UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

KARINA MIURA DA COSTA

Avaliação do efeito de diferentes tempos de ventilação na vasculatura pulmonar e na expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS em neonatos de ratos com hérnia diafragmática congênita

Ribeirão Preto

2020

KARINA MIURA DA COSTA

Avaliação do efeito de diferentes tempos de ventilação na vasculatura pulmonar e na expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS em neonatos de ratos com hérnia diafragmática congênita

Versão original

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Miura da Costa, Karina

Avaliação do efeito de diferentes tempos de ventilação na vasculatura pulmonar e na expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS em neonatos de ratos com hérnia diafragmática congênita. Ribeirão Preto, 2020.

170 f. : il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Sbragia, Lourenço.

1. Hérnia diafragmática congênita. 2. Nitrofen. 3. eNOS. 4. VEGF. 5. VEGFR-1. 6. VEGFR-2. 7. Ventilação mecânica.

Miura da Costa K. Avaliação do efeito de diferentes tempos de ventilação na vasculatura pulmonar e na expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS em neonatos de ratos com hérnia diafragmática congênita [doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2020.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____
Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____

RESUMO

Costa KM. Avaliação do efeito de diferentes tempos de ventilação na vasculatura pulmonar e na expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS em neonatos de ratos com hérnia diafragmática congênita [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: A hérnia diafragmática congênita (HDC) consiste em um defeito na formação do diafragma que resulta na passagem de vísceras abdominais para a cavidade torácica. A incidência é de 1:2500-4000 nascidos vivos e sua elevada morbimortalidade está relacionada à hipoplasia e à hipertensão arterial pulmonar, cujos mecanismos ainda são pouco compreendidos e tornam o cuidado neonatal um grande desafio. Portadores de HDC apresentam um curto período de estabilidade ventilatória pós-natal, com oxigenação sistêmica adequada, chamado de período de lua de mel (*honeymoon*). Em seguida, há deterioração progressiva da oxigenação com piora da hipertensão pulmonar. Acredita-se que alterações da sinalização mediadas pelo VEGF, VEGFR-1/2 e pela eNOS levam à adaptação errática da circulação pulmonar neonatal e resultam em alterações da reatividade vascular, com consequente hipertensão pulmonar. **Objetivo:** Avaliar o efeito da ventilação mecânica durante o período de lua de mel na morfometria e na expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS na HDC experimental em ratos. **Material e Métodos:** Filhotes de ratas Sprague Dawley foram separados em cinco grupos: controle (C), controle respirando (CR), controle ventilado (CV), hérnia diafragmática congênita (HDC) e hérnia diafragmática congênita ventilado (HDCV). Para os grupos com HDC, as ratas prenhes foram expostas a 100 mg de nitrofen no dia gestacional (DG) 9,5. Os grupos CR, CV e HDCV foram subdivididos em tempos ventilatórios de 30, 60 e 90 minutos (n=7-8 cada). No DG 21,5, os neonatos foram coletados e, após a ventilação (grupos ventilados) e a pesagem (grupos não ventilados), foram sacrificados. Os pulmões de n=4 neonatos de cada grupo foram submetidos à análise do parênquima (fração de espaço aéreo) e da vasculatura pulmonar (espessura da camada média), além da avaliação imuno-histoquímica (IHQ) (n=4) e por *western blotting* (WB) (n=3-4) da expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS. A análise estatística foi realizada com diferenças significativas para $p < 0,05$ usando ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. **Resultados:** Os grupos com HDC apresentaram menores parâmetros biométricos que os grupos controle. A fração de espaço aéreo do grupo HDC foi menor do que todos os demais grupos, e os grupos ventilados apresentaram valores semelhantes independente do tempo ventilatório. Quanto à

vasculatura pulmonar, os controles apresentaram redução da espessura da camada média, enquanto os neonatos com HDC tiveram aumento desse parâmetro com a progressão do tempo ventilatório (período de lua de mel). Os grupos controle e os grupos com HDC apresentaram diferentes padrões de expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS. Os achados de expressão dos receptores e eNOS foram significativos à IHQ mas não ao WB, enquanto o VEGF foi significativo ao WB mas não à IHQ. **Conclusão:** Houve alteração da reatividade vascular pulmonar e da expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS na HDC em ratos durante o período de lua de mel, o que sugere um papel importante da via VEGF-NO nesse período.

Palavras-chave: eNOS. Hérnia diafragmática congênita. Nitrofen. VEGF. VEGFR-1. VEGFR-2. Ventilação mecânica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

ABSTRACT

Costa KM. Evaluation of different periods of mechanical ventilation and morphological study of pulmonary arteries remodeling in rats neonates with congenital diaphragmatic hernia [thesis]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2020.

Introduction: Congenital diaphragmatic hernia (CDH) consists of a defect in the diaphragm formation that results in abdominal viscera passing into the chest cavity. The incidence is 1:2500-4000 live births and its high morbidity and mortality are related to lung hypoplasia and pulmonary arterial hypertension. The mechanisms implicated in their pathogenesis are still poorly understood, which results in a significant challenge for neonatal care. CDH patients have a short postnatal ventilatory stability period with adequate systemic oxygenation, called the honeymoon period. Afterward, there is a progressive deterioration of oxygenation with worsening pulmonary hypertension. Alterations in signaling mediated by VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS might lead to erratic adaptation of the neonatal pulmonary circulation and result in vascular reactivity changes, with consequent pulmonary hypertension. **Objective:** To evaluate mechanical ventilation's effect on the morphometry and VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS expressions during the honeymoon period in experimental HDC. **Material and Methods:** Sprague Dawley neonates were separated into five groups: control (C), breathing control (BC), ventilated control (VC), congenital diaphragmatic hernia (CDH) and ventilated congenital diaphragmatic hernia (VCDH). For the CDH groups, pregnant rats were exposed to 100 mg of nitrofen on the gestational day (GD) 9.5. BC, VC and VCDH groups were subdivided into ventilatory times of 30, 60 and 90 minutes (n=7-8 each). In GD 21.5, neonates were harvested and, after ventilation (ventilated groups) and weighing (non-ventilated groups), they were sacrificed. The lungs of n=4 neonates from each group were submitted to analysis of lung parenchyma (airspace fraction) and pulmonary vasculature (media wall thickness), in addition to immunohistochemical evaluation (IHC) (n=4) and western blotting (WB) (n=3-4) of VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS expressions. Statistical analysis was performed with significant differences for $p < 0.05$ using one-way ANOVA with Tukey's post-test. **Results:** The groups with CDH showed lower biometric parameters than the control groups. The airspace fraction in the CDH group was lower than all the other groups, and the ventilated groups showed similar values regardless of ventilatory time. As for the pulmonary vasculature, the controls showed a reduction of the media wall

thickness, while neonates with CDH presented an increase of this parameter with the progression of ventilatory time (honeymoon period). Control groups and groups with CDH showed different expression patterns of VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS. The findings regarding receptors and eNOS were significant for IHC but not for WB, while VEGF was significant for WB but not for IHC. **Conclusion:** There was a change in pulmonary vascular reactivity and in the expression of VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS in experimental CDH during the honeymoon period, which suggests an important role of the VEGF-NO pathway during this period.

Keywords: Congenital diaphragmatic hernia. eNOS. Mechanical ventilation. Nitrofen. VEGF. VEGFR-1. VEGFR-2.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da ativação dos receptores VEGFR-1/2 pelo VEGF.....	19
Figura 2 - Esfregaço vaginal e confirmação da prenhez.....	24
Figura 3 - Coleta das amostras.....	26
Figura 4 - Formação dos grupos experimentais.....	27
Figura 5 - Transiluminação para diagnóstico de HDC.....	29
Figura 6 - Traqueostomia nos grupos de ventilação mecânica.....	31
Figura 7 - Ventilação mecânica.....	32
Figura 8 - Confirmação da HDC.....	33
Figura 9 - Avaliação histológica do parênquima pulmonar.....	35
Figura 10 - Medidas usadas para o cálculo da espessura da camada média.....	36
Figura 11 - Reticulo de Weibel.....	38
Figura 12 - Desenho do estudo.....	41
Figura 13 - Análise histológica do parênquima pulmonar.....	50
Figura 14 - Análise histológica da vasculatura pulmonar.....	54
Figura 15 - Análise imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar.....	58
Figura 16 - Expressão imuno-histoquímica de VEGF.....	62
Figura 17 - Expressão de VEGF por <i>western blotting</i>	66
Figura 18 - Expressão imuno-histoquímica de VEGFR-2.....	68
Figura 19 - Expressão de VEGFR-2 por <i>western blotting</i>	73
Figura 20 - Expressão imuno-histoquímica de VEGFR-1.....	75
Figura 21 - Expressão de VEGFR-1 por <i>western blotting</i>	79
Figura 22 - Expressão imuno-histoquímica de eNOS.....	81
Figura 23 - Expressão de eNOS por <i>western blotting</i>	85
Figura 24 - Sumário dos principais resultados em relação aos pesos.....	87
Figura 25 - Sumário dos principais resultados em relação à fração de espaço aéreo e espessura da camada média.....	88
Figura 26 - Sumário dos principais resultados em relação à expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS.....	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação biométrica do peso corporal	44
Gráfico 2 - Avaliação biométrica do peso do pulmão esquerdo (PPE).....	45
Gráfico 3 - Avaliação biométrica do peso pulmonar total (PPT).....	46
Gráfico 4 - Razão peso do pulmão esquerdo (PPE) / peso corporal (PC).....	47
Gráfico 5 - Razão peso pulmonar total (PPT) / peso corporal (PC).....	48
Gráfico 6 - Avaliação histológica do parênquima pulmonar	52
Gráfico 7 - Avaliação histológica da vasculatura pulmonar	56
Gráfico 8 - Avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar.....	60
Gráfico 9 – Avaliação imuno-histoquímica de VEGF	64
Gráfico 10 – Avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-2	70
Gráfico 11 – Avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-1	77
Gráfico 12 – Avaliação imuno-histoquímica de eNOS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Neonatos excluídos do projeto cujas mães foram expostas ao nitrofen.....	42
Tabela 2 - Neonatos excluídos do projeto cujas mães não foram expostas ao nitrofen (mães dos grupos controle).....	43
Tabela 3 (APÊNDICE A) - Avaliação biométrica.....	108
Tabela 4 (APÊNDICE B) - Comparação da avaliação biométrica entre os grupos.....	109
Tabela 5 - Avaliação histológica do parênquima pulmonar.....	51
Tabela 6 (APÊNDICE C) - Comparação da avaliação histológica do parênquima pulmonar entre os grupos.....	111
Tabela 7 - Avaliação histológica da vasculatura pulmonar.....	55
Tabela 8 (APÊNDICE D) - Comparação da avaliação histológica da vasculatura pulmonar entre os grupos.....	112
Tabela 9 - Avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar.....	59
Tabela 10 (APÊNDICE E) - Comparação da avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar entre os grupos.....	113
Tabela 11 - Avaliação imuno-histoquímica de VEGF.....	63
Tabela 12 (APÊNDICE F) - Comparação da avaliação imuno-histoquímica de VEGF entre os grupos.....	114
Tabela 13 – Avaliação por <i>western blotting</i> de VEGF.....	65
Tabela 14 (APÊNDICE G) - Comparação da avaliação por <i>western blotting</i> de VEGF entre os grupos.....	115
Tabela 15 - Avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-2.....	69
Tabela 16 (APÊNDICE H) - Comparação da avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-2 entre os grupos.....	116
Tabela 17 – Avaliação por <i>western blotting</i> de VEGFR-2.....	72
Tabela 18 (APÊNDICE I) - Comparação da avaliação por <i>western blotting</i> de VEGFR-2 entre os grupos.....	117
Tabela 19 - Avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-1.....	76
Tabela 20 (APÊNDICE J) - Comparação da avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-1 entre os grupos.....	118
Tabela 21 – Avaliação por <i>western blotting</i> de VEGFR-1.....	78
Tabela 22 (APÊNDICE K) - Comparação da avaliação por <i>western blotting</i> de VEGFR-1 entre os grupos.....	119

