

Padronização da técnica de ventilação pulmonar utilizando ventiladores com volume controlado em ratos com hérnia diafragmática congênita

Standardization of pulmonary ventilation technique using volume-controlled ventilators in rats with congenital diaphragmatic hernia

RODRIGO MELO GALLINDO; FRANCES LILIAN LANHELLAS GONÇALVES; REBECA LOPES FIGUEIRA; ANA LEDA BERTONCINI SIMÕES; LOURENÇO SBRAGIA

R E S U M O

Objetivo: padronizar uma técnica para ventilar fetos de rato com HDC usando um ventilador volume-controlado. **Métodos:** ratas grávidas foram distribuídas em: a) Controle (C); e b) Expostos a Nitrofen com HDC e sem HDC (N-). Fetos dos três grupos foram divididos aleatoriamente em subgrupos ventilados (V) ou não ventilados (NV). Os fetos foram coletados no dia 21,5 da gestação, pesados e ventilados por 30 minutos usando um ventilador volume-controlado. A seguir os pulmões foram coletados para estudo histológico. Nós avaliamos: peso corporal (PC), peso pulmonar total (PPT), peso do pulmão esquerdo (PPE), razão PPT/PC e PPE/PC, histologia morfológica das vias aéreas e as causas das falhas da ventilação. **Resultados:** PC, PPT, PPE, LLW, PPT/PC e PPE/PC foram maiores em C em relação a N- ($p < 0,05$) e a HDC ($p < 0,05$), mas não houve diferenças entre os subgrupos V e NV ($p > 0,05$). A morfologia das vias aéreas pulmonares mostrou hipoplasia nos grupos N- e HDC, não havendo diferença entre V e NV ($p < 0,05$). Os grupos C e N- puderam ser ventilados com sucesso usando o volume corrente de 75il, mas a falha de ventilação no grupo HDC só diminuiu quando ventilados com 50il. **Conclusão:** a ventilação a volume de ratos com HDC por um curto período é possível e não altera a morfologia fetal ou pulmonar.

Descritores: Hérnia diafragmática/congênita. Ventilação. Modelos animais. Ratos. Nitrofenóis.

INTRODUÇÃO

A hérnia diafragmática congênita (HDC) é um defeito raro que acomete entre 1:2000 a 1:4000 recém-nascidos¹⁻³. A hipoplasia e a hipertensão pulmonares levam a desconforto respiratório e são as principais responsáveis pelo óbito pós-natal². A mortalidade era de 50% em pacientes com diagnóstico isolado de HDC e em torno de 80% quando havia anomalias associadas⁴⁻⁷, mas, em alguns centros, vem caindo para 20-30% com a instituição de protocolos de tratamento padronizados^{1,3}.

Devido à hipoplasia e à hipertensão pulmonares, o paciente com HDC é de difícil manuseio ventilatório, apresentando *shunt* direita-esquerda, hipóxia, hipercapnia e acidose mista. Com isso, a frequência de lesão pulmonar, barotrauma e pneumotórax nesses pacientes eram muito altas, o que na maioria das vezes causava o óbito⁷. Wung *et al.* estabeleceram os parâmetros atualmente utilizados na ventilação mecânica assistida, com baixa pressão e hipercapnia permissiva (a *gentle ventilation*), além da postergação da correção cirúrgica⁸.

Para o estudo da HDC utilizam-se modelos congênitos, cirúrgicos ou toxicológicos⁹. O modelo mais estu-

dado é o toxicológico em ratos por meio do Nitrofen (2,4-diclorofenil 4-nitrofenil éter). O Nitrofen é um teratogêno que, quando administrado no dia gestacional (DG) 9,5 leva a cerca de 40% de fetos com HDC¹⁰, sendo que a grande maioria dos estudos experimentais deste modelo avalia o pulmão ao término da gestação. Dessa maneira, não é possível avaliar as modificações morfológicas e bioquímicas que ocorrem após a ventilação pulmonar.

Vários modelos de ventilação de animais de maior porte, como ovelhas¹¹⁻¹³ e coelhas^{14,15}, foram descritos em HDC, porém estas espécies carecem de opções para realização de estudos moleculares. Devido à dificuldade de ventilação do pulmão nestes pacientes, apenas um modelo em animais de pequeno porte foi descrito. Sluiter *et al.*¹⁴, adaptou um modelo de ventilação de coelhos prematuros para neonatos de ratos, além deste, somente mais três outros trabalhos reproduziram este modelo¹⁵⁻¹⁷, provavelmente devido a dificuldades técnicas, como o uso de um ventilador sofisticado adaptado, além de instrumentos para confirmar que a ventilação está realmente ocorrendo.

