerat totes les mesures arterials realitzades: 434 mesures vàlides del grup d'individus amb HD; 483 dels d'OT i 811 artèries mesurades al grup N. Aquest nombre tan elevat de determinacions –1728- és el que dóna coherència interna, credibilitat i validesa a la gràfica.

**Figura 31:** Distribució de l'AMT segons el diàmetre arteriolar (incloent N)



En tota la literatura que he revisat, només un altre treball aporta una gràfica com aquesta, també en un model de conill(117):

**Figura 32:** Gràfiques del treball de Roubliova et al(117)



**Figure 2** Graphic display of proportionate medial thickness (%MT) of normal, CDH + SHAM and CDH + TO fetuses in vessels less than 60 μm, categorized by 5 μm, up to 45 μm, at given GAs. **A**, 26; **B**, 27; and **C**, 28 days. Significant differences between CDH + SHAM and CTR (\*) and CDH + TO and CTR (#) are marked. **D**, Bar chart of proportion of muscularized vessels less than 30 μm at each time point for TO, corrected for values obtained in controls, where values in normal fetuses are 0% and in CDH + SHAM fetuses are 100%.

El treball al qual pertanyen aquestes gràfiques és excel·lent. Se centra en la morfologia dels petits vasos pulmonars en un model d'HD i d'oclusió traqueal en conills. El disseny del treball, la metodologia i l'anàlisi són molt bons. En aquest aspecte, crec que superior al nostre treball.

Per exemple, les artèries es tenyeixen dos cops: primer amb un reactiu específic per a marcar les fibres elàstiques (Elastica von Gieson) i després, per immunofluorescència, amb un anticòs contra el múscul llis. D'aquesta manera la identificació de les artèries és segura i, per sobre de tot, és possible valorar les artèries no muscularitzades. Nosaltres només hem fet una tinció d'hematoxilina-eosina. Hem identificat el múscul llis a gran augment (x40) gràcies a la seva característica distribució al voltant d'un vas amb endoteli. Òbviament, només hem mesurat les artèries muscularitzades. Per tant, no disposem d'informació sobre les arterioles no muscularitzades que hi ha a l'acini pulmonar.

En aquest interessantíssim treball hi ha un grup control. L'hèrnia diafragmàtica es confecciona, com la nostra, el dia 23 de gestació. També es valora l'efecte del moment en què es fa l'oclusió traqueal. Per això hi ha un grup de fetus en què l'oclusió té lloc el dia 26, un altre el 27 i un darrer (com el nostre cas) el dia 28. Tots els fetus són recollits el dia 30, al igual que els nostres. Per tant, en aquest treball el grup d'HD aïllada és igual al nostre grup HD, i el grup d'oclusió traqueal 28 també és igual al nostre grup OT.

Quan comparem les gràfiques que s'aporten en aquest treball amb les nostres (fixant-nos en els grups HD i OT28) observem que a partir d'un gruix de 20  $\mu\text{m}$  són molt similars, fins i tot en el gruix de la capa muscular. L'efecte de l'OT és el mateix que observem nosaltres: un aprimament de les arterioles.

D'altra banda, hi ha algunes diferències que cal comentar:

- En tots els nostres grups, el pic de màxim gruix de la paret arterial es dona a l'interval comprès entre els 20 i els 25  $\mu\text{m}$ . A les gràfiques de Roubliova, el gruix de la paret arterial sempre és descendent, i és màxim en el mínim diàmetre arteriolar.
- Als resultats, Roubliova explica que no han observat que l'OT faci cap efecte important en vasos per sobre de 30  $\mu\text{m}$ . Com es desprèn de la nostra gràfica, nosaltres hem de dir que l'efecte de l'OT és constatable en vasos de qualsevol calibre.

Val la pena dir que tots els seus grups tenen un mínim de sis individus per grup, però qualsevol dels nostres tres grups (HD, OT i N) té més individus que els seus. Les nostres gràfiques, doncs, estan basades en una mostra més gran d'individus. No he trobat cap altre treball a la literatura que aporti gràfiques similars.

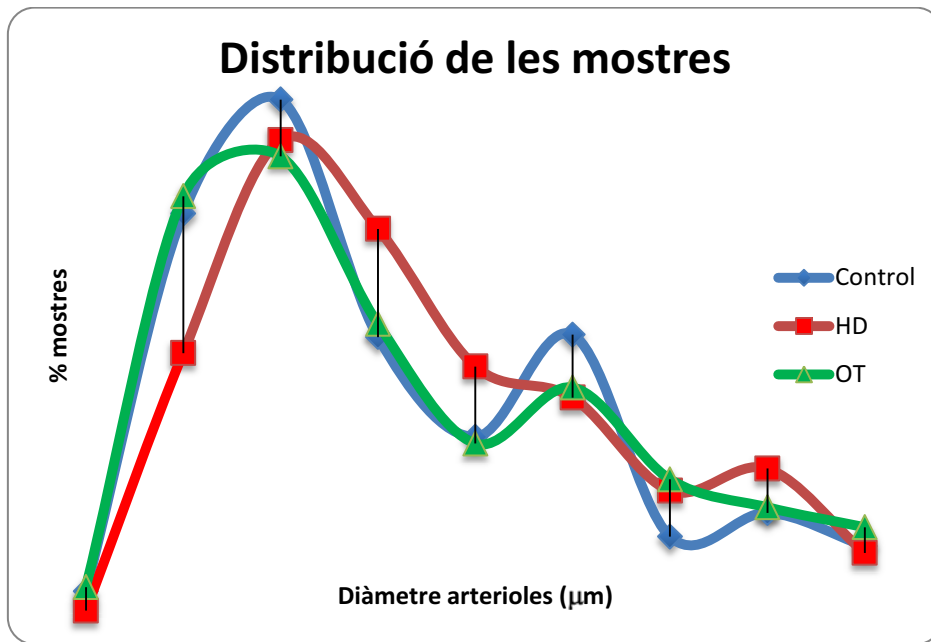
Una darrera informació que aporta el treball de Roubliova, i que nosaltres no podem mesurar, és la proporció d'arterioles muscularitzades de l'acini pulmonar respecte les que no ho són. La gràfica D del seu treball és molt representativa, en aquest cas. L'escala és relativa i el valor 0% correspon a la proporció d'arterioles muscularitzades del grup control, mentre que el 100% correspon al del grup amb HD. El que ofereix la gràfica, doncs, és el descens relatiu d'arteries muscularitzades atribuïble a l'OT. El més interessant és que l'efecte és màxim quan l'OT es produeix de forma tardana, al final de la gestació. El nombre d'arterioles no muscularitzades presents a l'acini pulmonar després d'una OT feta el dia 28 és el 73% de les d'un individu normal, mentre que només és del 15% quan l'OT té lloc el dia 26.

Totes les nostres mesures arterials han estat preses per dos observadors, tot sovint, treballant plegats. L'entrenament i el criteri de selecció dels vasos és el mateix. Bàsicament, i ja que les 50 mesures arterials sovint esgotaven totes les artèries d'aquell pulmó, fèiem un rastreig sistemàtic de tot un tall pulmonar (que incloïa, almenys, dos lòbuls) i comptàvem camp per camp totes les artèries que trobàvem fins a arribar a 50 o fins que s'acabés el pulmó. Només comptabilitzàvem aquells vasos que consideràvem (pel seu aspecte) que eren sens dubte arterials. D'aquesta manera, per exemple, quan havíem recorregut tot el lòbul superior no hi quedava cap artèria per mesurar. Fins que el primer lòbul no estava esgotat no passàvem a l'altre lòbul pulmonar. El tros de pulmó que quedava en arribar a 50 artèries, no estava comptabilitzat. En tots els casos les 50 mesures arterials es van prendre seguides, sense deixar el microscopi ni interrompre la tasca fins al final.

Aquesta manera sistemàtica de procedir minimitza el risc de diversos tipus d'error:

- El que es produeix perquè hi ha mesures fetes per diversos observadors. En treballar plegats la major part del temps, hi ha un doble control de les mesures arterials alhora que s'homogeneïtza el criteri per quan les adquisicions dels valors es facin individualment.
- Evita que una mateixa artèria sigui comptabilitzada diverses vegades.
- Es minimitza el risc que les artèries mesurades no fossin representatives d'aquell pulmó. Això podria haver passat si no haguéssim seguit una tècnica sistemàtica d'escombratge i només haguéssim seleccionat les arterioles més fàcils, o les més grosses... La gràfica següent, per exemple, representa com es distribueixen les mostres obtingudes en cadascun dels grups. És evident que la proporció d'arterioles de cada interval de diàmetre és molt similar en cada grup (i molt similar, segurament, a la distribució de les arterioles que té lloc dins els pulmons). Aquesta gràfica, per si sola, valida la tècnica que hem seguit per mesurar les artèries.