Tabela 23 - Avaliação imuno-histoquímica de eNOS.....	82
Tabela 24 (APÊNDICE L) - Comparação da avaliação imuno-histoquímica de eNOS entre os grupos	120
Tabela 25 – Avaliação por <i>western blotting</i> de eNOS	84
Tabela 26 (APÊNDICE M) - Comparação da avaliação por <i>western blotting</i> de eNOS entre os grupos	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	<i>Ammonium Persulfate</i> , Persulfato de Amônio
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albumina sérica bovina
C	Controle
CR	Controle Respirando
CR30	Controle Respirando 30 minutos
CR60	Controle Respirando 60 minutos
CR90	Controle Respirando 90 minutos
CV	Controle Ventilado (mecanicamente)
CV30	Controle Ventilado (mecanicamente) 30 minutos
CV60	Controle Ventilado (mecanicamente) 60 minutos
CV90	Controle Ventilado (mecanicamente) 90 minutos
DAB	<i>3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride</i> , 3,3'-diaminobenzidino-tetra-hidrocloreto
DE	Diâmetro Externo
DG	Dia Gestacional
DI	Diâmetro Interno
DP	Desvio Padrão
ECM	Espessura da Camada Média
ECM-IHQ	Espessura da Camada Média por Imuno-Histoquímica
ECMO	<i>Extracorporeal Membrane Oxygenation</i> , oxigenação por membrana extracorpórea
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> , óxido nítrico sintase endotelial
FETO	<i>Fetoscopic Tracheal Occlusion</i> , oclusão traqueal por fetoscopia
FiO2	Fração inspirada de Oxigênio
HDC	Hérnia Diafragmática Congênita
HDCV	Hérnia Diafragmática Congênita Ventilado
HDCV30	Hérnia Diafragmática Congênita Ventilado (mecanicamente) 30 minutos
HDCV60	Hérnia Diafragmática Congênita Ventilado (mecanicamente) 60 minutos
HDCV90	Hérnia Diafragmática Congênita Ventilado (mecanicamente) 90 minutos
HP	Hipertensão Pulmonar
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , peroxidase de rábano
iNO	<i>Inhaled Nitric Oxide</i> , óxido nítrico inalado

IHQ	Imuno-Histoquímica
NO	<i>Nitric Oxide</i> , óxido nítrico
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> , óxido nítrico sintase
PaO ₂	Pressão arterial parcial de Oxigênio
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> , tampão fosfato salino
PC	Peso Corporal
PEEP	<i>Positive End-expiratory Pressure</i> , pressão positiva expiratória final
PPE	Peso do Pulmão Esquerdo
PPT	Peso Pulmonar Total
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ácido Ribonucleico
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , lauril sulfato de sódio
SMA	<i>Smooth Muscle Actin</i> , actina de músculo liso
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> , Salina Tamponada com Tris
Temed	<i>Tetramethylethylenediamine</i> , Tetrametiletilenodiamina
TMA	<i>Tissue Microarray</i> , Matriz de Amostras Teciduais
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1</i> , receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1
VEGFR-2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i> , receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2
vs.	Versus
WB	<i>Western Blotting</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	23
4.1.1	Avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais	23
4.1.2	Animais e obtenção das fêmeas prenhes	23
4.1.3	Indução da hérnia diafragmática congênita	25
4.1.4	Coleta das amostras	25
4.1.5	Formação dos grupos experimentais	26
4.1.6	Grupos de ventilação espontânea	28
4.1.7	Grupos de ventilação mecânica	28
4.2	AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA.....	33
4.3	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	34
4.3.1	Avaliação histológica do parênquima pulmonar	34
4.3.2	Avaliação histológica da vasculatura pulmonar	35
4.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA	36
4.4.1	Avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar	37
4.4.2	Avaliação imuno-histoquímica da expressão de VEGFR-1/2 e eNOS	38
4.5	<i>WESTERN BLOTTING</i>	39
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4.7	DESENHO DO ESTUDO	40
5	RESULTADOS	42
5.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	42
5.2	AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA.....	43
5.3	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	49
5.3.1	Avaliação histológica do parênquima pulmonar	49
5.3.2	Avaliação histológica da vasculatura pulmonar	53
5.4	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA VASCULATURA PULMONAR....	57
5.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VEGF, VEGFR-1/2 E eNOS.....	61

5.5.1	Avaliação da expressão de VEGF	61
5.5.2	Avaliação da expressão de VEGFR-2	67
5.5.3	Avaliação da expressão de VEGFR-1	74
5.5.4	Avaliação da expressão de eNOS	80
5.6	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	86
6	DISCUSSÃO.....	90
6.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	90
6.2	AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA.....	91
6.3	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	91
6.3.1	Avaliação histológica do parênquima pulmonar	91
6.3.2	Avaliação histológica da vasculatura pulmonar	92
6.4	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	93
6.4.1	Avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar	93
6.4.2	Avaliação da expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS	93
6.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
7	CONCLUSÃO.....	98
7.1	GERAL	98
7.2	ESPECÍFICAS.....	98
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICES.....	107

1 INTRODUÇÃO

A hérnia diafragmática congênita (HDC) consiste em uma anomalia no desenvolvimento do diafragma, de provável etiologia multifatorial, na qual ocorre agenesia parcial ou total do músculo, mais frequente na região póstero-lateral esquerda (85%) (1–4), o que permite a passagem de órgãos abdominais para a cavidade torácica e leva à compressão do pulmão fetal, prejudicando seu desenvolvimento (5). A incidência da HDC é de 1,09 a 2,67 para cada 10.000 nascidos vivos (6–8), e os custos ao sistema de saúde são elevados principalmente pela necessidade de internação prolongada em unidade de terapia intensiva neonatal, antibióticos de amplo espectro, além de medicações e terapias de alto custo (9–11). Não há dados brasileiros a esse respeito, mas um estudo da década de 90 nos Estados Unidos mostrou os custos diretos relacionados à internação inicial por HDC em um hospital da Califórnia: cerca de US\$ 100.000,00 no grupo sem oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO - *extracorporeal membrane oxygenation*) e de US\$ 350.000,00 para o grupo que necessitou de ECMO. O gasto estimado com portadores de HDC no país era de cerca de 250 milhões de dólares ao ano (12). Enfatizando que esses valores seriam relativos ao custo inicial da doença, sem considerar os gastos a longo prazo com pacientes com sequelas respiratórias e neurológicas.

Em relação à fisiopatogenia da HDC, o diafragma se desenvolve entre a quarta e a décima segunda semana de vida intra-útero, e não há consenso se a hérnia ocorre devido a um defeito no diafragma primordial, ou se a hipoplasia pulmonar que ocorre na hérnia poderia levar a um inadequado fechamento do músculo por um possível erro de sinalização entre os folhetos embrionários (5,13–16). Na primeira hipótese, acreditava-se que a compressão promovida pelas vísceras abdominais no tórax acontecia em um período crítico do desenvolvimento pulmonar, prejudicando a ramificação da árvore brônquica, com subsequente hipoplasia pulmonar (17,18). Contudo, recentemente foi proposta a hipótese dos dois insultos (*two hits theory*), que defende a ideia de que a lesão inicial (primeiro *hit*) ocorreria durante o estágio de organogênese, devido a fatores genéticos e/ou ambientais ainda não identificados, resultando em hipoplasia pulmonar bilateral. Isso seria seguido de uma lesão secundária ao defeito diafragmático (segundo *hit*), que ocorreria durante o estágio pseudoglandular do desenvolvimento pulmonar devido à compressão mecânica do pulmão ipsilateral à hérnia pelas vísceras abdominais. Essa teoria explica a hipoplasia pulmonar bilateral, já que o primeiro insulto afeta ambos os pulmões, enquanto o segundo insulto afeta principalmente o pulmão ipsilateral ao defeito (19).

No pulmão hipoplásico, os espaços aéreos são menores, com septos interalveolares mais espessos e redução no número de divisões brônquicas (20,21). Como o desenvolvimento vascular acontece paralelamente ao da via aérea, o leito vascular pulmonar também é hipodesenvolvido em pacientes com HDC (9,16,20). Há muscularização anormal da parede arterial com extensão periférica da camada muscular para as arteríolas (20,22). Devido a essas mudanças histológicas, ocorrem alterações da reatividade vascular e da inervação autonômica que, por sua vez, causam respostas inadequadas induzidas por fatores endoteliais e/ou pelo desequilíbrio entre mediadores vasoconstritores e vasodilatadores (9,23).

Apesar de vários fatores atuarem sobre a morbimortalidade da doença, a hipoplasia e a hipertensão pulmonar (HP) são os principais fatores que definem a dificuldade de manejo desses pacientes e o resultado do tratamento (1,17,24–26).

Mesmo considerando os avanços no diagnóstico e nos cuidados perinatais, além da possibilidade de intervenção fetal, a mortalidade da HDC se mantém elevada (27). Os principais protocolos de manejo responsáveis pelo aumento das taxas de sobrevivência vêm utilizando a ventilação mecânica associada ou não ao óxido nítrico inalado (iNO – *inhaled nitric oxide*), à ECMO e à oclusão traqueal por fetoscopia (FETO - *fetoscopic tracheal occlusion*) (28). Além disso, a ventilação mecânica com baixa pressão e hipercapnia permissiva (*gentle ventilation*) tem permitido a intervenção cirúrgica no momento mais adequado da estabilidade hemodinâmica e pulmonar do paciente, visto que promove maior recrutamento alveolar, auxiliando a melhora da função ventilatória e reduzindo a ocorrência de volutraumas (25,29).

Antes do uso dessas modalidades terapêuticas, a mortalidade relatada para os pacientes com HDC chegava a 70% (30,31). Nessa época, a correção cirúrgica de emergência era preconizada para os portadores da doença (32). Após a instituição do reparo cirúrgico tardio (aguardando a estabilização clínica do paciente) no final dos anos 80 e da implementação dos novos protocolos, a mortalidade relacionada à HDC isolada teve queda para 25% (33). Contudo, mesmo com o emprego da ECMO e da FETO, essa mortalidade se mantém elevada (cerca de 50%) para pacientes com HDC associada a outras malformações ou como parte de síndromes (34). A dificuldade no manejo da hipoplasia e da HP, consequentes à pouca compreensão em relação à sua fisiopatologia, são consideradas parcialmente responsáveis pela não redução da mortalidade ao longo das últimas décadas (19).

Para se entender a HP na HDC, é necessário identificar como acontece a transição da circulação fetal para a neonatal. É um processo complexo, que depende da habilidade da circulação pulmonar fetal de baixo fluxo e alta resistência em se adaptar para uma circulação

neonatal de alto fluxo e baixa resistência dentro de poucos minutos após o nascimento (3,20,35). Essas adaptações fisiológicas dependem, em grande parte, do desenvolvimento pulmonar e vascular adequados, o que não acontece na HDC (26,28). Nesses casos, há excessiva muscularização dos vasos pulmonares e falha na adaptação pós-natal (28,36) que podem levar à persistência do padrão fetal de circulação e, conseqüentemente, HP, hipercapnia, hipoxemia e acidose mista (37).

Contudo, com frequência, portadores de HDC apresentam um curto período de estabilidade ventilatória pós-natal, com oxigenação sistêmica adequada, chamado de período de lua de mel (*honeymoon*) (38). Em seguida, há deterioração progressiva da oxigenação com piora da HP pela adaptação patológica da circulação neonatal, shunt direita-esquerda pelo ducto arterioso e pelo forame oval (5,39). Esse período tem duração entre 6 e 24 horas (40), podendo estender-se por até 48 horas (41), e é caracterizado por estabilidade ventilatória transitória com pressão arterial parcial de oxigênio (PaO₂) pós-ductal >50 mmHg (40,42,43).

Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez por Collins et al. (1977), que questionaram a hipótese da hipoplasia pulmonar ser a única responsável pela morbimortalidade elevada dos portadores de HDC, já que, isoladamente, ela não explicava a estabilidade clínica transitória. Esses autores postularam a hipótese que a fisiopatologia desse período deveria estar relacionada a um evento dinâmico, e não somente à hipoplasia pulmonar (44).

Pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares implicados no período de lua de mel dos pacientes com HDC, e as alterações que culminam no seu fim.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - *vascular endothelial growth factor*) é fundamental ao desenvolvimento fetal e neonatal do pulmão normal, sendo um potente regulador da angiogênese, da vasculogênese e da remodelação vascular pós-natal (9,26,45,46).

O VEGF atua por meio dos seus receptores tirosino-quinase (47). O receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1 (VEGFR-1 - *vascular endothelial growth factor receptor 1*) e o receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR-2 - *vascular endothelial growth factor receptor 2*) expressos nas células endoteliais são mediadores de uma variedade de eventos fisiológicos e patológicos envolvendo o desenvolvimento vascular pulmonar (48,49). O VEGFR-2 estimula a mitose e tem papel fundamental tanto na vasculogênese quanto na angiogênese. Já o VEGFR-1, que tem afinidade cerca de 10 vezes maior pelo VEGF (49,50), modula os efeitos do VEGFR-2, regulando a proliferação endotelial excessiva e estimulando a organização e a manutenção dos vasos já formados (49,51,52). Assim, o

VEGFR-1 atua como um receptor silente devido à sua fraca atividade tirosino quinase, e pode servir como um *decoy* para o VEGF (50).

O óxido nítrico (NO - *nitric oxide*) é um importante mediador da função endotelial que influencia o tônus vascular (53). Além do potente efeito vasodilatador, ele exerce papel crítico no desenvolvimento pulmonar, com redução da apoptose devido aos seus efeitos antioxidantes, promoção da ramificação da árvore pulmonar e modulação da proliferação de células musculares lisas (26,54,55). Especula-se que tenha também um papel central na transição da circulação fetal para a neonatal (56,57).

Existe uma regulação recíproca entre o VEGF e o NO na angiogênese (52). O NO é sintetizado pela óxido nítrico sintase (NOS - *nitric oxide synthase*), e a isoforma presente nas células vasculares é a NOS endotelial (eNOS - *endothelial nitric oxide synthase*) (58). O VEGF estimula as células endoteliais a produzirem NO ao ativar inicialmente o VEGFR-2, que ativa a eNOS, aumentando a produção de NO, conforme esquematizado na Figura 1 (58–64). O NO, por sua vez, também regula a produção de VEGF, mas por mecanismos ainda pouco compreendidos (58,65).

Estudos sugerem que níveis alterados de VEGF e NO exercem papel importante na remodelação vascular errática dos pacientes com HDC (26,66,67). Experimentos envolvendo ratos com deficiência congênita de eNOS evidenciaram que os animais evoluem com HP, e que a atividade da eNOS é essencial à manutenção do tônus vascular pulmonar normal (68,69).

Figura 1 - Representação da ativação dos receptores VEGFR-1/2 pelo VEGF

A: Devido à alta afinidade do VEGFR-1, o VEGF se liga a ele quando em baixas concentrações. B: Quando há aumento da concentração de VEGF, há ligação com o VEGFR-2 e, entre os eventos desencadeados, ocorre estimulação da eNOS para produção de NO. eNOS: óxido nítrico sintase endotelial. NO: óxido nítrico. VEGF: fator de crescimento endotelial vascular. VEGFR-1: receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1. VEGFR-2: receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2. Fonte: adaptado de Cai et al. (2006) (49).

Os modelos animais são fundamentais para a compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos da HDC e suas complicações, além de possibilitarem a avaliação de possíveis tratamentos pré e pós-natais.

Existem diferentes modelos experimentais para o estudo da HDC, sendo que os mais utilizados são o toxicológico e o cirúrgico. O modelo cirúrgico, no qual a HDC é criada mediante toracotomia e incisão do diafragma fetal, é mais amplamente reproduzido em animais de porte maior, como ovelhas e coelhos. É um modelo que fornece menor arsenal de produtos para biologia molecular, mais usado para estudar terapias de intervenção fetal, e com a desvantagem de simular apenas o segundo insulto (*hit*) (70). O modelo toxicológico é o mais comumente estudado. Nele, a HDC é induzida em roedores pelo nitrofen (2,4-diclorofenil-p-nitrofenil éter), um herbicida com propriedades teratogênicas que, quando aplicado no dia gestacional (DG) 9,5, induz HDC em 40% a 70% dos fetos por interferir com a via do ácido retinoico (15,16,51,56,66,70,71).

As vantagens do modelo toxicológico em ratos são o curto período gestacional (22 dias), o maior número de prole, a simulação dos dois insultos (*hits*), além do fornecimento de grande arsenal de produtos para biologia molecular (70).

Em 2014, o Laboratório de Cirurgia Fetal Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto padronizou a técnica de ventilação mecânica controlada a volume e ciclada a tempo em neonatos de ratos (72), um modelo mais facilmente reproduzível do que os previamente descritos (73,74). No ano seguinte, Gallindo et al. (2015) ventilaram neonatos de ratos com HDC por 30 minutos e encontraram redução da espessura da camada média (ou seja, vasodilatação), maior expressão de eNOS e VEGFR-1, e menor expressão de VEGFR-2 nos neonatos ventilados quando comparados com os não ventilados (75).

De acordo com Quinn (2005), 30 minutos da vida de um neonato de rato corresponde a cerca de 13 horas de vida de um recém-nascido humano; 60 minutos do neonato de rato corresponde a cerca de 26 horas do recém-nascido humano; e 90 minutos do rato, a 40 horas do humano (76). Diante disso, a limitação do trabalho previamente realizado foi em relação ao tempo de ventilação, que pode não ter reproduzido o momento exato do desenvolvimento da HP, que geralmente se instala após as primeiras 12 - 24 horas de vida do neonato humano.

Optamos, então, por estudar um período de ventilação mais prolongado (até 90 minutos), com o intuito de investigar o período de lua de mel, já que a compreensão dessas alterações da vasculatura pulmonar associadas à ventilação mecânica, e da sua relação com marcadores que desencadeiam as alterações da camada média das artérias (eNOS, VEGF e receptores), pode trazer subsídios quanto à resposta da instabilidade no território pulmonar e ajudar a estabelecer um melhor manejo dos portadores de HDC (28).

A hipótese deste estudo foi de que a alteração da sinalização nos portadores de HDC, mediada pelo VEGF, por seus receptores e pela eNOS, leva à adaptação errática da circulação pulmonar neonatal, que resulta em HP e se torna evidente após o período de lua de mel.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos, a HDC mantém elevada morbimortalidade e constitui grande desafio terapêutico (5,77,78), e o desfecho desses pacientes está diretamente ligado à hipoplasia e à HP (77). Um tratamento eficaz e direcionado ao manejo da HP teria um impacto enorme na melhora do manejo da HDC (11). Nesse contexto, modelos animais são fundamentais para o entendimento das alterações que ocorrem na HDC e culminam na HP, já que entender como o processo patológico se inicia e se mantém são passos essenciais à elaboração de terapias baseadas em evidência e, consequentemente, para que se possa oferecer uma melhor assistência perinatal.

Portanto, estudar as alterações ocasionadas pelo período crítico da ventilação pulmonar em modelos animais com HDC, mimetizando o ambiente clínico no qual se instala a HP, pode ajudar na compreensão do período de lua de mel e colaborar no desenvolvimento de terapias mais adequadas e de menor custo.

A hipótese desta pesquisa é de que há um defeito na expressão e sinalização da via VEGF-NO nos portadores de HDC, que resulta em alteração na reatividade vascular e culmina na HP observada ao fim do período de lua de mel.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar as alterações morfológicas e bioquímicas após diferentes períodos de ventilação e suas possíveis implicações do remodelamento vascular no período de lua de mel em neonatos de ratos com HDC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a biometria de ratos recém-nascidos saudáveis e com HDC induzida por nitrofen;
- b) Analisar o parênquima pulmonar em neonatos de ratos saudáveis e com HDC imediatamente após o nascimento e após ventilação por 30, 60 e 90 minutos;
- c) Verificar a ocorrência o período de lua de mel (*honeymoon*) no modelo experimental de HDC em ratos;
- d) Comparar a expressão pulmonar de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS em neonatos de ratos saudáveis e com HDC imediatamente após o nascimento e após ventilação por 30, 60 e 90 minutos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

4.1.1 Avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo número 088/2017 (Apêndice X, página 148)

4.1.2 Animais e obtenção das fêmeas prenhes

Ratos Sprague Dawley adultos (fêmeas com peso em torno de 250 g e machos, 350 g), obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas, foram mantidos em gaiolas padrão (41 x 34 x 16 cm) com água e ração *ad libitum*, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro), temperatura (média de 23 °C) e umidade do ar (média de 55%). Os machos foram mantidos em gaiolas individuais e as fêmeas, em gaiolas contendo de quatro a cinco ratas.

Os ratos foram submetidos ao acasalamento, colocando-se uma ou duas fêmeas nas gaiolas individuais dos machos durante o período noturno. Após confirmação do acasalamento por visualização de espermatozoides no esfregaço vaginal na manhã seguinte (Figura 2), determinou-se o dia zero da gestação, e a rata prenhe foi separada das demais, permanecendo em caixa individual até a coleta das amostras.

Figura 2 - Esfregaço vaginal e confirmação da prenhez

A: realização do esfregaço vaginal na manhã seguinte ao acasalamento noturno, utilizando cotonete embebido em água morna. B: confecção do esfregaço em lâmina de microscopia ótica. C: visualização de espermatozoides à microscopia ótica, aumento 20 x, barra de escala 50 μm. Seta azul: células epiteliais características da fase estro das ratas (fase reprodutiva); seta laranja: espermatozoide; seta roxa: cabeça de espermatozoide. Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.3 Indução da hérnia diafragmática congênita

As ratas cujos neonatos foram destinados aos grupos com HDC foram expostas a 100 mg de nitrofen (2,4-diclorofenil-p-nitrofenil éter, Maybridge, Cambridge, Reino Unido), diluído em 1 ml de azeite de oliva e administrado por gavagem no DG 9,5, conforme descrito por Kluth et al. (1990) (79).

Os fetos expostos ao nitrofen que desenvolveram HDC direita ou bilateral, e aqueles que não desenvolveram HDC foram excluídos do projeto.

4.1.4 Coleta das amostras

No DG 21,5 (termo: 22 dias), as ratas foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de 175 mg/kg de quetamina (Ketamina Agener® 50 mg/ml – União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) associada a 2,5 mg/kg de xilazina (Dopaser® 20 mg/ml – Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha) aplicadas na musculatura lateral da coxa.

Esses medicamentos mantiveram os animais sob anestesia durante um período de cerca de três horas. Nos casos em que houve superficialização do plano anestésico, um repique de 0,1 mL de quetamina foi feito via peritoneal.

As ratas foram mantidas em mesa térmica (Harvard Apparatus Ltd., Kent, Reino Unido) com temperatura de 37 °C, onde foram submetidas à laparotomia mediana com exposição dos cornos fetais sob técnica asséptica, e os fetos foram coletados individualmente (Figura 3). Após o término da coleta, as ratas foram sacrificadas por exsanguinação (secção da aorta e da cava inferior).