Devido à alta mortalidade neonatal decorrente da hipoplasia pulmonar e às complicações decorrentes da

ventilação neste defeito, nosso objetivo foi padronizar um modelo de ventilação em fetos de rato com HDC mais facilmente reprodutível, utilizando um ventilador ciclado a volume, além de avaliar as alterações causadas no parênquima pulmonar após a ventilação.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP) sob o número 043/2011.

Fêmeas de ratos *Sprague-Dawley*, com peso em torno de 250g, foram submetidas a acasalamento durante uma noite. No dia seguinte um esfregaço vaginal foi realizado e quando se observava uma mancha de esperma, o acasalamento era confirmado. Esse dia era determinado como dia zero da gestação (termo = 22 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas com oferecimento de água e ração *ad libitum*, em condições controladas de luminosidade (12 horas de claro/12 horas de escuro), temperatura (média de 23°C) e umidade relativa do ar (média de 55%).

As ratas gestantes foram distribuídas em dois grandes grupos: Controle (C) e Nitrofen (N). As ratas do grupo C não eram manipuladas. As ratas do grupo N eram expostas a 100mg de Nitrofen, diluído em 1ml de óleo de oliva, no DG 9,5 de acordo com Kluth *et al.*¹⁰. Os fetos expostos ao Nitrofen que desenvolveram HDC formaram o grupo HDC e os que não desenvolveram HDC formaram o

grupo N-, que foi subdividido em ventilados (CV, N-V e HDCV) e não ventilados (C, N- e HDC).

No DG 21,5 as ratas gestantes foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de Ketamina (50mg/ml) associada a Xilazina (20mg/ml). As ratas anestesiadas foram colocadas em uma mesa térmica com temperatura de 37°C. Após antisepsia com clorexidina aquosa, as ratas foram submetidas à laparotomia mediana com exposição dos cornos fetais.

Os fetos foram coletados individualmente, no sentido craniocaudal, iniciando pelo corno direito. O útero era clampeado com uma pinça de Halstead para impedir que o próximo feto fosse expelido e retornado para a cavidade abdominal, que era coberta com uma gaze estéril embebida em solução salina. Quando necessário, uma dose complementar de 0,1ml de Ketamina era feito por via intraperitoneal.

O feto foi pesado (peso corporal – PC) e colocado em outra mesa térmica a 37°C e fixado com fita crepe em decúbito dorsal (Figura 1A); foi realizada uma incisão cervical longitudinal, dissecação traqueal (Figura 1B e C), secção desta em sua face anterior e aposição de um cateter de Vialon® 24G (Figura 1D). O cateter foi conectado a extremidade de um equipo de soro para melhor conexão ao ventilador. Esse conjunto foi conectado a um ventilador volume-controlado e ciclado a tempo (MiniVent *type* 845, Harvard Apparatus®) (Figura 1E), com frequência de ciclagem de 80 ciclagens/minuto, FiO₂ 1,0, relação I:E de 1:1, PEEP de 0 cmH₂O por 30 minutos. Para impedir a extubação, as conexões entre o ventilador e o cateter da