**Figura 33:** Distribució de les mostres segons el diàmetre arteriolar



La distribució de les artèries dels grups OT i N és molt similar, quasi paral·lela. En canvi al grup HD podríem observar la tendència a la substitució de les arterioles més petites per d'altres un diàmetre superior. Més que un defecte tècnic, això tradueix l'efecte de l'HD sobre el gruix de les artèries.

A nivell vascular podem concloure que:

- L'oclusió traqueal tardana reverteix l'engruiximent de la capa muscular fins a valors similars als normals. Aquest efecte s'observa en artèries de totes les grandàries.
- Els petits vasos intraacinar són els que ofereixen una major resistència al flux de sang.

#### d. L'estudi immunohistoquímic

Treballar amb un model de conill comporta sacrificar la possibilitat d'obtenir bons resultats en aquesta vessant de l'estudi. La justificació d'aquesta afirmació es deu a la manca d'anticossos comercials aplicables al nostre model.

Tant la immunohistoquímica com el Western blot són tècniques que es basen en l'aplicació de dos anticossos. El primer anticòs és específic contra la proteïna o factor que volem determinar. La majoria dels anticossos específics comercialitzats són obtinguts a partir de conills. El segon anticòs sol anar dirigit contra la part comuna de les immunoglobulines. A la pràctica, el segon anticòs, potenciat i ampliat per la biotina, es converteix en un anticòs contra les proteïnes d'una determinada espècie, normalment el conill. Per això, el segon anticòs sol anomenar-se anti-conill o anti-ratolí... És aquest segon anticòs el que està marcat i podem visualitzar i/o quantificar.

Aquí és on rau el nostre problema. Si haguéssim treballat amb ratolins, hauríem fet servir qualsevol anticòs comercial específic contra la proteïna que volem (en ratolins el catàleg és summament extens, i solen estar obtinguts a partir de conills) i hauríem fet servir un segon anticòs, anti-conill, per detectar el primer.

Si intentem fer servir els anticossos que hauríem fet servir amb un model de rata o ratolí (habitualment produïts en conill), ens trobarem que, en una segona fase, tota la nostra preparació quedarà marcada positivament. Això és així perquè totes les cèl·lules del nostre model de conill expressen l'epítot inespecífic del conill contra el qual es dirigeix el segon anticòs.

El problema dels models de conill és, precisament, que el catàleg d'anticossos disponibles és molt limitat. Fins i tot hi ha anticossos específics "vàlids" segons el catàleg que, tot i no especificar cap contraindicació per ser utilitzats contra el conill, no funcionen a la pràctica. Aquest ha estat el cas del VEGF.

Per això, i un cop ja acabada la fase experimental, hem hagut de modificar, sobre la marxa, el nostre disseny inicial.

- **EI VEGF.** Per fer aquesta immunohistoquímica vam fer servir un anticòs sobre el qual teníem dubtes de la seva utilitat en conill. Disposàvem de restes d'anti-VEGF que s'havien fet servir per altres estudis (en humans). A les instruccions d'aquest anticòs no hi constava cap contraindicació explícita contra proteïnes de conill, i vam creure que valia la pena provar-lo. Les tincions de prova van demostrar una positivitat generalitzada arreu,



cosa que demostrava que el nostre reactiu era inespecífic i no utilitzable en el conill.

- **El TGF- $\beta$ 3.** Aquest és l'únic factor dels que volíem estudiar que disposa d'un anticòs vàlid per al conill. Com ja hem comentat, la tinció fou erràtica i inespecífica. Tots tres grups eren molt similars. Per això vam optar per realitzar un Western blot, ja que aquesta tècnica ofería la possibilitat de mesurar quantitativament d'una manera més senzilla si hi havia diferències entre els grups o no. (L'alternativa era tan feixuga com recomptar manualment centenars de cèl·lules de les mostres de cada grup, estudiar la seva positivitats i analitzar les diferències).

La comparació de la intensitat del senyal dins de les mostres de cada gel és fàcil i exacte. El problema és com comparem les mostres provinents dels diferents gels. Habitualment es fa córrer una proteïna coneguda i mesurada que serveixi d'estàndard comú, però no vam prendre aquesta precaució en el nostre cas.

També hem comès un altre defecte tècnic a l'hora d'analitzar els resultats del Western blot. Juntament amb TGF- $\beta$ 3 es va fer córrer una altra proteïna, la tubulina, amb una concentració i quantitats conegudes. El senyal de tubulina en cada pou ha de ser el mateix, i si no ho és cal corregir-lo perquè indica que potser s'ha ficat en algun dels pous una quantitat major de la nostra mostra. La nostra anàlisi no ha estat corregida amb els valors de la tubulina ja que es van perdre algunes de les fotografies adquirides i el programa per poder obtenir les imatges que finalment es van mesurar.

És per això que ens hem limitat a fer una anàlisi global dels resultats amb les fotos de què disposem i una comparació entre els diferents grups d'estudi (individus sans, HD i OT) basada entre les mostres provinents del mateix gel. Igualment, tampoc oferim cap anàlisi estadística en aquest apartat. Som conscients, doncs, que els resultats en aquesta vessant són orientatius.

Malgrat tot, tant la immunohistoquímica com el Western blot suggereixen que TGF- $\beta$ 3 no varia la seva expressió després de la realització d'una OT. Per tant, TGF- $\beta$ 3 no és un factor regulador clau en la maduració pulmonar estimulada per l'OT.

Per últim, les instruccions del fabricant de l'anticòs anti TGF- $\beta$ 3 indiquen que probablement pot tenir reacció creuada amb altres proteïnes de la mateixa família (com el TGF- $\beta$ 2 o TGF- $\beta$ 1). Si això és així, implicaria que el

TGF- $\beta$ 2 tampoc és un mediador clau en la resposta a l'oclusió traqueal en el nostre model d'HD al fetus de conill. Aquesta conclusió ja ha estat observada per altres investigadors que, en un model murí d'HD amb nitrofè, tampoc han trobat que la família dels TGF tingui un paper important en el desenvolupament pulmonar secundari a l'oclusió traqueal(208;209). Tanmateix, en el model d'HD en ovelles, TGF- $\beta$ 2 (però no TGF- $\beta$ 1) sí que augmenta la seva expressió després de l'oclusió traqueal(124).

Podem concloure, doncs, que:

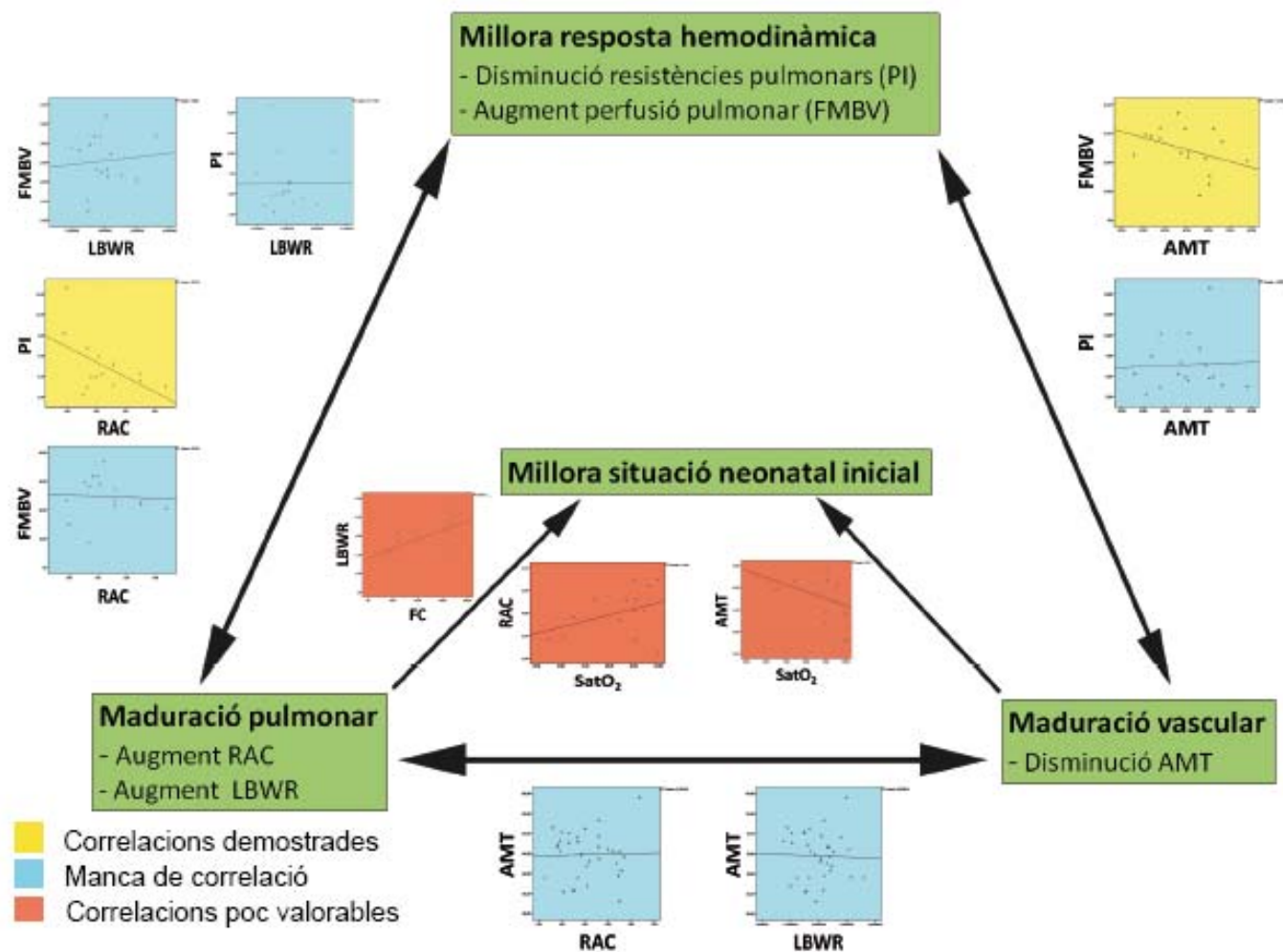
- Desconeixem quin és el paper del VEGF al nostre model i si aquest factor és clau en la resposta a l'OT.
- L'OT reverteix la hipoplàsia pulmonar i la situació funcional vascular dels individus amb HD. Cap d'aquests efectes no estaria mediat pel TGF- $\beta$ 3.

e. Relació dels diferents apartats entre si

En començar la discussió hem analitzat el model d'HD i hem valorat la situació dels individus amb HD respecte als individus sans. També hem comentat el que succeïa als fetus amb hèrnia diafragmàtica sotmesos a oclusió traqueal en el nostre model:

- hi ha una maduració pulmonar (que hem demostrat per la milloria dels paràmetres que mesuren la hipoplàsia pulmonar, com el RAC o el LBWR),
- la maduració pulmonar s'acompanya d'una maduració vascular, estimada per la reducció del gruix de la capa muscular de les arterioles dels pulmons fetals;
- a més a més, també hi ha una millora significativa de la resposta vascular, estimada pels paràmetres hemodinàmics fetals PI i FMBV.
- Com a conseqüència lògica d'aquesta nova situació desencadenada per l'OT, els fetus tractats estan en millors condicions per fer front a la transició cap a la vida extrauterina (tal i com hem estimat per les mesures de saturació, freqüència cardíaca i l'observació subjectiva de la seva vitalitat).

La pàgina següent ofereix un resum dels efectes que desencadena l'oclusió traqueal i com es relacionen entre ells.



**Figura 34:** Resum dels principals efectes que desencadena l'oclusió traqueal al nostre model i de les relacions que entre ells s'estableixen

L'esquema anterior diferencia entre correlacions demostrades (encara que no assoleixin el grau de significació estadística), manca de correlació, i correlacions poc valorables, que són aquelles que inclouen algun dels paràmetres de benestar fetal

Les correlacions amb paràmetres de benestar fetal (saturació O<sub>2</sub> o freqüència cardíaca) estan elaborades a partir de poques dades. Les considerarem indicatives de tendència, però no podem extreure'n conclusions fermes. A més a més, la situació neonatal és un concepte complex en què hi influeixen molts paràmetres, com ara el grau d'hipoplàsia pulmonar, la morfologia vascular, la reactivitat i sensibilitat vascular o l'hemodinàmia fetal. Per tant, no podem saber en quina mesura cadascun d'aquest paràmetres contribueix al benestar del nou-nat. Mes enllà d'un genèric "els individus amb millors paràmetres prenatals són els que millor superen la primera hora de vida" poca cosa més podem dir. Potser podem incloure l'afegitó que "en tant que l'OT millora la situació prenatal dels individus, probablement també fa que estiguin en millors condicions quan neixin", encara que no podem quantificar aquesta afirmació.

Les correlacions demostrades són correlacions lògiques que estan d'acord amb el que un s'esperaria trobar. El fet que gairebé cap correlació no adquireixi el grau de significació estadística no és rar, considerant la mida de la mostra. Ras i curt, hi ha relació entre:

- Paràmetres d'hipoplàsia pulmonar (com el RAC) i mesures hemodinàmiques (PI): els pulmons més hipoplàsics són també els que tenen una resistència més elevada.
- Les mesures arterials (el gruix de la capa muscular) i mesures hemodinàmiques (FMBV): observem que els pulmons amb les artèries més engruixides (que habitualment són individus amb una HD) són els menys perfosos.

Si l'oclusió traqueal desencadena una resposta a tres nivells (maduració pulmonar, maduració vascular i resposta hemodinàmica) i hi ha una resposta significativa en cadascun d'ells, les correlacions que acabem de comentar no ens haurien d'estranyar.

Tanmateix, el que crida més l'atenció de la gràfica anterior és la manca de correlació entre els diversos aspectes analitzats. És a dir, de forma predominant, al nostre model hi ha una absència de correlació entre les tres respostes a l'OT (maduració pulmonar, hemodinàmica i de desenvolupament vascular).

He de reconèixer que aquest resultat em va sorprendre. A priori, m'hauria esperat trobar una relació clara entre els diferents aspectes. Tant és així que vaig repetir totes les mesures i anàlisi i vaig buscar totes les maneres que se'm van ocórrer per poder trobar un resultat que s'ajustés més a allò que jo esperava. Però les dades són les que són. Amb el temps, he comprès que aquest és, potser, el resultat més interessant d'aquest treball.

Per què l'oclusió traqueal desencadena una resposta positiva en cadascuna d'aquestes vessants? La resposta no pot ser, simplement, una qüestió mecànica. Ja hem vist que els pulmons han madurat, que estan millors preparats per a la vida. Això, necessàriament, ha de passar perquè l'oclusió traqueal actua com a gatell o desencadenant d'un canvi en l'expressió dels factors de creixement que modulen la maduració pulmonar i vascular. Imaginem ara dos supòsits diferents:

- a) Un únic factor de creixement o una via de transmissió de senyals és el responsable de modular la triple resposta observada: maduració pulmonar, maduració vascular i resposta hemodinàmica. L'OT estimularia aquesta via i, de manera proporcional a la seva estimulació, observariem una resposta progressiva en cadascuna de les 3 vessants esmentades. Si això fos així, em semblaria lògic trobar una clara correlació entre tots els esdeveniments que hem estudiat.
- b) L'oclusió traqueal estimula cadascuna de les respostes per mitja de diferents factors o vies metabòliques. En aquest cas, sembla lògic pensar que en alguns individus la maduració pulmonar, per exemple, pugui haver assolit una estimulació superior a, posem per cas, la resposta hemodinàmica o la maduració vascular. Assumint aquesta idea la manca de correlació entre els diferents aspectes analitzats és lògica perquè l'OT no hauria d'estimular, de manera proporcional, cadascuna de les diferents vies. Veient el conjunt de correlacions "planes", presents entre tots els grups de variables entre si, cal deduir que aquest supòsit amb més d'un factor de creixement claus és l'explicació del nostre problema.