Figura 3 - Coleta das amostras

A: laparotomia mediana realizada em mesa térmica a 37 °C para coleta dos neonatos. B: exposição dos cornos uterinos contendo os fetos no dia gestacional 21,5. Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.5 Formação dos grupos experimentais

Os recém-nascidos foram separados em cinco grupos, conforme ilustrado na Figura 4:

- a) Controle (C): filhotes de ratas não expostas ao nitrofen, sacrificados imediatamente após o nascimento (n=7);
- b) Controle respirando (CR): neonatos de ratas não expostas ao nitrofen, mantidos em ventilação espontânea, divididos em subgrupos temporais de 30 minutos (CR30), 60 minutos (CR60) e 90 minutos (CR90), com n=8 em cada subgrupo (total do grupo: n=24);
- c) Controle ventilado (CV): recém-nascidos de ratas não expostas ao nitrofen, submetidos à ventilação mecânica, divididos em subgrupos temporais de 30 minutos (CV30), 60 minutos (CV60) e 90 minutos (CV90), com n=7 em cada subgrupo (total do grupo: n=21);

- d) Hérnia diafragmática congênita (HDC): neonatos com HDC esquerda, sacrificados imediatamente após o nascimento (n=7);
- e) Hérnia diafragmática congênita ventilado (HDCV): recém-nascidos com HDC esquerda submetidos à ventilação mecânica, divididos em subgrupos temporais de 30 minutos (HDCV30), 60 minutos (HDCV60) e 90 minutos (HDCV90), com n=7 em cada subgrupo (total do grupo: n=21).

O intuito inicial do projeto era constituir também o grupo hérnia diafragmática congênita respirando. Contudo, durante a realização do piloto, os autores evidenciaram que esses neonatos não sobreviviam mais do que poucos minutos sob ventilação espontânea.

Figura 4 - Formação dos grupos experimentais

C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. Fonte: elaborada pelo autor.

Em relação aos tempos ventilatórios, 30 minutos da vida de um neonato de rato corresponde a cerca de 13 horas de vida de um recém-nascido humano; 60 minutos do neonato de rato corresponde a cerca de 26 horas do recém-nascido humano; e 90 minutos do rato, a 40 horas do humano (76). Esses períodos foram assim determinados para se estudar o momento crítico da adaptação da circulação fetal para a neonatal, que acontece nas primeiras 24 horas de vida do recém-nascido humano (40).

4.1.6 Grupos de ventilação espontânea

Os neonatos dos grupos CR foram mantidos em mesa térmica a 37 °C durante a ventilação espontânea, com cateter de oxigênio com fluxo de 2 L/min. Eles necessitaram de estímulo para manter a ventilação, que foi feito com cotonete embebido em soro fisiológico morno.

4.1.7 Grupos de ventilação mecânica

Para os filhotes de mães expostas ao nitrofen, na tentativa de identificar previamente à traqueostomia quais haviam desenvolvido HDC esquerda, uma transiluminação torácica foi realizada (Figura 5) (80).

Figura 5 - Transiluminação para diagnóstico de HDC

A: neonato sem HDC à transiluminação torácica. B: silhueta cardíaca e diafragma delineados à transiluminação em neonato sem HDC. C: neonato com HDC esquerda à transiluminação torácica. D: silhueta cardíaca e conteúdo abdominal evidenciado no tórax, sem delineamento do diafragma, em neonato com HDC. HDC: hérnia diafragmática congênita. Fonte: elaborada pelo autor.

Após ter sido anestesiado, colocado em mesa térmica a 37 °C e fixado com fita crepe em decúbito dorsal com coxim cervical, o neonato foi submetido à cervicotomia mediana com o auxílio de um microscópio com aumento de 12,5 vezes (microscópio MC-M3101XY – DF Vasconcellos Ltda., São Paulo, Brasil). Após isolamento da traqueia e secção da mesma em sua face anterior ao nível da cartilagem cricoide, foi realizada canulação com cateter Vialon® 24 G (BD Insyte Autoguard – Becton Dickinson Infusion Therapy System Inc., Sandy, Utah, Estados Unidos da América), conforme a Figura 6.

Figura 6 - Traqueostomia nos grupos de ventilação mecânica

A: microscópio utilizado para realização da traqueostomia. B: cervicotomia mediana. C: ressecção do coxim subcutâneo cervical. D: secção da musculatura pré-traqueal. E: aspecto da traqueia após dissecação. F: traqueia canulada com cateter 24 G. Fonte: elaborada pelo autor.

O cateter foi conectado à extremidade de um equipo de soro (Intrafix® Primeline AIR IL SLIP – Laboratórios B. Braun S.A., São Gonçalo, Rio de Janeiro, Brasil) para melhor conexão ao ventilador (MiniVent 845, Harvard Apparatus®, Hugo-Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Alemanha). Para dificultar a perda da via aérea, as conexões entre o ventilador e o cateter de traqueostomia foram fixadas à mesa térmica com massa de modelar (Figura 7).

Figura 7 - Ventilação mecânica

A: Ventilador utilizado no projeto. B: Conexão entre o ventilador e o cateter de traqueostomia, com extremidade do equipo de soro interposta, fixados em mesa térmica com massa de modelar. C: Circuito utilizado na ventilação mecânica. Fonte: elaborada pelo autor.

A ventilação mecânica foi controlada a volume e ciclada a tempo com frequência de 80 ciclagens/minuto, fração inspirada de oxigênio (FiO_2) 100%, relação inspiração-expiração de 1:1, pressão positiva expiratória final (PEEP - *positive end-expiratory pressure*) de 0 cmH_2O e volume corrente de 13,5 ml/kg (50 μL nos grupos HDC e 75 μL nos grupos controle), conforme padrões previamente estabelecidos por Gallindo et al. (2014) (66). Após a

confirmação de que o movimento da caixa torácica do neonato era satisfatório, a ventilação teve duração de acordo com o grupo ao qual pertencia.

4.2 AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA

Todos os neonatos foram pesados em balança de precisão, modelo APX-200 (Denver Instruments, Denver, Colorado, Estados Unidos da América), e incluídos na análise biométrica.

Após a quantificação do peso corporal (PC) nos grupos não ventilados e após a ventilação nos demais grupos, os neonatos foram sacrificados por decapitação sob anestesia. Em seguida, os troncos foram fixados com alfinetes em uma mesa de cortiça para dissecação, e a HDC foi confirmada nos grupos expostos ao nitrofen, conforme a Figura 8. Os pulmões foram dissecados e pesados: peso do pulmão esquerdo (PPE) e peso pulmonar total (PPT). Para retirar a influência do PC sobre o PPE e o PPT, foram calculadas as razões PPE/PC e PPT/PC.

Figura 8 – Confirmação da HDC

HDC esquerda confirmada durante a coleta das amostras. HDC: hérnia diafragmática congênita. Fonte: elaborada pelo autor.

4.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Após a avaliação biométrica, n=4 neonatos por grupo foram encaminhados para análise histológica. As amostras foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 a 48 horas, desidratadas em álcool (gradiente crescente de etanol, 70%, 80%, 90% e 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Utilizando micrótomo Leica (modelo RM 2145, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha), foram obtidos cortes axiais do tecido pulmonar de 4 µm de espessura, coletados em lâminas histológicas. Os cortes foram corados por tricrômio de Masson e as lâminas foram recobertas por lamínulas montadas com Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvânia, Estados Unidos da América).

As lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Melville, Nova Iorque, Estados Unidos da América) com aumento de 40 vezes. As imagens foram capturadas utilizando o programa NIS-Elements (Nikon Corporation, Tochigi, Japão) e convertidas em um documento JPEG.

4.3.1 Avaliação histológica do parênquima pulmonar

Para a análise histológica do parênquima pulmonar, as imagens foram processadas utilizando o programa Fiji ImageJ (versão 2.0.0-rc-67/1.52d, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos da América) conforme descrito por Sun et al. (2015) (81). Inicialmente, o dimensionamento das imagens foi definido globalmente com o comando *Analyze - Set Scale*. Para medir a área total das imagens, elas foram submetidas à função de limiar de cor usando o *Image - Adjust - Color Threshold - HSB color space*: saturação e matiz fixados em 0-225, e brilho fixado em 254-255 (Figura 9B). A medida da área total foi obtida, então, pelas funções *Select - Analyze - Measure*, e os valores foram armazenados em um banco de dados no programa Excel (versão 14.7.3, Microsoft Corporation, Washington, Estados Unidos da América).

Para medir a área ocupada pelo parênquima pulmonar, as fotos foram submetidas às mesmas funções, mas com brilho ajustado até que toda a imagem correspondente aos septos alveolares ficasse vermelha (Figura 9C). Os valores foram armazenados no mesmo banco de dados, e a fração de espaço aéreo foi obtida pela subtração área total da imagem menos área ocupada pelos septos alveolares, dividido pela área total da imagem (82). Foram analisados dez campos por neonato, e a média dessas medidas foi considerada como o valor para cada neonato.

Figura 9 - Avaliação histológica do parênquima pulmonar

A: imagem de parênquima pulmonar corada por tricrômio de Masson, aumento 40 x, barra de escala 50 µm. B: processamento da imagem pelo Fiji ImageJ, com brilho fixado em 254-255 para medida da área total da imagem. C: processamento da imagem pelo Fiji ImageJ, com brilho ajustado para medida dos septos alveolares. Fonte: elaborada pelo autor.

4.3.2 Avaliação histológica da vasculatura pulmonar

Para análise da vasculatura pulmonar, artérias de diâmetro entre 30 e 60 µm foram fotografadas, e dez vasos foram registrados para cada animal.

Utilizando-se o programa Fiji ImageJ (versão 2.0.0-rc-67/1.52d, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos da América), foram medidos o menor diâmetro externo (DE) e menor diâmetro interno (DI), conforme a Figura 10. Os dados foram armazenados em um banco de dados no programa Excel (versão 14.7.3, Microsoft Corporation, Washington, Estados Unidos da América), e a espessura da camada média (ECM) foi calculada pela fórmula: $ECM = (DE - DI) / DE$ (83,84).

Figura 10 - Medidas usadas para o cálculo da espessura da camada média

DE: diâmetro externo. DI: diâmetro interno. Fonte: adaptado de Hosoda (1994) (83).

A média da ECM pela histologia das dez artérias de cada animal foi calculada e o resultado foi considerado como o valor para aquele neonato.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imuno-histoquímica (IHQ) foi utilizada para localizar as proteínas no tecido pulmonar. As amostras de $n=4$ neonatos, que estavam incluídas em blocos de parafina histológica, foram identificadas. Dos blocos, foram obtidos cilindros de 3 mm de diâmetro, que foram transferidos para o bloco receptor para arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA - *tissue microarray*).

Foram obtidos cortes axiais do tecido pulmonar de 4 μm de espessura utilizando micrótomo Leica (modelo RM 2145, Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha), que foram coletados em lâminas histológicas (pré-silanizadas), desparafinizadas em xilol e hidratadas em uma série de etanois. Os cortes foram tratados em peróxido de hidrogênio a 30% e em tampão fosfato salino (PBS - *phosphate buffer saline*) por 10 minutos em temperatura ambiente, seguidos de tampão citrato de sódio para recuperação antigênica e, subsequentemente, lavados em PBS.

As lâminas foram, então, incubadas em solução de bloqueio de soro de cabra a 10% diluída em PBS por 30 minutos para bloquear sítios de ligação não específica. A depender da

proteína estudada, os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários: anti-VEGFR-1 de coelho 1:50 (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, Estados Unidos da América), anti-VEGFR-2 de camundongo 1:50 (sc-316, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, Estados Unidos da América), anti-actina de músculo liso (SMA, *smooth muscle actin*) 1:200 (clone 1A4, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, Estados Unidos da América) ou anti-eNOS de coelho 1:100 (sc-654, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, Estados Unidos da América) em 1% albumina sérica bovina (BSA – *bovine serum albumin*) a 4 °C durante a noite.

Após lavagem, os cortes foram incubados em anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase de rábano (HRP - *horseradish peroxidase*) 1:100 (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, Estados Unidos da América) em 1% BSA ou anti-coelho conjugado com HRP 1:200 (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, Estados Unidos da América) em 1% BSA por duas horas. Como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário.