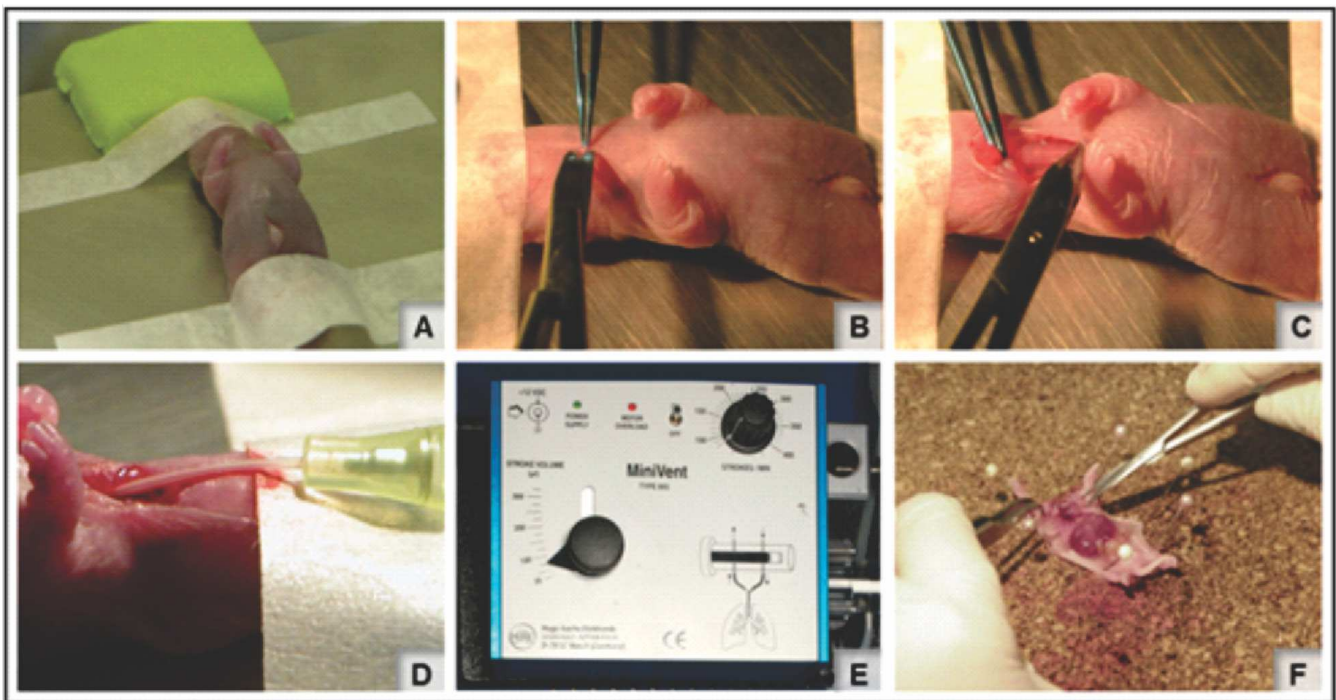


Figura 1 - A) feto posicionado em decúbito dorsal sobre mesa aquecida (em média 38°C) e fixados com fita adesiva; B) realização de incisão cervical anterior; C) isolamento da traqueia seguida de secção; D) feto intubado com cateter de teflon e ventilado; E) respirador com frequência fixada em 80/min e volume em 75µl; F) sacrifício por decapitação e colocação em mesa de cortiça para coleta.

traqueostomia foram fixados, à mesa térmica, com massa de modelar. Após o término da ventilação, nos fetos ventilados, ou após a pesagem corporal, nos fetos não ventilados, eles foram sacrificados por decapitação e seus pulmões foram dissecados (Figura 1F), colhidos para pesagem pulmonar (peso pulmonar total – PPT e peso pulmonar esquerdo – PPE) e enviados para processamento histológico.

Calculamos um volume corrente de aproximadamente 13,5ml/kg nos fetos C (75µl). Volume maior que o utilizado por Kroon *et al.*¹⁸, porém com uma frequência de ciclagem menor (80 ciclos/minuto). Os fetos N- e HDC foram ventilados com volumes decrescentes de: 75, 63, 50 e 30 µl, anotando-se as taxas de falhas, definidas por: pneumotórax (PT), pneumomediastino (PM) identificado pelo vazamento de ar ao redor da traqueia e falha na cateterização traqueal (FCT) e de sucessos definidos pela observação da expansão torácica e coloração rosácea do feto. As taxas de sucesso e complicações foram constantemente analisadas até encontrarmos o volume ideal.

As seguintes variáveis foram aferidas: PC, PPT e PPE. Para retirar a influência do PC sobre o PPT e o PPE, foram calculadas as razões PPT/PC e PPE/PC. Para análise da morfometria fetal foram coletados oito fetos por subgrupo após padronização do volume corrente.

As amostras foram fixadas em formaldeído, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 5µm e posteriormente coletados em lâminas histológicas pré-silanizadas. Os cortes foram cora-

dos por Tricrômio de Masson, e as lâminas foram montadas em Permount®.

Os cortes histológicos foram fotografados em aumento de 100X em fotomicroscópio e as imagens foram analisadas para obtenção da média linear de interceptação (*mean linear intercept* – Lm) e seus componentes diâmetro interno dos espaços aéreo (*internal diameter of the airspaces* – Lma) e a relação de comprimento de transecção do parênquima/espaco aéreo (*mean transection length* – Lmw), de acordo com os métodos descritos por Dunhill¹⁹ e modificados por Verbeken *et al.*²⁰. A análise morfométrica pulmonar foi realizada utilizando seis cortes por feto e quatro fetos por subgrupo.

Os valores obtidos através das pesagens e mensurações do parênquima pulmonar foram analisados pelo método ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer e expressos em média ± desvio padrão. Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os dados das falhas nas ventilações estão agrupados na tabela 1.

Verificamos que o melhor volume para ventilar foi 50µl com 53% de sucesso. Com o volume de 30µl foi possível ventilar, mas não foi possível verificar a expansão pulmonar. Não houve diferença no PC entre fetos ventilados e não ventilados do mesmo grupo ($p > 0,05$). Os fetos

Tabela 1 - Causas de erros na ventilação estratificado por grupo, volume e acidente.