Per tant, l'anàlisi dels resultats em porta a suggerir una **hipòtesi de manca de relació** entre els efectes desencadenats per l'OT. D'acord amb aquesta hipòtesi la resposta a nivell de maduració pulmonar, vascular (i fins i tot hemodinàmica) depèn del grau en què l'OT estimula les vies metabòliques que portaran a desenvolupar cadascun

d'aquest efectes. Tanmateix, el grau de resposta observat en cadascun dels paràmetres no ens pot fer preveure què passarà, necessàriament, amb els altres.

Aquesta hipòtesi recolzaria les observacions clíniques pràctiques de la nostra experiència en el tractament amb oclusió traqueal de fetus humans amb HD. Tots els grups que tractem pacients amb HD i oclusió traqueal prèvia hem observat alguna vegada que, sense saber per què, alguns pacients aparentment no responen al tractament. Certament els seus pulmons s'han inflat, han crescut, però els paràmetres hemodinàmics segueixen tan dolents com abans de l'OT. Habitualment, aquests pacients presenten una hipertensió pulmonar molt greu. Davant d'un pacient concret, *a priori*, no sabem predir quina serà la seva resposta al tractament fetal. Tinc la impressió que, també en éssers humans, em trobo davant del mateix fenomen: la manca de relació directa entre paràmetres hemodinàmics i morfològics, entre maduració pulmonar i vascular.

Aquesta hipòtesi em sembla el resultat més significatiu que aporta aquesta tesi. Això em porta, però, a comentar el resultat més decebedor del treball: l'estudi histoquímic. La dificultat principal ens la dóna el model escollit, com hem comentat. Això ens ha impedit poder analitzar el factor de creixement en el qual teníem més esperances: el VEGF. La resposta a l'OT no es modula a través de l'expressió de TGF- $\beta$ 3.

Tanco aquesta tesi, doncs, amb nous interrogants i projectes: identificar els diferents factors de creixement implicats en la resposta a l'OT i demostrar la certesa d'aquesta hipòtesi d'independència. Per fer això, podem treballar amb models més senzills, com el teratològic amb nitrofè i ratolins, que, si bé no ens permetran mesurar la resposta hemodinàmica, ens donaran accés a tot un gran catàleg de factors de creixement per poder analitzar.

Resumint, de l'anàlisi integrada de totes les vessants del nostre experiment dedueixo que:

- L'OT desencadena una resposta sobre els individus amb HD per la qual maduren tant a nivell pulmonar com vascular.
- La maduració en ambdós aspectes (pulmonar i vascular) estaria desencadenada per factors diferents i seria força independent l'una de l'altra.

## VII. CONCLUSIONS

1. En els fetus amb HD tractada amb OT milloren les característiques del flux vascular pulmonar (disminueixen les resistències i augmenta la perfusió pulmonar); els espais aeris pulmonars maduren; paral·lelament, també s'observa una maduració vascular pulmonar. Per tot plegat, els nous nats amb HD sotmesos a OT neixen amb avantatge respecte els que no s'han tractat.
2. L'OT és el gatell que desencadena tots aquests efectes. Hi ha una correlació pobre entre ells, ja que les respostes no són proporcionals entre si. És més, en bona part, es produeixen de forma independent les unes de les altres. El mecanisme subjacent que permet explicar la manca de correlacions ha de ser l'estimulació de vies metabòliques reguladores independents per a la maduració vascular pulmonar, la maduració de les vies respiratòries i potser la resposta hemodinàmica dels vasos pulmonars.



## VIII. BIBLIOGRAFIA

- (1) Muratore CS, Wilson JM. Congenital diaphragmatic hernia: where are we and where do we go from here? *Semin Perinatol* 2000 Dec;24(6):418-28.
- (2) Irish MS, Holm BA, Glick PL. Congenital diaphragmatic hernia. A historical review. *Clin Perinatol* 1996 Dec;23(4):625-53.
- (3) Puri P, Wester T. Historical aspects of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 1997 Mar 21;12(2/3):95-100.
- (4) Golombek SG. The history of congenital diaphragmatic hernia from 1850s to the present. *J Perinatol* 2002 Apr;22(3):242-6.
- (5) Holt LE, Howland J. *The Diseases of Infancy and Childhood*. 8th edition. Appleton and Large: New York 1923;85(13):116-7.
- (6) Ladd WE, Gross RE. Congenital diaphragmatic hernia. *N Eng J Med* 1940;223:917-25.
- (7) Gross RE. Congenital hernia of the diaphragm. *AmJ Dis Child* 1946;71:579-92.
- (8) Gross RE. *The Surgery of Infancy and Childhood*. Philadelphia, Saunders 1953;428-44.
- (9) Campanale RP, Rowland RH. Hypoplasia of the lung associated with congenital diaphragmatic hernia. *Ann Surg* 1955 Aug;142(2):176-89.
- (10) Areechon W, Reid L. Hypoplasia of lung with congenital diaphragmatic hernia. *Br Med J* 1963 Jan 26;1(5325):230-3.
- (11) Rowe MI, Uribe FL. Diaphragmatic hernia in the newborn infant: blood gas and pH considerations. *Surgery* 1971 Nov;70(5):758-61.
- (12) 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(3):161-72.

- (13) Rudolph AM, Yuan S. Response of the pulmonary vasculature to hypoxia and H<sup>+</sup> ion concentration changes. *J Clin Invest* 1966 Mar;45(3):399-411.
- (14) Drummond WH, Gregory GA, Heymann MA, Phibbs RA. The independent effects of hyperventilation, tolazoline, and dopamine on infants with persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr* 1981 Apr;98(4):603-11.
- (15) Vacanti JP, Crone RK, Murphy JD, Smith SD, Black PR, Reid L, et al. The pulmonary hemodynamic response to perioperative anesthesia in the treatment of high-risk infants with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1984 Dec;19(6):672-9.
- (16) Wung JT, James LS, Kilchevsky E, James E. Management of infants with severe respiratory failure and persistence of the fetal circulation, without hyperventilation. *Pediatrics* 1985 Oct;76(4):488-94.
- (17) Wung JT, Sahni R, Moffitt ST, Lipsitz E, Stolar CJ. Congenital diaphragmatic hernia: survival treated with very delayed surgery, spontaneous respiration, and no chest tube. *J Pediatr Surg* 1995 Mar;30(3):406-9.
- (18) 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 Oct;28(10):1411-7.
- (19) 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 Nov;32(11):1637-42.
- (20) Harrison MR, Bjordal RI, Langmark F, Knutrud O. Congenital diaphragmatic hernia: the hidden mortality. *J Pediatr Surg* 1978 Jun;13(3):227-30.
- (21) Wright JC, Budd JL, Field DJ, Draper ES. Epidemiology and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a 9-year experience. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011 Mar;25(2):144-9.
- (22) Skari H, Bjornland K, Haugen G, Egeland T, Emblem R. Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg* 2000 Aug;35(8):1187-97.

- (23) Dott MM, Wong LC, Rasmussen SA. Population-based study of congenital diaphragmatic hernia: Risk factors and survival in metropolitan Atlanta, 1968-1999. *BirthDefects Res A Clin Mol Teratol* 2003 Apr 14;67(4):261-7.
- (24) Stege G, Fenton A, Jaffray B. Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 2003 Sep;112(3 Pt 1):532-5.
- (25) Colvin J, Bower C, Dickinson JE, Sokol J. Outcomes of congenital diaphragmatic hernia: a population-based study in Western Australia. *Pediatrics* 2005 Sep;116(3):e356-e363.
- (26) Pober BR. Overview of epidemiology, genetics, birth defects, and chromosome abnormalities associated with CDH. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007 May 15;145C(2):158-71.
- (27) Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embryol (Berl)* 1984;169(2):133-9.
- (28) Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, Lloyd DA, Losty PD. Early lung malformations in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2000 Jan;35(1):124-7.
- (29) 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 Apr;156(4):1299-306.
- (30) Mayer S, Metzger R, Kluth D. The embryology of the diaphragm. *Semin Pediatr Surg* 2011 Aug;20(3):161-9.
- (31) Dussaut J, Godlewski G, Pignodel C. [Pathogenesis of congenital diaphragmatic hernia of the newborn infant: apropos of 2 cases]. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 1981 Mar;65(188):77-81.
- (32) Allan DW, Greer JJ. Development of phrenic motoneuron morphology in the fetal rat. *J Comp Neurol* 1997 Jun 16;382(4):469-79.
- (33) Allan DW, Greer JJ. Pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in fetal rats. *J Appl Physiol* 1997 Aug;83(2):338-47.