Para visualização da reação da histoquímica foram utilizados *kit* Vectastain ABC (Vector Labs, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos da América) e DAB (3,3'-diaminobenzidino-tetra-hidrocloreto, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos da América).

Por fim, as lâminas foram submetidas à contra coloração com hematoxilina de Harris, desidratadas por uma série de banhos de álcool e xilol, e recobertas por laminulas montadas com Permount.

As lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Melville, Nova Iorque, Estados Unidos da América) com aumento de 40 vezes. As imagens foram capturadas utilizando o programa NIS-Elements (Nikon Corporation, Tochigi, Japão) e convertidas em um documento JPEG.

4.4.1 Avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar

Para análise IHQ da vasculatura pulmonar, artérias de diâmetro entre 30 e 60 µm foram fotografadas, e dez vasos foram registrados para cada animal.

Utilizando-se o programa Fiji ImageJ (versão 2.0.0-rc-67/1.52d, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos da América), foram medidos o menor DE e o menor DI, conforme a Figura 10. Os dados foram armazenados em um banco de dados no programa Excel (versão 14.7.3, Microsoft Corporation, Washington, Estados Unidos da

América), e a ECM pela IHQ (ECM-IHQ) foi calculada pela mesma fórmula da ECM pela histologia: $ECM-IHQ = (DE - DI) / DE$.

A média da ECM-IHQ das dez artérias de cada animal foi calculada e o resultado foi considerado como o valor para aquele neonato.

4.4.2 Avaliação imuno-histoquímica da expressão de VEGFR-1/2 e eNOS

A análise IHQ dos VEGFR-1/2 e da eNOS foram feitas baseadas nos princípios da estereologia, utilizando retículo contendo 50 linhas dispostas simetricamente em dez fileiras de cinco linhas cada (retículo de Weibel de 50 *hits*, Figura 11) (85).

Figura 11 - Retículo de Weibel

Retículo contendo 50 linhas dispostas simetricamente em dez fileiras de cinco linhas cada (retículo de Weibel de 50 *hits*). Fonte: adaptado de Weibel e Scherle (1966) (85).

Para cada lâmina estudada, foram fotografados 10 campos aleatórios, e o cálculo foi feito pela contagem do número de vezes que as linhas do retículo cruzaram o parênquima marcado pela IHQ, e o resultado foi dividido pelo número de linhas do retículo (86).

4.5 WESTERN BLOTTING

Para a análise por *western blotting* (WB), 3-4 amostras de pulmão esquerdo foram homogeneizadas em 1 ml/órgão de tampão de extração de proteínas. Os extratos proteicos de cada amostra foram centrifugados durante 30 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a proteína total foi quantificada pelo método de Bradford. Após quantificação, 50 µg de proteína foram diluídos em tampão de Laemmli e incubados a 95 °C por 10 minutos para realização da eletroforese em gel de poliacrilamina 10%. Tampão de Laemmli: glicerol 50%, Tris 312,5 mM, ditiotreitol 250 mM, duodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, azul de bromofenol 0,02% e água milli-Q (pH 6,8). A composição do tampão de corrida empregada para a corrida eletroforética foi 100 ml tampão 10x Tris/Glicina/SDS, 900 ml água milli-Q, 250 mM Tris, 1,92 mM glicina e 0,1% SDS ajustado para pH 8,3. A separação eletroforética das proteínas foi realizada com uma intensidade de corrente constante (100 V), durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas por corrente elétrica para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência a 90 V por 1 hora e 30 minutos a 4 °C. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi: 100 ml tampão 10x Tris/glicina, 200 ml metanol 20% e 700 ml água milli-Q (pH: 8,3 – 9,3).

Para confirmação da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau (para 100 ml: 200 mg de Ponceau e 1 ml de ácido acético, completando com água milli-Q) por 5 minutos. Após, o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário foi realizado por incubação da membrana em tampão de bloqueio Intercept® (#927-70001, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nevada, Estados Unidos da América) sob agitação constante durante 1 hora em temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas *overnight* a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: VEGF 1:1000 (ab1316, Abcam, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos da América), VEGFR-1 1:1000 (Ptglab #13687-1-AP, Proteintech Group Inc., Rosemont, Illinois, Estados Unidos da América), VEGFR-2 1:1000 (Cell Signal #9698S, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, Estados Unidos da América) ou eNOS 1:2000 (ab76198, Abcam, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos da América), e β -actina 1:10000 (ab8226, Abcam, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos da América), diluídos em tampão de bloqueio Intercept® (#927-70001, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nevada, Estados Unidos da América). Após o término da incubação, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T 1x (1000 ml tampão TBS – salina tamponada com Tris - 1x com adição de 1 ml de Tween 20 0,1%) e incubadas com anticorpo secundário IRDye 680RD anti-

coelho 1:10000 (#925-68071, Li-Cor Biosciences, Lincoln Nevada, Estados Unidos da América) ou IRDye[®] 800CW anti-rato 1:10000 (#926-32212, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nevada, Estados Unidos da América) diluídos em tampão de bloqueio Intercept[®] (#927-70001, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nevada, Estados Unidos da América) por 1 hora em temperatura ambiente. A revelação das membranas foi realizada no aparelho Licor Odyssey CLX Odyssey CLX Imaging System (LI-COR Corporate, Lincoln, Nevada, Estados Unidos da América) e analisadas por meio do programa Image Studio Lite (versão 5.2, LI-COR Inc., Lincoln, Nevada, Estados Unidos da América). A expressão dos anticorpos foi normalizada por meio de proteína controle (β -actina, ab8226, Abcam, Burlingame, Califórnia, Estados Unidos da América).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos por meio das pesagens, mensurações do parênquima e da vasculatura pulmonar, da IHQ e do WB foram avaliados pelo método de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey e expressos em média, mediana e desvio padrão (DP). As comparações foram feitas intragrupo (C vs. CR; C vs. CV; HDC vs. HDCV) e intergrupo (C vs. HDC; CR vs. CV; CR vs. HDCV; CV vs. HDCV). Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$. Os cálculos foram feitos usando o GraphPad Prism versão 8.4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA).

4.7 DESENHO DO ESTUDO

O desenho do estudo pode ser visualizado na Figura 12.

Figura 12 - Desenho do estudo

C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. DG: dia gestacional. IHQ: imuno-histoquímica. WB: *western blotting*. Fonte: elaborada pelo autor.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletados sete a oito neonatos por grupo, totalizando 80 recém-nascidos incluídos no projeto. Para tanto, foram necessárias 38 ratas adultas, sendo que 22 foram expostas ao nitrofen e gestaram 195 filhotes. Os motivos das exclusões estão listados na Tabela 1. Os filhotes de duas ratas expostas ao nitrofen não foram contabilizados: uma não tinha nenhum filhote com HDC e todos os filhotes da outra tiveram morte intra-útero.

Tabela 1 - Neonatos excluídos do projeto cujas mães foram expostas ao nitrofen

Motivo da exclusão	n
Ausência de hérnia diafragmática	68
Óbito durante ventilação mecânica	28
Material permaneceu em formalina por mais de 48 horas	17
Falha na traqueostomia	14
Pneumotórax durante a ventilação mecânica	10
Óbito intra-útero	10
Hérnia diafragmática direita	8
Óbito materno antes do término da coleta	7
Hérnia diafragmática bilateral	4
Falso negativo na transiluminação	1

As 16 ratas não expostas ao nitrofen gestaram 143 filhotes. Os motivos das exclusões estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Neonatos excluídos do projeto cujas mães não foram expostas ao nitrofen (mães dos grupos controle)

Motivo da exclusão	n
Óbito durante a ventilação espontânea	47
Óbito materno antes do término da coleta	23
Material permaneceu em formalina por mais de 48 horas	13
Pneumotórax durante a ventilação mecânica	4
Óbito durante a ventilação mecânica	4

5.2 AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA

A média, a mediana e o DP das variáveis PC, PPE, PPT, razão PPE/PC e razão PPT/PC de cada grupo são mostrados na Tabela 3 (Apêndice A, página 108) e nos Gráficos 1 a 5.

Gráfico 1 - Avaliação do peso corporal, contendo média e desvio padrão de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos.

Gráfico 2 - Avaliação do peso do pulmão esquerdo (PPE), contendo média e desvio padrão de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos.

Gráfico 3 - Avaliação do peso pulmonar total (PPT), contendo média e desvio padrão de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos.

Gráfico 4 - Razão peso do pulmão esquerdo (PPE) / peso corporal (PC), contendo média e desvio padrão de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos.

Gráfico 5 - Razão peso pulmonar total (PPT) / peso corporal (PC), contendo média e desvio padrão de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos.

Não houve diferença estatística do PC, PPE, PPT, PPE/PC e PPT/PC entre os grupos controle (C, CR30, CR60, CR90, CV30, CV60 e CV90), nem entre os grupos com HDC (HDC, HDCV30, HDCV60 e HDCV90), mas houve diferença de todos os grupos controle quando comparados a todos os grupos com HDC, conforme mostrado na Tabela 4 (Apêndice B, página 109).

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Para a análise histológica, foram incluídos n=4 neonatos por grupo, sendo que 10 campos (fotos) foram analisados por neonato.

5.3.1 Avaliação histológica do parênquima pulmonar

Uma imagem representativa das fotos obtidas de cada grupo para análise histológica do parênquima pulmonar é apresentada na Figura 13.

Figura 13 – Análise histológica do parênquima pulmonar

Coloração: tricrômio de Masson. Aumento 40 x. Barra de escala 50 µm. CR: controle respirando. CV: controle ventilado. HDC: hérnia diafragmática congênita. A imagem em tons de cinza é repetida (CR=CV), já que, ao nascimento, o controle é o mesmo para os grupos respirando e ventilado. Fonte: elaborada pelo autor.

A média, a mediana e o DP da fração de espaço aéreo de cada grupo são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação histológica do parênquima pulmonar: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da fração de espaço aéreo de acordo com o grupo experimental

Grupo	Fração de espaço aéreo média - mediana ($\pm$DP) (n=4)
C	0,449 – 0,445($\pm$ 0,044)
CR30	0,485 – 0,486 ($\pm$ 0,045)
CR60	0,503 – 0,519 ($\pm$ 0,048)
CR90	0,517 – 0,515 ($\pm$ 0,032)
CV30	0,415 – 0,414 ($\pm$ 0,022)
CV60	0,366 – 0,348 ($\pm$ 0,038)
CV90	0,398 – 0,399 ($\pm$ 0,014)
HDC	0,242 – 0,241 ($\pm$ 0,039)
HDCV30	0,416 – 0,417 ($\pm$ 0,058)
HDCV60	0,403 – 0,419 ($\pm$ 0,060)
HDCV90	0,381 – 0,381 ($\pm$ 0,018)

O Gráfico 6 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da fração de espaço aéreo intragrupo.

Gráfico 6 - Avaliação histológica do parênquima pulmonar, contendo média e desvio padrão da fração de espaço aéreo de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos.

A comparação da fração de espaço aéreo entre os grupos consta na Tabela 6 (Apêndice C, página 111).

O grupo HDC apresentou a menor fração de espaço aéreo, com diferença estatisticamente significativa em relação a todos os demais grupos.

Não houve diferença da fração de espaço aéreo entre todos os grupos ventilados mecanicamente (CV30, CV60, CV90, HDCV30, HDCV60 e HDCV90).

Na comparação intergrupo, o grupo CR30 apresentou fração de espaço aéreo maior que os grupos CV60 e HDCV90. Já o grupo CR60 teve fração de espaço aéreo maior que os grupos CV60, CV90, HDCV60 e HDCV90. A fração de espaço aéreo do grupo CR90 foi maior do que todos os grupos ventilados mecanicamente (CV30, CV60, CV90, HDCV30, HDCV60 e HDCV90).

5.3.2 Avaliação histológica da vasculatura pulmonar

Uma imagem representativa das fotos obtidas de cada grupo para análise histológica da vasculatura pulmonar é apresentada na Figura 14.