Volume	Causa	Controle(n=38)	N-(n=68)	HDC(n=40)
75µl		C (n=38)	N- (n=20)	HDC (n=15)
	PT	5,3%	5,0%	6,7%
	PM	15,8%	5,0%	13,3%
	FCT	2,6%	25,0%	46,7%
	Total	23,7%	35,0%	66,7%
63µl			N- (n=11)	HDC (n=7)
	PT		18,2%	71,4%
	PM		9,1%	0,0%
	FCT		27,3%	14,3%
	Total		54,5%	85,7%
50µl			N- (n=35)	HDC (n=15)
	PT		8,5%	13,3%
	PM		0,0%	0,0%
	FCT		28,6%	33,3%
	Total		37,1%	46,7%
30µl			N- (n=2)	HDC (n=3)
	PT		0,0%	66,6%
	PM		0,0%	0,0%
	FCT		50,0%	0,0%
	Total		50,0%	66,6%

PT: pneumotórax; PM: pneumomediastino; FCT: falha na cateterização traqueal

do grupo C tiveram PC superior aos fetos dos grupos N- e HDC ($p < 0,001$). Não houve diferença no PPT entre fetos ventilados e não ventilados do mesmo grupo ($p > 0,05$). Os fetos do grupo C tiveram PPT superior aos fetos dos grupos N- e HDC ($p < 0,001$) e os fetos do grupo N- apresentaram resultados similares em relação ao grupo HDC ($p < 0,05$). Resultados similares ao PPT foram encontrados na análise do PPE, do PPT/PC e do PPE/PC (Tabela 2).

A análise morfométrica pulmonar mostrou hipoplasia progressiva nos fetos N. Dentre estes, a hipoplasia foi mais importante nos fetos HDC. Em geral, a ventilação por 30 minutos não mudou a morfometria pulmonar, exceto no grupo N-, onde observamos um aumento do Lm e do Lmw após a ventilação pulmonar. Os dados morfométricos pulmonares estão agrupados na figura 2. A figura 3 apresenta amostras de pulmões dos diversos grupos onde podemos observar os diferentes graus do desenvolvimento pulmonar.

DISCUSSÃO

Modelos de ventilação em fetos com HDC são mais descritos em animais de grande porte, como ovelhas e coelhos. Em fetos de ovelhas foram utilizados ventiladores pressão-controlados e ciclados a tempo¹¹⁻¹³. Em fetos de coelhos foram utilizados ventiladores volume-controlados, ciclados a tempo, porém limitados à pressão^{21,22}. Nestes animais só existem modelos cirúrgicos de HDC, com o inconveniente de terem uma manutenção mais cara, uma taxa de aborto alta (coelhas) e uma gestação mais prolongada (ovelhas), além da pouca disponibilidade de marcadores para estudos biomoleculares.

No modelo de pequeno animal como em fetos de ratos, o único modelo descrito baseou-se em outro padronizado para ventilação de coelhos prematuros²³, usando um ventilador sofisticado, modificado, pressão-controlado e ciclado a tempo, conectado a um tubo especial

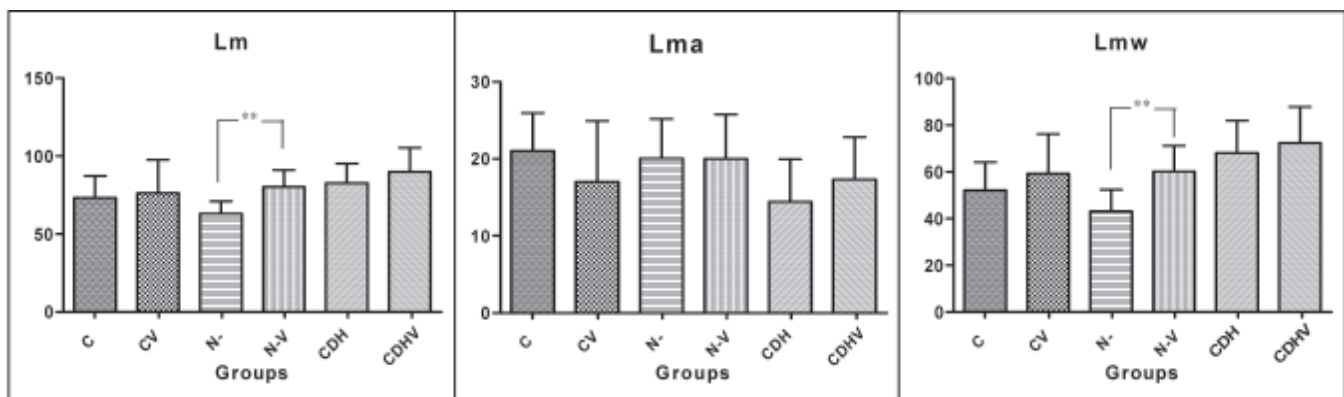


Figura 2 - Dados das análises morfométricas entre grupos ventilados e não ventilados.