- (34) Kluth D, Kangah R, Reich P, Tenbrinck R, Tibboel D, Lambrecht W. Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: an animal model. *J Pediatr Surg* 1990 Aug;25(8):850-4.
- (35) Babiuk RP, Zhang W, Clugston R, Allan DW, Greer JJ. Embryological origins and development of the rat diaphragm. *J Comp Neurol* 2003 Jan 20;455(4):477-87.
- (36) Ackerman KG, Herron BJ, Vargas SO, Huang H, Tevosian SG, Kochilas L, et al. *Fog2* is required for normal diaphragm and lung development in mice and humans. *PLoS Genet* 2005 Jul;1(1):58-65.
- (37) Guilbert TW, Gebb SA, Shannon JM. Lung hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia occurs early in development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 Dec;279(6):L1159-L1171.
- (38) You LR, Takamoto N, Yu CT, Tanaka T, Kodama T, Demayo FJ, et al. Mouse lacking COUP-TFII as an animal model of Bochdalek-type congenital diaphragmatic hernia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Nov 8;102(45):16351-6.
- (39) Pober BR. Genetic aspects of human congenital diaphragmatic hernia. *Clin Genet* 2008 Jul;74(1):1-15.
- (40) Beurskens N, Klaassens M, Rottier R, de KA, Tibboel D. Linking animal models to human congenital diaphragmatic hernia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007 Aug;79(8):565-72.
- (41) Holder AM, Klaassens M, Tibboel D, de KA, Lee B, Scott DA. Genetic factors in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Hum Genet* 2007 May;80(5):825-45.
- (42) Kantarci S, Donahoe PK. Congenital diaphragmatic hernia (CDH) etiology as revealed by pathway genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007 May 15;145C(2):217-26.
- (43) 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 May 15;145C(2):184-200.

- (44) Keijzer R, Puri P. Congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2010 Aug;19(3):180-5.
- (45) de Buys Roessingh AS, Dinh-Xuan AT. Congenital diaphragmatic hernia: current status and review of the literature. *Eur J Pediatr* 2009 Apr;168(4):393-406.
- (46) Mohseni-Bod H, Bohn D. Pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2007 May;16(2):126-33.
- (47) Bucher U, Reid L. Development of the intrasegmental bronchial tree: The pattern of branching and development of cartilage at various stages of intra-uterine life. *Thorax* 1961 Sep;16:207-18.
- (48) Hall SM, Hislop AA, Pierce CM, Haworth SG. Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: Formation and smooth muscle maturation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000 Aug;23(2):194-203.
- (49) O'Neill JJr, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG, Caldamone AA. *Principles of Pediatric Surgery*. Mosby; 2 edition 2003 Oct 31;458.
- (50) Logan JW, Rice HE, Goldberg RN, Cotten CM. Congenital diaphragmatic hernia: a systematic review and summary of best-evidence practice strategies. *J Perinatol* 2007 Sep;27(9):535-49.
- (51) Kotecha S, Barbato A, Bush A, Claus F, Davenport M, Delacourt C, et al. Congenital diaphragmatic hernia. *Eur Respir J* 2012 Apr;39(4):820-9.
- (52) Carlson BM. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 2ª edición Madrid: Harcourt 2000.
- (53) Moore KL, Persaud T. *Embriología clínica*. 7ª edición Madrid: Elsevier 2004.
- (54) Larsen WJ. *Human embryology* 3rd ed. Larsen, William J, (William James) this edition specially edited by Lawrence S. Searman, S. Steven Potter, William J. Scott. New York: Churchill Livingstone, c 2001.
- (55) Ackerman KG, Greer JJ. Development of the diaphragm and genetic mouse models of diaphragmatic defects. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 2007 May 15;145C(2):109-16.

- (56) Glasser S, Anastassiadis K, Stewart AF. Current issues in mouse genome engineering. *Nat Genet* 2005 Nov;37(11):1187-93.
- (57) Birchmeier C, Brohmann H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr Opin Cell Biol* 2000 Dec;12(6):725-30.
- (58) Clugston RD, Greer JJ. Diaphragm development and congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2007 May;16(2):94-100.
- (59) Vasyutina E, Birchmeier C. The development of migrating muscle precursor cells. *Anat Embryol (Berl)* 2006 Dec;211 Suppl 1:37-41.
- (60) Gratacós E, Gómez R, Nicolaides K, Romero R, Cabero L. *Medicina fetal*; 1ª edición. Buenos Aires. Madrid: Médica Panamericana 2007.
- (61) Martin RJ, Fanaroff A, Walsh MC. *Fanaroff and Martin's neonatal-perinatal medicine: diseases of the fetus and infant*. 9th edition. Editorial ELSEVIER Mosby 2011.
- (62) Thibeault DW, Haney B. Lung volume, pulmonary vasculature, and factors affecting survival in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 1998 Feb;101(2):289-95.
- (63) Chapin CJ, Ertsey R, Yoshizawa J, Hara A, Sbragia L, Greer JJ, et al. Congenital diaphragmatic hernia, tracheal occlusion, thyroid transcription factor-1, and fetal pulmonary epithelial maturation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005 Jul;289(1):L44-L52.
- (64) 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 May;58(5):342-6.
- (65) Deprest JA, Flake AW, Gratacos E, Ville Y, Hecher K, Nicolaides K, et al. The making of fetal surgery. *Prenat Diagn* 2010 Jul;30(7):653-67.
- (66) Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 1972 Oct;50(4):515-25.
- (67) LILEY AW. ITRAUTERINE TRANSFUSION OF FOETUS IN HAEMOLYTIC DISEASE. *Br Med J* 1963 Nov 2;2(5365):1107-9.

- (68) Adamsons KJr. Fetal surgery. *N Eng J Med* 1966 Jul 28;275(4):204-6.
- (69) Rodeck CH, Nicolaides KH, Warsof SL, Fysh WJ, Gamsu HR, Kemp JR. The management of severe rhesus isoimmunization by fetoscopic intravascular transfusions. *Am J Obstet Gynecol* 1984 Nov 15;150(6):769-74.
- (70) Harrison MR, Filly RA, Golbus MS, Berkowitz RL, Callen PW, Canty TG, et al. Fetal treatment 1982. *N Eng J Med* 1982 Dec 23;307(26):1651-2.
- (71) Flake AW, Harrison MR. Fetal surgery. *Annu Rev Med* 1995;46:67-78.
- (72) Rosenkrantz JG, Simon RC, Carlise JH. Fetal surgery in the pig with a review of other mammalian fetal techniques. *J Pediatr Surg* 1968 Jun;3(3):392-7.
- (73) LOUW JH, BARNARD CN. Congenital intestinal atresia; observation on its origin. *Lancet* 1955 Nov 19;269(6899):1065-7.
- (74) Suzuki K, Plentl AA. Chronic implantation of instruments in the neck of the primate fetus for physiologic studies and production of hydramnios. *Am J Obstet Gynecol* 1969 Jan 15;103(2):272-81.
- (75) van der Wildt B, Luks FI, Steegers EA, Deprest JA, Peers KH. Absence of electrical uterine activity after endoscopic access for fetal surgery in the rhesus monkey. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995 Feb;58(2):213-4.
- (76) 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 Dec;16(6):934-42.
- (77) Harrison MR, Golbus MS, Filly RA. Management of the fetus with a correctable congenital defect. *JAMA* 1981 Aug 14;246(7):774-7.
- (78) Clewell WH, Johnson ML, Meier PR, Newkirk JB, Zide SL, Hendee RW, et al. A surgical approach to the treatment of fetal hydrocephalus. *N Eng J Med* 1982 Jun 3;306(22):1320-5.
- (79) Jani JC, Nicolaides KH, Gratacos E, Vandecruys H, Deprest JA. Fetal lung-to-head ratio in the prediction of survival in severe left-sided diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion (FETO). *Am J Obstet Gynecol* 2006 Dec;195(6):1646-50.