Figura 14 – Análise histológica da vasculatura pulmonar

Artérias pulmonares com diâmetro externo entre 30 e 60 µm. Coloração: tricrômio de Masson. Aumento 40 x. Barra de escala 50 µm. CR: controle respirando. CV: controle ventilado. HDC: hérnia diafragmática congênita. A imagem em tons de cinza é repetida (CR=CV), já que, ao nascimento, o controle é o mesmo para os grupos respirando e ventilado. Fonte: elaborada pelo autor.

A média, a mediana e o DP da ECM são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Avaliação histológica da vasculatura pulmonar: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da espessura da camada média de acordo com o grupo experimental

Grupo	ECM
	média - mediana ($\pm$DP)
	(n=4)
C	0,297 – 0,298 ($\pm$ 0,003)
CR30	0,307 – 0,307 ($\pm$ 0,006)
CR60	0,272 – 0,271 ($\pm$ 0,007)
CR90	0,263 – 0,262 ($\pm$ 0,004)
CV30	0,280 – 0,280 ($\pm$ 0,010)
CV60	0,241 – 0,242 ($\pm$ 0,007)
CV90	0,226 – 0,226 ($\pm$ 0,010)
HDC	0,482 – 0,483 ($\pm$ 0,003)
HDCV30	0,347 – 0,344 ($\pm$ 0,008)
HDCV60	0,440 – 0,439 ($\pm$ 0,006)
HDCV90	0,521 – 0,520 ($\pm$ 0,017)

O Gráfico 7 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da ECM intragrupo.

Gráfico 7 - Avaliação histológica da vasculatura pulmonar, contendo média e desvio padrão da espessura da camada média de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos.

A comparação da ECM entre os grupos consta na Tabela 8 (Apêndice D, página 112).

Não houve diferença estatisticamente significativa da ECM entre o grupo C e os grupos CR30 e CV30, entre o grupo CR60 e os grupos CR90 e CV30, entre o grupo CV30 e o grupo CR90, e entre o grupo CV60 e o grupo CV90. Entre todos os demais grupos, houve diferença significativa dos valores da ECM.

Considerando os grupos controle, houve redução da ECM com o aumento do tempo de ventilação, sendo estatisticamente significativa entre 30 e 60 minutos, e sem diferença estatística entre 60 e 90 minutos.

Já nos grupos com hérnia, houve redução da ECM com 30 minutos de ventilação mecânica, porém com aumento progressivo após esse período (60 e 90 minutos).

5.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA VASCULATURA PULMONAR

Para a análise IHQ, foram incluídos $n=4$ neonatos por grupo, sendo que dez vasos foram analisados por neonato. A média da ECM-IHQ desses dez vasos foi considerada como a ECM-IHQ de cada neonato.

Uma imagem representativa das fotos obtidas de cada grupo para análise IHQ da vasculatura pulmonar é apresentada na Figura 15.

Figura 15 – Análise imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar

Artérias pulmonares com diâmetro externo entre 30 e 60 µm (imuno-histoquímica). Aumento 40 x. Barra de escala 50 µm. CR: controle respirando. CV: controle ventilado. HDC: hérnia diafragmática congênita. A imagem em tons de cinza (CR=CV), já que, ao nascimento, o controle é o mesmo para os grupos respirando e ventilado. Fonte: elaborada pelo autor.

A média, a mediana e o DP da ECM-IHQ são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da espessura da camada média de acordo com o grupo experimental

Grupo	ECM-IHQ
	média - mediana ($\pm$ DP)
	(n=4)
C	0,392 – 0,394 ($\pm$ 0,007)
CR30	0,409 - 0,409 ($\pm$ 0,001)
CR60	0,381 – 0,379 ($\pm$ 0,004)
CR90	0,361 – 0,361 ($\pm$ 0,001)
CV30	0,376 – 0,376 ($\pm$ 0,001)
CV60	0,344 – 0,344 ($\pm$ 0,003)
CV90	0,330 – 0,331 ($\pm$ 0,007)
HDC	0,554 – 0,553 ($\pm$ 0,003)
HDCV30	0,451 – 0,451 ($\pm$ 0,001)
HDCV60	0,505 – 0,505 ($\pm$ 0,003)
HDCV90	0,582 – 0,582 ($\pm$ 0,001)

O Gráfico 8 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da ECM-IHQ intragrupo.

Gráfico 8 - Avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar, contendo média e desvio padrão da espessura da camada média de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. SMA: actina de músculo liso.

A comparação da ECM-IHQ entre os grupos consta na Tabela 10 (Apêndice E, página 113).

Todos os grupos, exceto CR60 e CV30, apresentaram diferença estatisticamente significativa da ECM- IHQ entre si.

Considerando os grupos controle, houve redução da ECM- IHQ com o aumento do tempo de ventilação.

Já nos grupos com hérnia, houve redução da ECM- IHQ com 30 minutos de ventilação mecânica (HDC vs. HDCV30), porém com aumento após esse período (HDCV60 e HDCV90).

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VEGF, VEGFR-1/2 E eNOS

Para a análise IHQ, foram incluídos n=4 neonatos por grupo. Já para a análise por WB, foram n=4 neonatos para os grupos de ventilação espontânea e n=3 para os demais grupos.

5.5.1 Avaliação da expressão de VEGF

5.5.1.1 Avaliação da expressão imuno-histoquímica de VEGF

Uma imagem representativa das fotos obtidas de cada grupo para análise IHQ da expressão de VEGF é apresentada na Figura 16.

Figura 16 – Expressão imuno-histoquímica de VEGF

Aumento 40 x. Barra de escala 50 μ m. CR: controle respirando. CV: controle ventilado. HDC: hérnia diafragmática congênita. A imagem em tons de cinza é repetida (CR=CV), já que, ao nascimento, o controle é o mesmo para os grupos respirando e ventilado. Fonte: elaborado pelo autor.

A média, a mediana e o DP da expressão IHQ de VEGF nos diferentes grupos são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Avaliação imuno-histoquímica de VEGF: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da expressão de VEGF de acordo com o grupo experimental

Grupo	VEGF
	média - mediana ($\pm$ DP)
	(n=4)
C	0,124 – 0,121 ($\pm$ 0,006)
CR30	0,120 – 0,118 ($\pm$ 0,005)
CR60	0,106 – 0,104 ($\pm$ 0,007)
CR90	0,124 – 0,120 ($\pm$ 0,007)
CV30	0,108 – 0,107 ($\pm$ 0,008)
CV60	0,118 – 0,117 ($\pm$ 0,006)
CV90	0,121 – 0,117 ($\pm$ 0,011)
HDC	0,118 – 0,118 ($\pm$ 0,008)
HDCV30	0,133 – 0,131 ($\pm$ 0,010)
HDCV60	0,119 – 0,121 ($\pm$ 0,007)
HDCV90	0,121 – 0,121 ($\pm$ 0,004)

O Gráfico 9 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da expressão IHQ de VEGF intragrupo.

Gráfico 9 – Avaliação imuno-histoquímica de VEGF, contendo média e desvio padrão da expressão de VEGF de cada grupo

C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

A comparação da expressão IHQ de VEGF entre os grupos consta na Tabela 12 (Apêndice F, na página 114).

O grupo HDCV30 apresentou expressão IHQ de VEGF maior que os grupos CR60 e CV30, com diferença estatisticamente significativa. Não houve diferença na expressão entre os demais grupos.

5.5.1.2 Avaliação da expressão de VEGF por *western blotting*

A média, a mediana e o DP da expressão de VEGF por WB nos diferentes grupos são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 – Avaliação por *western blotting* de VEGF: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da expressão de VEGF de acordo com o grupo experimental

Grupo	VEGF
	média - mediana ($\pm$ DP)
	(n=3-4)
C	19,953 – 17,430 ($\pm$ 5,070)
CR30	66,850 – 67,150 ($\pm$ 15,914)
CR60	59,925 – 52,800 ($\pm$ 26,783)
CR90	71,875 – 73,500 ($\pm$ 13,428)
CV30	26,990 – 31,950 ($\pm$ 11,409)
CV60	28,720 – 29,100 ($\pm$ 13,994)
CV90	26,450 – 26,370 ($\pm$ 4,691)
HDC	34,483 – 35,350 ($\pm$ 18,116)
HDCV30	103,363 – 103,320 ($\pm$ 8,325)
HDCV60	90,290 – 92,820 ($\pm$ 8,444)
HDCV90	28,210 – 28,210 ($\pm$ 5,346)

A Figura 17 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da expressão de VEGF por WB intragrupo.

Figura 17 - Avaliação de VEGF por *western blotting*, contendo média e desvio padrão da expressão de VEGF de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

A comparação da expressão de VEGF por WB entre os grupos consta na Tabela 14 (Apêndice G, página 115).

Na comparação intragrupo, houve aumento da expressão de VEGF a ventilação espontânea no grupo não exposto a nitrofen (C vs. CR30/CR60/CR90). Os portadores de HDC também apresentaram aumento da expressão com 30 minutos de ventilação mecânica (HDC vs. HDCV30), mas com redução com 90 minutos (HDCV60 vs. HDCV90).

Na comparação intergrupo, o grupo CR30 teve maior expressão de VEGF do que os grupos CV30 e CV90, e o grupo CR90 apresentou maior expressão do que os grupos controle ventilados mecanicamente (CV30, CV60 e CV90).

O grupo HDCV30 apresentou a maior expressão, que foi significativa em comparação com os grupos C, CR60, além de todos os grupos controle de ventilação mecânica (CV30, CV60, CV90). O grupo HDCV60 teve expressão de VEGF significativamente maior que os grupos C, CV30, CV60 e CV90.

5.5.2 Avaliação da expressão de VEGFR-2

5.5.2.1 Avaliação da expressão imuno-histoquímica de VEGFR-2

Uma imagem representativa das fotos obtidas de cada grupo para análise IHQ do VEGFR-2 é apresentada na Figura 18.

Figura 18 – Expressão imuno-histoquímica de VEGFR-2

Aumento 40 x. Barra de escala 50 μ m. CR: controle respirando. CV: controle ventilado. HDC: hérnia diafragmática congênita. A imagem em tons de cinza é repetida (CR=CV), já que, ao nascimento, o controle é o mesmo para os grupos respirando e ventilado. Fonte: elaborada pelo autor.

A média, a mediana e o DP da expressão IHQ de VEGFR-2 nos diferentes grupos são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15 - Avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-2: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da expressão de VEGFR-2 de acordo com o grupo experimental

Grupo	VEGFR-2
	média - mediana ($\pm$DP)
	(n=4)
C	0,163 – 0,162 ($\pm$ 0.014)
CR30	0,271 – 0,271 ($\pm$ 0.006)
CR60	0,240 – 0,239 ($\pm$ 0.006)
CR90	0,313 – 0,313 ($\pm$ 0.008)
CV30	0,230 – 0,231 ($\pm$ 0.003)
CV60	0,223 – 0,221 ($\pm$ 0.004)
CV90	0,214 – 0,214 ($\pm$ 0.004)
HDC	0,626 - 0,626 ($\pm$ 0.008)
HDCV30	0,370 – 0,369 ($\pm$ 0,004)
HDCV60	0,565 – 0,564 ($\pm$ 0,006)
HDCV90	0,579 – 0,579 ($\pm$ 0,003)

O Gráfico 10 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da expressão IHQ de VEGFR-2 intragrupo.

Gráfico 10 – Avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-2, contendo média e desvio padrão da expressão de VEGFR-2 de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. VEGFR-2: receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2.

A comparação da expressão IHQ de VEGFR-2 entre os grupos consta na Tabela 16 (Apêndice H, página 116).

Considerando os grupos de ventilação espontânea, houve aumento da expressão de VEGFR-2 com 30 minutos (C vs. CR30), redução com 60 minutos (CR30 vs. CR60) e aumento novamente com 90 minutos (CR60 vs. CR90).