Lm: média linear de interceptação, Lma: diâmetro interno dos espaços aéreos, Lmw: relação de comprimento de transecção do parênquima/ espaço aéreo. ** $p < 0,001$. C: controle; CV: controle ventilado, N-: exposto a nitrofen; N-V: exposto a nitrofen e ventilado; HDC: hérnia diafragmática congênita; HDCV: hérnia diafragmática congênita ventilada. O eixo y corresponde ao resultado dos cálculos específicos de cada parâmetro. C versus HDC - Lmw ($p < 0,001$) e Lma ($p < 0,05$). N- versus HDC - Lm, Lmw ($p < 0,001$) e Lma ($p < 0,05$). CV versus HDCV - Lm e Lmw ($p < 0,05$). N-V versus HDCV- Lma ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Resultados morfométricos fetais (mg) de cada grupo ventilado e não ventilado.

	C(n=8)	CV(n=8)	N-(n=8)	N-V(n=8)	HDC(n=8)	HDCV(n=8)	$p < 0,05$
PC	5640 (±223)	5530 (±82)	4947 (±116)	4683 (±87)	4683 (±105)	4632 (±398)	b,c,d,e
PPT	150 (±13)	139 (±9)	91 (±6)	101 (±1)	75 (±1)	73 (±12)	b,c,d,e,g,h
PPE	50 (±0,1)	46 (±0,3)	33 (±0,5)	37 (±0,6)	23 (±3)	24 (±0,5)	b,c,d,e,g,h
PPT/PC	0,027 (±0,002)	0,025 (±0,002)	0,018 (±0,001)	0,022 (±0,002)	0,016 (±0,002)	0,016 (±0,002)	b,c,d,e,g
PPE/PC	0,009 (±0,0013)	0,008 (±0,0006)	0,006 (±0,001)	0,008 (±0,001)	0,005 (±0,001)	0,005 (±0,001)	c,d,e,g,h

Grupos comparados - a: C x CV; b: C x N-; c: C x HDC; d: CV x N-V; e: CV x HDCV; f: N- x N-V; g: N- x HDC; h: N-V x HDCV; i: HDC x HDCV.