- (80) Jani J, Nicolaidis KH, Keller RL, Benachi A, Peralta CF, Favre R, et al. Observed to expected lung area to head circumference ratio in the prediction of survival in fetuses with isolated diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007 Jul;30(1):67-71.
- (81) Cruz-Martinez R, Hernandez-Andrade E, Moreno-Alvarez O, Done E, Deprest J, Gratacos E. Prognostic value of pulmonary Doppler to predict response to tracheal occlusion in fetuses with congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther* 2011;29(1):18-24.
- (82) Cruz-Martinez R, Moreno-Alvarez O, Hernandez-Andrade E, Castanon M, Martinez 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(1):101-7.
- (83) Cruz-Martinez R, Moreno-Alvarez O, Hernandez-Andrade E, Castanon 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 May;35(5):572-7.
- (84) ANDERSEN DH. Effect of diet during pregnancy upon the incidence of congenital hereditary diaphragmatic hernia in the rat; failure to produce cystic fibrosis of the pancreas by maternal vitamin A deficiency. *Am J Pathol* 1949 Jan;25(1):163-85.
- (85) ANDERSEN DH. Incidence of congenital diaphragmatic hernia in the young of rats bred on a diet deficient in vitamin A. Atlantic City, NJ: Society for Pediatric Research 1941.
- (86) Warkany MD, Roth CB, Wilson JG. Multiple congenital malformations: A consideration of etiologic factors. *J Pediatrics* 1948;1:462-71.
- (87) Adzick NS, Outwater KM, Harrison MR, Davies P, Glick PL, deLorimier 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 Dec;20(6):673-80.



- (88) Beurskens LW, Tibboel D, Steegers-Theunissen RP. Role of nutrition, lifestyle factors, and genes in the pathogenesis of congenital diaphragmatic hernia: human and animal studies. *Nutr Rev* 2009 Dec;67(12):719-30.
- (89) Montedonico S, Nakazawa N, Puri P. Congenital diaphragmatic hernia and retinoids: searching for an etiology. *Pediatr Surg Int* 2008 Jul;24(7):755-61.
- (90) 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 May 15;145C(2):139-57.
- (91) Harkness JE, Ridgway MD. Chromodacryorrhea in laboratory rats (*Rattus norvegicus*): etiologic considerations. *Lab Anim Sci* 1980 Oct;30(5):841-4.
- (92) Thebaud B, Tibboel D, Rambaud C, Mercier JC, Bourbon JR, Dinh-Xuan AT, et al. Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Physiol* 1999 Aug;277(2 Pt 1):L423-L429.
- (93) Greer JJ, Allan DW, Babiuk RP, Lemke RP. Recent advances in understanding the pathogenesis of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 2000 May;29(5):394-9.
- (94) Haller JAJr, Signer RD, Golladay ES, Inon AE, Harrington DP, Shermeta DW. Pulmonary and ductal hemodynamics in studies of simulated diaphragmatic hernia of fetal and newborn lambs. *J Pediatr Surg* 1976 Oct;11(5):675-80.
- (95) Harrison MR, Jester JA, Ross NA. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero. I. The model: intrathoracic balloon produces fatal pulmonary hypoplasia. *Surgery* 1980 Jul;88(1):174-82.
- (96) 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 Aug;88(2):260-8.
- (97) Harrison MR, Langer JC, Adzick NS, Golbus MS, Filly RA, Anderson RL, et al. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero, V. Initial clinical experience. *J Pediatr Surg* 1990 Jan;25(1):47-55.

- (98) Esteve C, Toubas F, Gaudiche O, Leveque C, Bargy F, Rouquet Y, et al. [Evaluation of 5 years of experimental in utero surgery for the repair of diaphragmatic hernia]. *Ann Fr Anesth Reanim* 1992;11(2):193-200.
- (99) Albanese CT, Lopoo J, Goldstein RB, Filly RA, Feldstein VA, Calen PW, et al. Fetal liver position and perinatal outcome for congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn* 1998 Nov;18(11):1138-42.
- (100) CARMEL JA, FRIEDMAN F, ADAMS FH. FETAL TRACHEAL LIGATION AND LUNG DEVELOPMENT. *Am J Dis Child* 1965 May;109:452-6.
- (101) DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Peters CA, Fackler JC, Wilson JM. Experimental fetal tracheal ligation reverses the structural and physiological effects of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1994 Feb;29(2):248-56.
- (102) Khan PA, Cloutier M, Piedboeuf B. Tracheal occlusion: a review of obstructing fetal lungs to make them grow and mature. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007 May 15;145C(2):125-38.
- (103) Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, Villa RL, Finkbeiner W. Experimental pulmonary hypoplasia and oligohydramnios: relative contributions of lung fluid and fetal breathing movements. *J Pediatr Surg* 1984 Dec;19(6):658-65.
- (104) Moessinger AC, Harding R, Adamson JR, Singh M, Kiu GT. Role of lung fluid volume in growth and maturation of the fetal sheep lung. *J Clin Invest* 1990 Oct;86(4):1270-7.
- (105) Fewell JE, Lee CC, Kitterman JA. Effects of phrenic nerve section on the respiratory system of fetal lambs. *J Appl Physiol* 1981 Aug;51(2):293-7.
- (106) Olver RE, Walters DV, M Wilson S. Developmental regulation of lung liquid transport. *Annu Rev Physiol* 2004;66:77-101.
- (107) Harding R, Hooper SB. Regulation of lung expansion and lung growth before birth. *J Appl Physiol* 1996 Jul;81(1):209-24.
- (108) Alcorn D, Adamson TM, Lambert TF, Maloney JE, Ritchie BC, Robinson PM. Morphological effects of chronic tracheal ligation and drainage in the fetal lamb lung. *J Anat* 1977 Jul;123(Pt 3):649-60.

- (109) Wilson JM, DiFiore JW, Peters CA. Experimental fetal tracheal ligation prevents the pulmonary hypoplasia associated with fetal nephrectomy: possible application for congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1993 Nov;28(11):1433-9.
- (110) 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 May;29(5):612-7.
- (111) Harrison MR, Adzick NS, Flake AW, VanderWall KJ, Bealer JF, Howell LJ, et al. Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero VIII: Response of the hypoplastic lung to tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 1996 Oct;31(10):1339-48.
- (112) Nardo L, Hooper SB, Harding R. Lung hypoplasia can be reversed by short-term obstruction of the trachea in fetal sheep. *Pediatr Res* 1995 Nov;38(5):690-6.
- (113) Hedrick MH, Ferro MM, Filly RA, Flake AW, Harrison MR, Adzick NS. Congenital high airway obstruction syndrome (CHAOS): A potential for perinatal intervention. *J Pediatr Surg* 1994 Feb;29(2):271-4.
- (114) Benachi A, Chailley-Heu B, Delezoide AL, Dommergues M, Brunelle F, Dumez Y, et al. Lung growth and maturation after tracheal occlusion in diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 Mar;157(3 Pt 1):921-7.
- (115) Kitano Y, Davies P, von AD, Adzick NS, Flake AW. Fetal tracheal occlusion in the rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Appl Physiol* 1999 Aug;87(2):769-75.
- (116) Kanai M, Kitano Y, von AD, Davies P, Adzick NS, Flake AW. Fetal tracheal occlusion in the rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia: tracheal occlusion reverses the arterial structural abnormality. *J Pediatr Surg* 2001 Jun;36(6):839-45.
- (117) 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 Sep;191(3):830-6.

- (118) Joyce BJ, Wallace MJ, Pierce RA, Harding R, Hooper SB. Sustained changes in lung expansion alter tropoelastin mRNA levels and elastin content in fetal sheep lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 Apr;284(4):L643-9.
- (119) Probyn ME, Wallace MJ, Hooper SB. Effect of increased lung expansion on lung growth and development near midgestation in fetal sheep. *Pediatr Res* 2000 Jun;47(6):806-12.
- (120) Keramidaris E, Hooper SB, Harding R. Effect of gestational age on the increase in fetal lung growth following tracheal obstruction. *Exp Lung Res* 1996 Jun;22(3):283-98.
- (121) Papadakis KA, Luks FI, De Paepe ME, Piasecki GJ, Wesselhoeft CWJr. Fetal lung growth after tracheal ligation is not solely a pressure phenomenon. *J Pediatr Surg* 1997 Feb;32(2):347-51.
- (122) Nobuhara KK, DiFiore JW, Ibla JC, Siddiqui AM, Ferreretti ML, Fauza DO, et al. Insulin-like growth factor-I gene expression in three models of accelerated lung growth. *J Pediatr Surg* 1998 Jul;33(7):1057-60.
- (123) Hooper SB, Han VK, Harding R. Changes in lung expansion alter pulmonary DNA synthesis and IGF-II gene expression in fetal sheep. *Am J Physiol* 1993 Oct;265(4 Pt 1):L403-9.
- (124) Quinn TM, Sylvester KG, Kitano Y, Liechty KW, Jarrett BP, Adzick NS, et al. TGF-beta2 is increased after fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 1999 May;34(5):701-4.
- (125) Gillett AM, Wallace MJ, Gillespie MT, Hooper SB. Increased expansion of the lung stimulates calmodulin 2 expression in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002 Mar;282(3):L440-7.
- (126) Piedboeuf B, Laberge JM, Ghitulescu G, Gamache M, Petrov P, Belanger S, et al. Deleterious effect of tracheal obstruction on type II pneumocytes in fetal sheep. *Pediatr Res* 1997 Apr;41(4 Pt 1):473-9.
- (127) Flecknoe S, Harding R, Maritz G, Hooper SB. Increased lung expansion alters the proportions of type I and type II alveolar epithelial cells in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000 Jun;278(6):L1180-5.