No grupo controle de ventilação mecânica, houve aumento da expressão com 30 minutos (C vs. CV30), sem alteração com o progredir do tempo ventilatório (60 e 90 minutos).

Os grupos com HDC tiveram redução da expressão de VEGFR-2 com 30 minutos de ventilação (HDC vs. HDCV30), e aumento com 60 minutos (HDCV30 vs. HDCV60).

Na comparação intergrupo, houve diferença estatisticamente significativa da expressão entre todos os grupos, exceto entre CR60 e CV30.

5.5.2.2 Avaliação da expressão de VEGFR-2 por *western blotting*

A média, a mediana e o DP da expressão de VEGFR-2 por WB nos diferentes grupos são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 – Avaliação por *western blotting* de VEGFR-2: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da expressão de VEGFR-2 de acordo com o grupo experimental

Grupo	VEGFR-2
	média - mediana ($\pm$ DP)
	(n=3-4)
C	35,867 – 36,800 ($\pm$ 8,737)
CR30	52,825 – 57,350 ($\pm$ 10,449)
CR60	47,300 – 49,500 ($\pm$ 24,656)
CR90	92,125 – 92,900 ($\pm$ 14,272)
CV30	32,733 – 32,800 ($\pm$ 5,700)
CV60	28,300 – 31,400 ($\pm$ 8,202)
CV90	20,967 – 13,200 ($\pm$ 14,504)
HDC	59,183 – 71,040 ($\pm$ 27,634)
HDCV30	43,703 – 47,300 ($\pm$ 9,576)
HDCV60	64,447 – 65,060 ($\pm$ 21,557)
HDCV90	73,680 – 49,770 ($\pm$ 45,928)

A Figura 19 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da expressão de VEGFR-2 por WB intragrupo.

Figura 19 - Avaliação de VEGFR-2 por *western blotting*, contendo média e desvio padrão da expressão de VEGFR-2 de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. VEGFR-2: receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2.

A comparação da expressão de VEGFR-2 por WB entre os grupos consta na Tabela 18 (Apêndice I, página 117).

No grupo controle, houve aumento da expressão de VEGFR-2 com 90 minutos de ventilação espontânea (C vs. CR90).

Na comparação intergrupo, o grupo CR90 apresentou a maior expressão de VEGFR-2, que foi significativa na comparação com os grupos C, CV30, CV60 e CV90.

5.5.3 Avaliação da expressão de VEGFR-1

5.5.3.1 Avaliação da expressão imuno-histoquímica de VEGFR-1

Uma imagem representativa das fotos obtidas de cada grupo para análise IHQ da expressão de VEGFR-1 é apresentada na Figura 20.

Figura 20 – Expressão imuno-histoquímica de VEGFR-1

Aumento 40 x. Barra de escala 50 µm. CR: controle respirando. CV: controle ventilado. HDC: hérnia diafragmática congênita. A imagem em tons de cinza é repetida (CR=CV), já que, ao nascimento, o controle é o mesmo para os grupos respirando e ventilado. Fonte: elaborada pelo autor.

A média, a mediana e o DP da expressão IHQ de VEGFR-1 nos diferentes grupos são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19 - Avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-1: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da expressão de VEGFR-1 de acordo com o grupo experimental

Grupo	VEGFR-1
	média - mediana ($\pm$DP)
	(n=4)
C	0,466 – 0,471 ($\pm$ 0,040)
CR30	0,377 – 0,379 ($\pm$ 0,013)
CR60	0,363 – 0,358 ($\pm$ 0,011)
CR90	0,368 – 0,371 ($\pm$ 0,008)
CV30	0,564 – 0,569 ($\pm$ 0,011)
CV60	0,576 – 0,576 ($\pm$ 0,008)
CV90	0,524 - 0,524 ($\pm$ 0,009)
HDC	0,254- 0,254 ($\pm$ 0,011)
HDCV30	0,124 – 0,121 ($\pm$ 0.006)
HDCV60	0,212 – 0,213 ($\pm$ 0.011)
HDCV90	0,213 – 0,214 ($\pm$ 0.016)

O Gráfico 11 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da expressão IHQ de VEGFR-1 intragrupo.

Gráfico 11 – Avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-1, contendo média e desvio padrão da expressão de VEGFR-1 de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. VEGFR-1: receptor do crescimento endotelial vascular 1.

A comparação da expressão IHQ de VEGFR-1 entre os grupos consta na Tabela 20 (Apêndice J, página 118).

Nos grupos controles, houve redução significativa da expressão de VEGFR-1 com 30 minutos de ventilação espontânea (C vs. CR30), porém houve aumento da expressão com 30 minutos de ventilação mecânica (C vs. CV30), e redução com a continuidade dessa modalidade ventilatória (CV60 vs. CV90).

Nos grupos com HDC, a expressão desse receptor reduziu significativamente com 30 minutos de ventilação (HDC vs. HDCV30), e teve aumento com 60 minutos (HDCV30 vs. HDCV60).

Na comparação intergrupo, houve diferença estatisticamente significativa da expressão de VEGFR-1 entre todos os grupos.

5.5.3.2 Avaliação da expressão de VEGFR-1 por *western blotting*

A média, a mediana e o DP da expressão de VEGFR-2 por WB nos diferentes grupos são mostrados na Tabela 21.

Tabela 21 – Avaliação por *western blotting* de VEGFR-1: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da expressão de VEGFR-1 de acordo com o grupo experimental

Grupo	VEGFR-1
	média - mediana ($\pm$ DP)
	(n=3-4)
C	126,500 – 128,160 ($\pm$ 21,309)
CR30	71,150 – 76,050 ($\pm$ 18,205)
CR60	79,225 – 81,000 ($\pm$ 11,541)
CR90	80,700 – 77,450 ($\pm$ 8,990)
CV30	170,483 – 173,570 ($\pm$ 7,840)
CV60	182,977 – 155,930 ($\pm$ 65,044)
CV90	154,547 – 166,940 ($\pm$ 26,126)
HDC	83,203 – 92,840 ($\pm$ 24,265)
HDCV30	58,300 – 62,350 ($\pm$ 15,322)
HDCV60	71,940 – 69,350 ($\pm$ 9,241)
HDCV90	107,593 – 73,290 ($\pm$ 60,074)

A Figura 21 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da expressão de VEGFR-1 por WB intragrupo.

Figura 21 - Avaliação de VEGFR-1 por *western blotting*, contendo média e desvio padrão da expressão de VEGFR-1 de cada grupo

C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. VEGFR-1: receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1.

A comparação da expressão de VEGFR-1 por WB entre os grupos consta na Tabela 22 (Apêndice K, página 119).

Na análise intragrupo, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de VEGFR-1. Já na análise intergrupo, CV30 e CV60 tiveram maior expressão do receptor quando comparados aos grupos ventilados espontaneamente (CR30, CR60 e CR90) e aos grupos expostos ao nitrofen (HDC, HDCV30, HDCV60 e HDCV90). O grupo CV90 apresentou expressão de VEGFR-1 maior do que os grupos HDCV30 e HDCV60.

5.5.4 Avaliação da expressão de eNOS

5.5.4.1 Avaliação da expressão imuno-histoquímica de eNOS

Uma imagem representativa das fotos obtidas de cada grupo para análise IHQ da eNOS é apresentada na Figura 22.

Figura 22 – Expressão imuno-histoquímica de eNOS

Aumento 40 x. Barra de escala 50 μ m. CR: controle respirando. CV: controle ventilado. HDC: hérnia diafragmática congênita. A imagem em tons de cinza é repetida (CR=CV), já que, ao nascimento, o controle é o mesmo para os grupos respirando e ventilado. Fonte: elaborada pelo autor.

A média, a mediana e o DP da expressão IHQ de eNOS nos diferentes grupos são mostrados na Tabela 23.

Tabela 23 - Avaliação imuno-histoquímica de eNOS: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da expressão de eNOS de acordo com o grupo experimental

Grupo	eNOS média - mediana ($\pm$DP) (n=4)
C	0,098 – 0,100 ($\pm$ 0,007)
CR30	0,183 – 0,180 ($\pm$ 0,011)
CR60	0,178 – 0,178 ($\pm$ 0,008)
CR90	0,204 – 0,206 ($\pm$ 0,012)
CV30	0,123 – 0,124 ($\pm$ 0,006)
CV60	0,126 – 0,126 ($\pm$ 0,006)
CV90	0,093 – 0,094 ($\pm$ 0,010)
HDC	0,093 – 0,094 ($\pm$ 0,010)
HDCV30	0,094 – 0,095 ($\pm$ 0,012)
HDCV60	0,090 – 0,090 ($\pm$ 0,001)
HDCV90	0,079 – 0,078 ($\pm$ 0,008)

O Gráfico 12 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da expressão IHQ de eNOS intragrupo.

Gráfico 12 – Avaliação imuno-histoquímica de eNOS, contendo média e desvio padrão da expressão de eNOS de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. eNOS: óxido nítrico sintase endotelial. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos.

A comparação da expressão IHQ de eNOS entre os grupos consta na Tabela 24 (Apêndice L, página 120).

No grupo controle ventilado espontaneamente, houve aumento significativo da expressão de eNOS com o tempo (C vs. CR30, CR60 vs. CR90). Já no grupo controle ventilado mecanicamente, houve aumento significativo da expressão apenas com 30 minutos (C vs. CV30). Nos grupos com HDC, não houve diferença na expressão de eNOS.

Na comparação intergrupo, houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, exceto entre o grupo C e os grupos expostos a nitrofen (HDC, HDCV30, HDCV60 e HDCV90).

5.5.4.2 Avaliação da expressão de eNOS por *western blotting*

A média, a mediana e o DP da expressão de VEGFR-2 por WB nos diferentes grupos são mostrados na Tabela 25.

Tabela 25 – Avaliação por *western blotting* de eNOS: média, mediana e desvio padrão ($\pm$ DP) da expressão de eNOS de acordo com o grupo experimental

Grupo	eNOS
	média - mediana ($\pm$ DP)
	(n=3-4)
C	32,853 – 32,590 ($\pm$ 3,014)
CR30	82,950 – 82,400 ($\pm$ 2,671)
CR60	85,700 – 91,500 ($\pm$ 19,386)
CR90	83,900 – 83,350 ($\pm$ 13,221)
CV30	31,467 – 30,560 ($\pm$ 7,113)
CV60	43,183 – 33,770 ($\pm$ 31,484)
CV90	57,737 – 51,720 ($\pm$ 14,737)
HDC	28,500 – 36,400 ($\pm$ 15,807)
HDCV30	27,467 – 37,100 ($\pm$ 19,252)
HDCV60	23,300 – 18,700 ($\pm$ 9,569)
HDCV90	11,400 – 6,600 ($\pm$ 9,193)

A Figura 23 contém a média e o DP dos grupos, e a comparação da expressão de eNOS por WB intragrupo.

Figura 23 - Avaliação de eNOS por *western blotting*, contendo média e desvio padrão da expressão de eNOS de cada grupo

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. eNOS: óxido nítrico sintase endotelial. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos.

A comparação da expressão de eNOS por WB entre os grupos consta na Tabela 26 (Apêndice M, página 121).

Houve aumento da expressão de eNOS com a ventilação espontânea (C vs. CR30/CR60/CR90), mas não houve diferença significativa na comparação intragrupo dos demais grupos.

Na avaliação intergrupo, os grupos CR30, CR60 e CR90 apresentaram expressão significativamente maior que os grupos HDC, HDCV30, HDCV60 e HDCV90. O grupo CV30 teve expressão menor do que os grupos CR30 e CR90, e o grupo HDCV90 apresentou menor expressão que o grupo CV90.

5.6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

O sumário dos resultados pode ser visto nas Figuras 24 a 26.

Figura 24 - Sumário dos principais resultados em relação aos pesos

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. PPE: peso do pulmão esquerdo. PPT: peso pulmonar total.