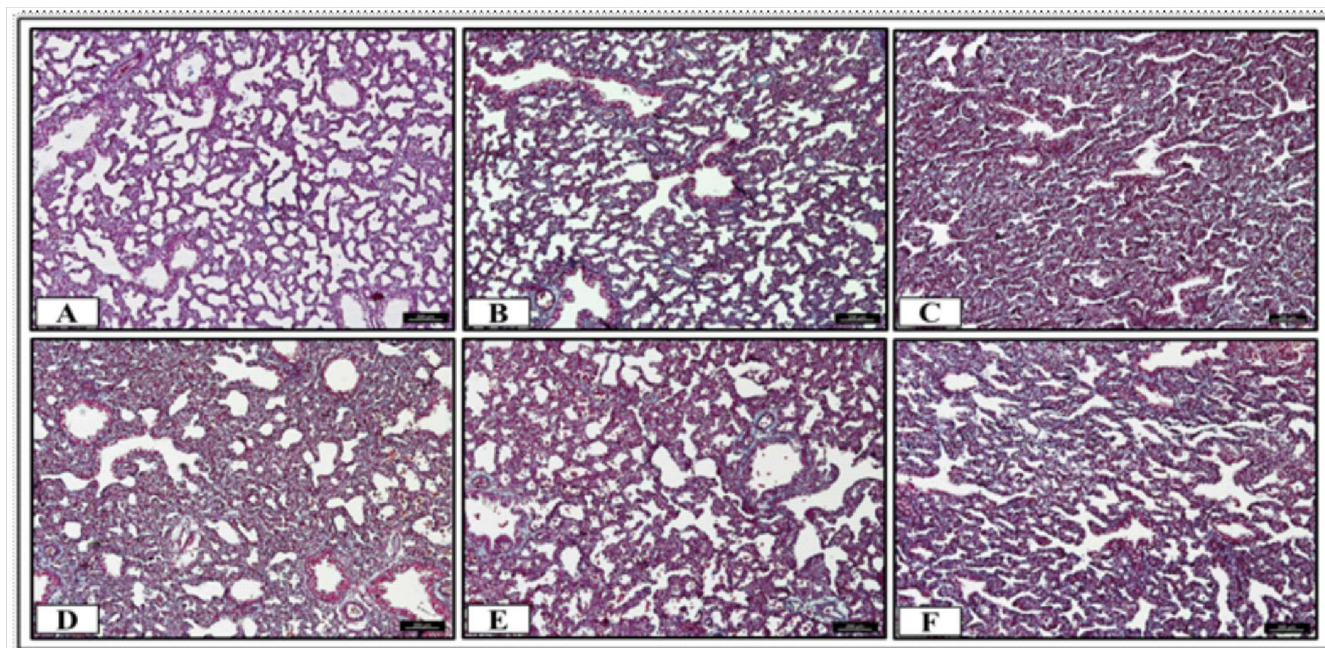


Figura 3 - Aspectos do desenvolvimento pulmonar dos fetos – ventilados e não ventilados

A) controle, **B)** exposto a nitrofen, **C)** hérnia diafragmática congênita. **D)** controle ventilado, **E)** exposto a nitrofen e ventilado, **F)** hérnia diafragmática congênita ventilada. Notar em C e F a hipoplasia pulmonar representada por maior densidade do parênquima e pouco espaço aéreo, mesmo ventilado.

para ventilação de múltiplos fetos em paralelo, além de outros equipamentos para monitorização de fluxo e pressão, confirmando que todos os fetos estavam sendo ventilados. A adaptação para ventilação em fetos de ratos foi descrita em 1992¹⁴, porém, esse modelo foi reproduzido em apenas três outros estudos¹⁵⁻¹⁷. Em nenhum destes artigos foi descrita a taxa de sucesso na cateterização traqueal ou taxa de complicações após a intubação, visto que o procedimento, os materiais utilizados e os próprios fetos são menores e de manuseio mais delicado. Possivelmente a não descrição desta manobra e das complicações possam justificar a baixa reprodutibilidade do modelo de ventilação em ratos. Por outro lado, em todos eles foram observadas mudanças na biologia molecular pulmonar após um período curto de ventilação.

No modelo de ventilação em ratos recém-nascidos normais, utilizando ventiladores mais simples, volume-controlados e ciclados a tempo, podendo ser²⁴ ou não limitados à pressão^{18,25}. O volume corrente admitido para a ventilação variou de 3,5 a 40 ml/Kg, com volume considerado mediano entre 8,5 e 12 ml/Kg e com frequência de ciclagem variando entre 20 e 600 ciclos/minuto, tendo como frequência mediana entre 100 e 160 ciclos/minuto. Porém a utilização de ventilação volume-controlado em ratos possui um limitante que é a possibilidade de se ventilar apenas um feto por vez.

Optamos por usar um volume corrente um pouco mais alto, cerca de 13,5ml/Kg (75µl), mas com uma frequência de ciclagem mais baixa (80 ciclos/minuto) nos

fetos do grupo C e obtivemos taxa mínima de falhas. Tentamos utilizar o mesmo volume para os fetos do grupo N, porém, a taxa de complicações como pneumotórax, pneumomediastino ou falha de cateterização traqueal foi muito alta, respectivamente 35 e 66,7 % nos fetos N- e HDC. Recalculamos o volume de acordo com o peso dos fetos expostos ao nitrofen, que são menores (13,5ml/kg@63µL), porém, mesmo ventilando com volume menor, a taxa de complicações ainda se manteve alta, em especial nos fetos HDC, respectivamente 54,5 e 85,7 % nos fetos N- e HDC. Reduzimos o volume ventilatório (10,5ml/Kg e 50µl) e obtivemos maior sucesso nos fetos com HDC, com uma taxa de complicação mais aceitável, respectivamente 37,1 e 46,7 % nos fetos N- e HDC. Finalmente, baixamos o volume para 30µl e, mesmo com o feto corretamente intubado, a visualização da expansão torácica com esse volume foi extremamente difícil, por isso consideramos o volume de 50µl como o volume ideal para ventilação dos fetos do grupo nitrofen.

Como há uma limitação de como diferenciar os fetos do grupo nitrofen se tem ou não hérnia antes do sacrifício sem um ultrassom especial para pequenos animais, tivemos que utilizar um volume que não sobrecarregasse os pulmões dos fetos HDC, mas que também pudesse ventilar e expandir adequadamente os pulmões dos fetos N-. Losty *et al.* avaliaram a complacência pulmonar estática de fetos de ratos normais e com HDC, e observaram uma diminuição desta nos fetos expostos e, em especial, nos fetos com HDC²⁶, justificando a necessidade de

um volume menor no grupo N. Esses resultados também corroboram os achados de um estudo recente do nosso grupo que observou menores volume pulmonar e espaço aéreo nos fetos HDC²⁷.