- (128) Bin Saddiq W., Piedboeuf B, Laberge JM, Gamache M, Petrov P, Hashim E, et al. The effects of tracheal occlusion and release on type II pneumocytes in fetal lambs. *J Pediatr Surg* 1997 Jun;32(6):834-8.
- (129) Kay S, Laberge JM, Flageole H, Richardson S, Belanger S, Piedboeuf B. Use of antenatal steroids to counteract the negative effects of tracheal occlusion in the fetal lamb model. *Pediatr Res* 2001 Oct;50(4):495-501.
- (130) DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Wilson JM. Experimental fetal tracheal ligation and congenital diaphragmatic hernia: a pulmonary vascular morphometric analysis. *J Pediatr Surg* 1995 Jul;30(7):917-23.
- (131) 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 May;36(5):739-44.
- (132) Biard JM, Schwarz U, Davey MG, Danzer E, Johnson MP, Flake AW, et al. Main bronchus occlusion for treatment of congenital diaphragmatic hernia in fetal lambs. *J Pediatr Surg* 2008 Apr;43(4):620-6.
- (133) De Paepe ME, Sardesai MP, Johnson MP, Leisieur-Brooks AM, Papadakis K, Luks FI. The role of apoptosis in normal and accelerated lung development in fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 1999 May;34(5):863-70.
- (134) De Paepe ME, Johnson BD, Papadakis K, Luks FI. Lung growth response after tracheal occlusion in fetal rabbits is gestational age-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 Jul;21(1):65-76.
- (135) Wu J, Ge X, Verbeken EK, Gratacos E, Yesildaglar N, Deprest JA. Pulmonary effects of in utero tracheal occlusion are dependent on gestational age in a rabbit model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2002 Jan;37(1):11-7.
- (136) Maltais F, Seaborn T, Guay S, Piedboeuf B. In vivo tracheal occlusion in fetal mice induces rapid lung development without affecting surfactant protein C expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 Apr;284(4):L622-32.
- (137) Seaborn T, Khan PA, Cloutier M, Maltais F, Piedboeuf B. Short-term response to tracheal occlusion during perinatal lung development in mice. *Exp Lung Res* 2007 Oct;33(8-9):441-57.

- (138) Luks FI, Wild YK, Piasecki GJ, De Paepe ME. Short-term tracheal occlusion corrects pulmonary vascular anomalies in the fetal lamb with diaphragmatic hernia. *Surgery* 2000 Aug;128(2):266-72.
- (139) Muratore CS, Nguyen HT, Ziegler MM, Wilson JM. Stretch-induced upregulation of VEGF gene expression in murine pulmonary culture: a role for angiogenesis in lung development. *J Pediatr Surg* 2000 Jun;35(6):906-12.
- (140) Harrison MR, Evans MI, Adzick NS, Holzgreve W. *The Unborn Patient: The Art and Science of Fetal Therapy*. 3rd edition. W B Saunders 2001.
- (141) Benachi A, Dommergues M, Delezoide AL, Bourbon J, Dumez Y, Brunnelle F. Tracheal obstruction in experimental diaphragmatic hernia: an endoscopic approach in the fetal lamb. *Prenat Diagn* 1997 Jul;17(7):629-34.
- (142) Flageole H, Evrard VA, Vandenberghe K, Lerut TE, Deprest JA. Tracheoscopic endotracheal occlusion in the ovine model: technique and pulmonary effects. *J Pediatr Surg* 1997 Sep;32(9):1328-31.
- (143) Evrard VA, Verbeken EA, Vandenberghe K, Lerut T, Flageole H, Deprest JA. Endoscopic In Utero Tracheal Plugging in the Fetal Lamb to Treat Congenital Diaphragmatic Hernia. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1996 Aug;3(4, Supplement):S11.
- (144) Flake AW, Crombleholme TM, Johnson MP, Howell LJ, Adzick NS. Treatment of severe congenital diaphragmatic hernia by fetal tracheal occlusion: clinical experience with fifteen cases. *Am J Obstet Gynecol* 2000 Nov;183(5):1059-66.
- (145) Abraham RJ, Sau A, Maxwell D. A review of the EXIT (Ex utero Intrapartum Treatment) procedure. *J Obstet Gynaecol* 2010 Jan;30(1):1-5.
- (146) VanderWall KJ, Bruch SW, Meuli M, Kohl T, Szabo Z, Adzick NS, et al. Fetal endoscopic ('Fetendo') tracheal clip. *J Pediatr Surg* 1996 Aug;31(8):1101-3.
- (147) VanderWall KJ, Skarsgard ED, Filly RA, Eckert J, Harrison MR. Fetendo-clip: a fetal endoscopic tracheal clip procedure in a human fetus. *J Pediatr Surg* 1997 Jul;32(7):970-2.

- (148) Harrison MR, Mychaliska GB, Albanese CT, Jennings RW, Farrell 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 Jul;33(7):1017-22.
- (149) Harrison MR, Albanese CT, Hawgood SB, Farmer DL, Farrell JA, Sandberg PL, et al. Fetoscopic temporary tracheal occlusion by means of detachable balloon for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Sep;185(3):730-3.
- (150) Deprest JA, Nicolaidis K, Gratacos E. Fetal surgery for congenital diaphragmatic hernia is back from never gone. *Fetal Diagn Ther* 2011;29(1):6-17.
- (151) Deprest J, De CP. Antenatal management of isolated congenital diaphragmatic hernia today and tomorrow: ongoing collaborative research and development. *J Pediatr Surg* 2012 Feb;47(2):282-90.
- (152) 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 Nov 13;349(20):1916-24.
- (153) Dekoninck P, Gratacos E, Van MT, Richter J, Lewi P, Ancel AM, et al. Results of fetal endoscopic tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia and the set up of the randomized controlled TOTAL trial. *Early Hum Dev* 2011 Sep;87(9):619-24.
- (154) Deprest J, De CP. Antenatal management of isolated congenital diaphragmatic hernia today and tomorrow: ongoing collaborative research and development. *J Pediatr Surg* 2012 Feb;47(2):282-90.
- (155) Deprest JA, Gratacós E, Benachi A, Ville Y. TOTAL trial. [http://www totaltrial eu](http://www.totaltrial.eu) 2012.
- (156) 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 Jan;39(1):20-7.

- (157) Grushka JR, Al-Abbad S, Baird R, Puligandla P, Kaplan F, Laberge JM. The effect of in vitro tracheal occlusion on branching morphogenesis in fetal lung explants from the rat nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2010 May;45(5):943-7.
- (158) Cruz-Martinez R, Moreno-Alvarez O, Prat J, Krauel L, Tarrado X, Castanon 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(3):137-42.
- (159) Albert A. Efectos del líquido amniótico y la constricción de las asas en la gastrosquisis. Tesis doctoral. Dirigida por: Luís Morales Fochs. Universitat de Barcelona 1994.
- (160) Harrison MR, Villa RL. Trans-amniotic fetal feeding. I. Development of an animal model: continuous amniotic infusion in rabbits. *J Pediatr Surg* 1982 Aug;17(4):376-80.
- (161) 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 Dec;35:544-7.
- (162) Wilcox DT, Irish MS, Holm BA, Glick PL. Animal models in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 1996 Dec;23(4):813-22.
- (163) Pringle KC. Human fetal lung development and related animal models. *Clin Obstet Gynecol* 1986 Sep;29(3):502-13.
- (164) Burri PH. Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung. Edited by J. A. McDonald. In *Lung Growth and Development* 1997;1-35.
- (165) Kikkawa Y, Kaibara M, Motoyama EK, Orzalesi MM, Cook CD. Morphologic development of fetal rabbit lung and its acceleration with cortisol. *Am J Pathol* 1971 Aug;64(2):423-42.
- (166) Ohi R, Suzuki H, Kato T, Kasai M. Development of the lung in fetal rabbits with experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1976 Dec;11(6):955-9.