Após a passagem da curva de aprendizado, a taxa de sucesso na ventilação dos fetos C foi eficiente, enquanto que nos fetos do grupo N a curva de aprendizado foi mais demorada e a taxa de sucesso da ventilação foi bem menor, parte deste insucesso pode ser explicado por Xia *et al.* que relataram a presença de malformações traqueais nos fetos expostos ao nitrofen com e sem HDC²⁸. Foram observados anéis incompletos em 48 e 70 %, estenoses em 12 e 21 % e anéis vasculares em 12 e 11 %, respectivamente nos grupos N- e HDC.

Os resultados da morfologia fetal e pulmonar estão de acordo com estudos prévios que observaram fetos de tamanho progressivamente menor quando expostos ao Nitrofen (N-) e com HDC, hipoplasia pulmonar em am-

bos, sendo maior na HDC do que em relação aos fetos C^{14,29,30}. A ventilação por um tempo curto não alterou significativamente este padrão.

Portanto, no modelo de HDC em ratos, a ventilação a volume controlado e ciclado a tempo foi factível com aproximadamente 50% de sucesso usando o volume de 50µl. Além do mais, a ventilação de curta duração (30 minutos) não mudou o padrão histológico do parênquima pulmonar demonstrando sinais indiretos de menor complacência no pulmão dos fetos com HDC.

A ventilação de fetos de rato com HDC induzida por Nitrofen é possível usando um ventilador volume-controlado e ciclado a tempo. Após a passagem da curva de aprendizado, a taxa de sucesso na ventilação é excelente nos fetos C e razoável nos fetos N, devido a malformações traqueais. A ventilação por um curto período não altera a morfologia fetal ou pulmonar.

A B S T R A C T

Objective: To standardize a technique to ventilate CDH rat fetuses using a volume-controlled, time-cycled ventilator. **Methods:** Pregnant rats were divided into: a) Control (C) and b) Exposed to Nitrofen with (CDH) and without CDH (N-). Fetuses from the three groups were randomly divided into ventilated (V) or non ventilated (NV) sub-groups. Fetuses were harvested on gestational day 21.5, weighted and ventilated for 30 minutes using a volume-controlled, time-cycled ventilator. Afterwards the lungs were collected for histological study. We assessed: body weight (BW), total lung weight (TLW), left lung weight (LLW), TLW/BW ratio, LLW/BW ratio, histological airway morphology and failure to ventilation causes. **Results:** BW, TLW, LLW, TLW/BW ratio and LLW/BW ratio were greater on C in comparison to N- ($p < 0.05$) and on N- in comparison to CDH ($p < 0.05$), but there were no differences between V and NV sub-groups within the same group ($p > 0.05$). Lung airway morphology showed a hypoplasia on groups N- and CDH, with no difference between V and NV ($p > 0.05$). C and N- groups could be ventilated with success using 75µL tidal volume, but failure to ventilate on CDH group only decreased using 50µL tidal volume. **Conclusion:** Volume ventilation of CDH rats for a short period is feasible and does not change fetal or lung morphology.

Key words: Hernia, diaphragmatic/congenital. Ventilation. Models, animal. Rats. Nitrophenols.

REFERÊNCIAS

1. Rollins MD. Recent advances in the management of congenital diaphragmatic hernia. *Curr Opin Pediatr.* 2012;24(3):379-85.
2. Veenma DC, de Klein A, Tibboel D. Developmental and genetic aspects of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Pulmonol.* 2012;47(6):534-45.
3. van den Hout L, Schaible T, Cohen-Overbeek TE, Hop W, Siemer J, van de Ven K, et al. Actual outcome in infants with congenital diaphragmatic hernia: the role of a standardized postnatal treatment protocol. *Fetal Diagn Ther.* 2011;29(1):55-63.
4. Harrison MR, Adzick NS, Estes JM, Howell LJ. A prospective study of the outcome for fetuses with diaphragmatic hernia. *JAMA.* 1994;271(5):382-4.
5. 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;25(1):47-55; discussion 6-7.
6. Tonks A, Wylde M, Somerset DA, Dent K, Abhyankar A, Bagchi I, et al. Congenital malformations of the diaphragm: findings of the West Midlands Congenital Anomaly Register 1995 to 2000. *Prenat Diagn.* 2004;24(8):596-604.
7. Laberge JM, Flageole H. Fetal tracheal occlusion for the treatment of congenital diaphragmatic hernia. *World J Surg.* 2007;31(8):1577-86.
8. 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;30(3):406-9.
9. Wilcox DT, Irish MS, Holm BA, Glick PL. Animal models in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol.* 1996;23(4):813-22.
10. 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;25(8):850-4.
11. Bütter A, Bratu I, Flageole H, Laberge JM, Kovacs L, Faucher D, et al. Fetal tracheal occlusion in lambs with congenital diaphragmatic hernia: role of exogenous surfactant at birth. *Pediatr Res.* 2005;58(4):689-94.
12. Kapur P, Holm BA, Irish MS, Sokolowski J, Patel A, Glick PL. Lung physiological and metabolic changes in lambs with congenital diaphragmatic hernia after administration of prenatal maternal corticosteroids. *J Pediatr Surg.* 1999;34(2):354-6.
13. Lewis NA, Holm BA, Swartz D, Sokolowski J, Rossman J, Glick PL. Antenatal vitamin A decreases ventilation-induced lung injury in

- the lamb model of congenital diaphragmatic hernia. *Asian J Surg.* 2006;29(3):193-7.
14. Sluiter W, Bos AP, Silveri F, Tenbrinck R, Kraakslee R, Tibboel D, et al. Nitrofen-induced diaphragmatic hernias in rats: pulmonary antioxidant enzyme activities. *Pediatr Res.* 1992;32(4):394-8.
 15. Scheffers EC, IJsselstijn H, Tenbrinck R, Lachmann B, de Jongste JC, Molenaar JC, et al. Evaluation of lung function changes before and after surfactant application during artificial ventilation in newborn rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1994;29(6):820-4.
 16. Guarino N, Teramoto H, Shima H, Oue T, Puri P. Effect of mechanical ventilation on the pulmonary expression and production of elastin in nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg.* 2002;37(9):1253-7.
 17. Shinkai T, Shima H, Solari V, Puri P. Expression of vasoactive mediators during mechanical ventilation in nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Surg Int.* 2005;21(3):143-7.
 18. Kroon AA, Wang J, Kavanagh BP, Kavanagh B, Huang Z, Kuliszewski M, et al. Prolonged mechanical ventilation induces cell cycle arrest in newborn rat lung. *PLoS One.* 2011;6(2):e16910.
 19. Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax.* 1962;17(4):320-8.
 20. Verbeken EK, Cauberghs M, Mertens I, Clement J, Lauweryns JM, Van de Woestijne KP. The senile lung. Comparison with normal and emphysematous lungs. 1. Structural aspects. *Chest.* 1992;101(3):793-9.
 21. 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;42(6):505-12.
 22. 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;44(2):112-21.
 23. Lachmann B, Grossmann G, Freyre J, Robertson B. Lung-thorax compliance in the artificially ventilated premature rabbit neonate in relation to variations in inspiration:expiration ratio. *Pediatr Res.* 1981;15(5):833-8.
 24. Iben SC, Haxhiu MA, Farver CF, Miller MJ, Martin RJ. Short-term mechanical ventilation increases airway reactivity in rat pups. *Pediatr Res.* 2006;60(2):136-40.
 25. Kroon AA, Wang J, Huang Z, Cao L, Kuliszewski M, Post M. Inflammatory response to oxygen and endotoxin in newborn rat lung ventilated with low tidal volume. *Pediatr Res.* 2010;68(1):63-9.
 26. Losty PD, Suen HC, Manganaro TF, Donahoe PK, Schnitzer JJ. Prenatal hormonal therapy improves pulmonary compliance in the nitrofen-induced CDH rat model. *J Pediatr Surg.* 1995;30(3):420-6.
 27. Sbragia L, Nassr ACC, Gonçalves FL, Schmidt AF, Zuliani CC, Garcia PV, et al. VEGF receptors decrease during lung development in congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen. *Braz J Med Biol Res.* in press.
 28. Xia H, Migliazza L, Diez-Pardo JA, Tovar JA. The tracheobronchial tree is abnormal in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int.* 1999;15(3-4):184-7.
 29. Tenbrinck R, Tibboel D, Gaillard JL, Kluth D, Bos AP, Lachmann B, et al. Experimentally induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg.* 1990;25(4):426-9.
 30. Schmidt AF, Gonçalves FL, Regis AC, Gallindo RM, Sbragia L. Prenatal retinoic acid improves lung vascularization and VEGF expression in CDH rat. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207(1):76.e25-32.

Recebido em 28/08/2013

Aceito para publicação em 28/09/2013

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: FAPESP – #11/00794-1.

Endereço para correspondência:

Lourenço Sbragia

E-mail: sbragia@fmrp.usp.br