- (167) Wu J, Yamamoto H, Gratacos E, Ge X, Verbeken E, Sueishi K, et al. Lung development following diaphragmatic hernia in the fetal rabbit. *Hum Reprod* 2000 Dec;15(12):2483-8.
- (168) Roubliova X, 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 Jul;39(7):1066-72.
- (169) 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 Sep;25(9):1105-16.
- (170) Fauza DO, Tannuri U, Ayoub AA, Capelozzi VL, Saldiva PH, Maksoud JG. Surgically produced congenital diaphragmatic hernia in fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 1994 Jul;29(7):882-6.
- (171) Julià M. Cicatrización de las heridas en el feto: estudio experimental. Tesis doctoral. Dirigida por: Luís Morales Fochs. Universitat de Barcelona 1991.
- (172) Margarit J. Efecto de la orina del líquido amniótico sobre el intestino de los fetos con gastrosquisis: estudio experimental. Tesis doctoral. Dirigida por: Luís Morales Fochs. Universitat de Barcelona 1998.
- (173) Sancho MA. Efecto del ambiente fetal en la cicatrización de las heridas. Tesis Doctoral. Dirigida por: Luís Morales Fochs. Universitat de Barcelona 1993.
- (174) 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 Jul;29(7):674-81.
- (175) Jani JC, Flemmer AW, Bergmann F, Gallot D, Roubliova X, Muensterer OJ, et al. The effect of fetal tracheal occlusion on lung tissue mechanics and tissue composition. *Pediatr Pulmonol* 2009 Feb;44(2):112-21.
- (176) Gallot D, Coste K, Jani J, Roubliova X, Marceau G, Velemir L, et al. Effects of maternal retinoic acid administration in a congenital diaphragmatic hernia rabbit model. *Pediatr Pulmonol* 2008 Jun;43(6):594-603.

- (177) Flemmer AW, Jani JC, Bergmann F, Muensterer OJ, Gallot D, Hajek K, et al. Lung tissue mechanics predict lung hypoplasia in a rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol* 2007 Jun;42(6):505-12.
- (178) Coste K, Gallot D, Marceau G, Jani J, Deprest J, Labbe A, et al. Expression of retinoid receptors during rabbit lung development. *Animal* 2007 Mar;1(3):403-9.
- (179) Mayer S, Klaritsch P, Sbragia L, Toelen J, Till H, Deprest JA. Maternal administration of betamethasone inhibits proliferation induced by fetal tracheal occlusion in the nitrofen rat model for congenital diaphragmatic hernia: a placebo-controlled study. *Pediatr Surg Int* 2008 Dec;24(12):1287-95.
- (180) Baird R, Khan N, Flageole H, Anselmo M, Puligandla P, Laberge JM. The effect of tracheal occlusion on lung branching in the rat nitrofen CDH model. *J Surg Res* 2008 Aug;148(2):224-9.
- (181) Mesas-Burgos C, Eklof AC, Linderholm B, Robertson B, Frenckner B. Lung morphology after late fetal tracheal ligation in rats. *Eur J Pediatr Surg* 2006 Jun;16(3):160-5.
- (182) Kitano Y, Kanai M, Davies P, von AD, Yang EY, Radu A, et al. BAPS prize-1999: Lung growth induced by prenatal tracheal occlusion and its modifying factors: a study in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2001 Feb;36(2):251-9.
- (183) García-Fernández MA, Zamorano J, García-Robles JA. *Manual de Ecocardiografía*. Editorial: Edimed. Madrid 2005.
- (184) Laudy JA, de Ridder MA, Wladimiroff JW. Doppler velocimetry in branch pulmonary arteries of normal human fetuses during the second half of gestation. *Pediatr Res* 1997 Jun;41(6):897-901.
- (185) Laudy JA. Doppler ultrasonography of the human fetal pulmonary circulation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001 Nov;99(1):3-5.
- (186) Thompson RS, Stevens RJ. Mathematical model for interpretation of Doppler velocity waveform indices. *Med Biol Eng Comput* 1989 May;27(3):269-76.

- (187) 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(5):449-58.
- (188) 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 May;35(5):578-82.
- (189) Moreno-Alvarez O, Hernandez-Andrade E, Oros D, Jani J, Deprest J, Gratacós 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 Feb;31(2):164-70.
- (190) 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 Jul;33(7):1071-4.
- (191) Tchirikov M, Hecher K, Deprest J, Verbeken E, Roubliova X, Schröder HJ. Pulmonary circulation of fetal sheep with lung hyperplasia following tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005 Mar;25(3):277-81.
- (192) Champion T, Pereira Neto GB, Camacho AA. Effects of acute normovolemic anemia on hemodynamic parameters and Acid-base balance in dogs. *Vet Med Int* 2011 Apr 10;2011:829054.
- (193) Amoozgar H, Farhani N, Karimi M. Early echocardiographic findings in  $\alpha$ -thalassemia intermedia patients using standard and tissue Doppler methods. *Pediatr Cardiol* 2011 Feb;32(2):154-9.
- (194) Pathak B, Quintero R, Kontopoulos E, Assaf S, Miller D, Chmait RH. Postoperative middle cerebral artery peak systolic velocity changes confirm physiological principles of the sequential laser technique for twin-twin transfusion syndrome. . 2010;28(3):140-4. *Fetal Diagn Ther* 2010;28(3):140-4.

- (195) Senat MV, Loizeau S, Courdec S, Bernard JP, Ville Y. The value of middle cerebral artery peak systolic velocity in the diagnosis of fetal anemia after intrauterine death of one monochorionic twin. *Am J Obstet Gynecol* 2003 Nov;189(5):1320-4.
- (196) Rakower J, Milwidsky H, Wayl P. Hypoplasia of the lung in congenital diaphragmatic hernia. *J Thorac Surg*. 1956 May;31(5):527-34. *J Thorac Surg* 1956 May;31(5):527-34.
- (197) Roe BB, Stephens HB. Congenital diaphragmatic hernia and hypoplastic lung; a clinical evaluation. *J Thorac Surg*. 1956 Sep;32(3):279-90. *J Thorac Surg* 1956 Sep;32(3):279-90.
- (198) Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 1--postnatal lung growth. *Thorax* 1982 Aug;37(8):572-9.
- (199) Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2--intrauterine and early postnatal lung growth. *Thorax* 1982 Aug;37(8):580-3.
- (200) Askenazi SS, Perlman M. Pulmonary hypoplasia: lung weight and radial alveolar count as criteria of diagnosis. *Arch Dis Child* 1979 Aug;54(8):614-8.
- (201) O'Toole SJ, Irish MS, Holm BA, Glick PL. Pulmonary vascular abnormalities in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 1996 Dec;23(4):781-94.
- (202) Geggel RL, Murphy JD, Langleben D, Crone RK, Vacanti JP, Reid LM. Congenital diaphragmatic hernia: arterial structural changes and persistent pulmonary hypertension after surgical repair. *J Pediatr* 1985 Sep;107(3):457-64.
- (203) 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 Aug;27(8):997-1001.
- (204) DeMello DE, Sawyer D, Galvin N, Reid LM. Early fetal development of lung vasculature. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997 May;16(5):568-81.
- (205) Shehata SM, Sharma HS, van der Staak FH, Kaa-Hulsbergen C, Mooi WJ, Tibboel D. Remodeling of pulmonary arteries in human congenital

diaphragmatic hernia with or without extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Surg* 2000 Feb;35(2):208-15.

- (206) Kay JM. Comparative morphologic features of the pulmonary vasculature in mammals. *Am Rev Respir Dis* 1983 Aug;128(2 Pt 2):S53-7.
- (207) 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 Jan;52(1):177-210.
- (208) Xu C, Chen ZX, Liu WY, Wang YX, Xiong ZX. [A series of observation on the expression of TGF-beta1 in the lung of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2009 Feb 15;47(4):301-4.
- (209) Leinwand MJ, Zhao J, Tefft JD, Anderson KD, Warburton D. Murine nitrofen-induced pulmonary hypoplasia does not involve induction of TGF-beta signaling. *J Pediatr Surg* 2002 Aug;37(8):1123-7.