Figura 25 - Sumário dos principais resultados em relação à fração de espaço aéreo e espessura da camada média

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. SMA: actina de músculo liso.

Figura 26 - Sumário dos principais resultados em relação à expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS

* $p < 0,05$. C: controle. CR30: controle respirando 30 minutos. CR60: controle respirando 60 minutos. CR90: controle respirando 90 minutos. CV30: controle ventilado 30 minutos. CV60: controle ventilado 60 minutos. CV90: controle ventilado 90 minutos. HDC: hérnia diafragmática congênita. HDCV30: hérnia diafragmática congênita ventilado 30 minutos. HDCV60: hérnia diafragmática congênita ventilado 60 minutos. HDCV90: hérnia diafragmática congênita ventilado 90 minutos. VEGF: fator de crescimento endotelial vascular. VEGFR-1: receptor do VEGF 1. VEGFR-2: receptor do VEGF 2.

6 DISCUSSÃO

O tratamento da HP em neonatos com HDC constitui um grande desafio (87). Apesar dos avanços nos cuidados neonatais e peri-operatórios, a sobrevivência dos portadores de HDC atingiu um platô, com morbimortalidade significativa atribuída à hipoplasia e à HP (1,17,25,26,84).

As terapias pós-natais disponíveis atualmente apresentam limitações e, apesar dos estudos para terapias pré-natais apresentarem resultados preliminares promissores para casos selecionados, elas oferecem risco significativo de trabalho de parto prematuro, infecção e óbito fetal (88). Nesse contexto, as terapias voltadas à administração materna de medicamentos oferecem esperança de uma estratégia menos invasiva associada à diminuição dos riscos, se puderem atuar especificamente na hipoplasia e HP (89).

Para o desenvolvimento de terapias mais efetivas, faz-se necessária a compreensão da fisiopatologia da doença (77). Como o VEGF é um dos fatores mais importantes envolvidos na angiogênese, proliferação e diferenciação endotelial (88), e alterações da eNOS acontecem precocemente no curso do desenvolvimento pulmonar patológico (20), eles foram escolhidos como focos do presente trabalho.

6.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O modelo experimental de HDC induzida por nitrofen em ratos é utilizado há quase três décadas. É, portanto, um modelo bem estabelecido e aceito no meio científico (70,79).

O momento da administração do teratôgeno é crítico. Os ratos são mais suscetíveis entre o DG 9 e 12, que corresponde de 4 a 6 semanas de gestação em humanos. Se a administração for realizada entre o DG 8 e 9, HDC esquerda é mais comum, enquanto a administração mais tardia (DG 10 a 12) resulta em maior número de defeitos à direita. Presume-se que isso decorra de diferenças no tempo em que é sinalizada a formação do diafragma primordial (15).

Uma das vantagens do modelo toxicológico para estudo da HDC, ao invés do cirúrgico, é que o defeito é produzido em um estágio mais precoce do desenvolvimento pulmonar, reproduzindo os dois insultos (*two hits theory*) que, acredita-se, ocorra na HDC em humanos (70). Nesse modelo, o primeiro insulto é causado pelo nitrofen e afeta os dois pulmões antes do desenvolvimento do diafragma; o segundo insulto afeta o pulmão ipsilateral

após o desenvolvimento do diafragma defeituoso, que leva à compressão pulmonar pelas vísceras abdominais herniadas (71).

Seguindo a padronização da técnica de ventilação mecânica controlada a volume e ciclada a tempo em neonatos de ratos publicada pelo nosso laboratório (72), optamos pelos tempos ventilatórios de 30, 60 e 90 minutos, que correspondem, respectivamente, a 13, 26 e 40 horas de vida de um neonato humano (76). Esses períodos foram assim determinados para se estudar o momento crítico do fenômeno de lua de mel (*honeymoon*) (40).

6.2 AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA

Todos os neonatos com HDC apresentaram parâmetros biométricos menores do que os recém-nascidos dos grupos controle, com diferença estatisticamente significativa.

Como a administração materna de nitrofen reduz a secreção de hormônios tireoidianos (90), e considerando o papel deles no crescimento e maturação dos tecidos fetais, é esperado que os fetos expostos se apresentem biometricamente menores (91).

Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Perveen et al. (2019), Guilbert et al. (2000), Gonçalves et al. (2014), Schmidt et al. (2012), Burgos et al. (2018), Burgos, Gebb e Shannon (2016), Gallindo et al. (2015) e Sluiter et al. (1992) (16,51,67,73,75,77,88,89).

6.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

6.3.1 Avaliação histológica do parênquima pulmonar

Os resultados encontrados pela fração de espaço aéreo sugerem que os grupos CR apresentaram tendência em aumento do espaço aéreo com o aumento do tempo de ventilação espontânea. Apesar da comparação intragrupo (C, CR30, CR60 e CR90) não apresentar diferença estatística, o grupo CR60 apresentou fração de espaço aéreo maior e com diferença estatística em relação aos grupos ventilados mecanicamente por 60 e 90 minutos (CV60, CV90, HDCV60 e HDCV90), e o grupo CR90 apresentou fração de espaço aéreo significativamente maior quando comparado a todos os grupos ventilados mecanicamente (CV30, CV60, CV90, HDCV30, HDCV60 e HDCV90).

O grupo HDC apresentou fração de espaço aéreo significativamente menor que todos os demais grupos, o que está de acordo com os trabalhos de Burgos et al. (2018) e Burgos et al. (2016), que encontraram espessura do septo interalveolar significativamente maior nos

neonatos Sprague Dawley com HDC induzida por nitrofen, quando comparados aos controles não expostos ($p<0.05$) (77,89). DiFiore et al. (1994) estudaram HDC confeccionada cirurgicamente em ovelhas, e também encontraram fração de espaço aéreo significativamente menor nos neonatos com HDC quando comparados aos controles ($p=0.0001$) (82).

Gonçalves et al. (2014) compararam recém-nascidos Sprague Dawley controle com portadores de HDC induzida por nitrofen. Os autores relataram maior espessura do parênquima no grupo HDC quando comparado ao grupo controle ($p<0.05$) (67).

Nos grupos com HDC, apesar do aumento com 30 minutos da fração de espaço aéreo (HDC vs. HDCV30), os neonatos que foram submetidos à ventilação mecânica não apresentaram diferença do parâmetro com o aumento do tempo ventilatório (60 e 90 minutos), nem diferença com os grupos controle ventilados mecanicamente (CV30, CV60 e CV90).

Tais resultados sugerem que a ventilação mecânica prolongada (acima de 60 minutos) não é capaz de mimetizar as adaptações fisiológicas do parênquima pulmonar (comparando os grupos CR com os grupos ventilados mecanicamente).

6.3.2 Avaliação histológica da vasculatura pulmonar

Os resultados da ECM estão de acordo com os publicados por Schmidt et al. (2012), que também encontraram valores maiores para o grupo com HDC do que para o grupo controle (51). Além disso, Wild et al. (2017) descreveram camada média mais espessa no grupo com HDC em relação ao grupo controle, tanto nas artérias com diâmetro entre 10 e 25 μm ($p<0.05$) quanto nas entre 25 e 35 μm ($p<0.01$) (92).

Burgos et al. (2018) e Burgos et al. (2016) avaliaram separadamente as artérias de diâmetro entre 20 e 40 μm , 40 e 60 μm , e entre 60 e 100 μm de controles e neonatos de Sprague Dawley com HDC induzida por nitrofen após 30 minutos de ventilação mecânica, e encontraram ECM significativamente mais elevada para o grupo com HDC ($p<0.05$) nos três diâmetros de artérias (77,89).

Em nosso laboratório, Gonçalves et al. (2014) e Gallindo et al. (2015) encontraram redução da ECM no grupo com HDC após 30 minutos de ventilação mecânica ($p<0.001$), e não encontraram diferença no grupo controle após o mesmo período de ventilação, o que é compatível com os achados deste estudo (67,75).

Nenhum dos estudos avaliou a ECM com a continuidade da ventilação. Neste trabalho, com a ventilação por 60 e 90 minutos nos grupos controle, a ECM apresentou redução (tanto no caso de ventilação espontânea quanto mecânica), enquanto teve aumento nos grupos com

HDC. Esse último grupo apresentou, portanto, o fenômeno de lua de mel, com uma resposta inicial de vasodilatação não sustentável, já que após 60 e 90 minutos a ECM voltou a aumentar.

Esses achados sugerem que há de fato uma adaptação vascular patológica na HDC, grupo no qual a resposta à ventilação corresponde ao aumento da ECM, e pode constituir uma das causas da persistência do padrão de circulação pulmonar fetal (93). Não encontramos dados na literatura que descrevam esse fenômeno em ratos com HDC.

6.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E POR *WESTERN BLOTTING*

6.4.1 Avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar

Com o intuito de demonstrar que a camada medida pela histologia era de fato a camada média arterial, os autores realizaram a avaliação IHQ de SMA, uma isoforma de célula muscular lisa tipicamente expressa em vasos (80,94,95).

Essa metodologia para medida da ECM já havia sido utilizada em estudos em humanos por Shehata et al. (2000), que demonstraram aumento da camada média arterial pela IHQ com SMA em portadores de HDC (96), e também em ratos por Perveen et al. (2019) (88).

No presente trabalho, a relação entre os resultados dos grupos experimentais dos achados imuno-histoquímicos foram similares aos histológicos, porém com medidas um pouco mais elevadas na IHQ. Essa diferença pode ser explicada pelas diferenças inerentes aos métodos, com consequente variação nos limites considerados de cada camada arterial.

Como na histologia, a IHQ demonstrou redução da ECM-IHQ com o aumento do tempo de ventilação nos grupos controle. Já nos grupos com HDC, houve redução com 30 minutos de ventilação e aumento da ECM-IHQ a partir de 60 minutos, com o grupo HDCV90 apresentando medida significativamente mais elevada que o grupo HDC.

6.4.2 Avaliação da expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS

6.4.2.1 Avaliação da expressão de VEGF

O VEGF, um potente fator mitogênico e angiogênico (97), é um dos responsáveis pela diferenciação e proliferação de células endoteliais durante a embriogênese (98), e tanto sua

expressão adequada quanto de seus receptores é necessária ao desenvolvimento vascular normal (99).

Em relação ao resultado da IHQ, ele pode não ser confiável. Apesar de termos realizado vários testes, os resultados não foram consistentes. Van der Loos et al. (2010) relataram dificuldades semelhantes e sugeriram a realização com outros anticorpos (100), mas infelizmente isso não foi possível porque as amostras acabaram.

Quanto ao WB, os achados relativos aos grupos CR podem estar relacionados ao fato de que os neonatos desses grupos talvez não apresentem uma respiração eficaz. Possivelmente pelo parto ter sido realizado por cesárea no DG 21,5, houve dificuldade em mantê-los ventilando. Estudos em outros contextos clínicos relataram aumento de ácido ribonucleico (RNA – *ribonucleic acid*) mensageiro de VEGF em resposta à hipóxia (101,102), que poderia ser responsável pelos resultados encontrados para esse grupo.

Já a elevação de VEGF encontrada com 30 minutos de ventilação nos portadores de HDC poderia representar uma tentativa de “retorno à normalidade” (estímulo à vasodilatação), que não se sustenta já que há queda da expressão com 90 minutos.

6.4.2.2 Avaliação da expressão de VEGFR-2

A deleção do gene que codifica o VEGFR-2 leva à morte embrionária precoce devido à deficiência de formação vascular (103).

No presente estudo, os grupos controle mantiveram baixa expressão de VEGFR-2 mesmo após a ventilação, exceto pelo grupo CR90. Já os grupos com HDC apresentaram maior expressão, com queda com 30 minutos de ventilação e aumento com 60 e 90 minutos.

Nenhum trabalho havia estudado a expressão de VEGF e seus receptores com a continuidade da ventilação, e os resultados aqui apresentados foram importantes para se elucidar o papel dos marcadores estudados no período de lua de mel. Gallindo et al. (2015) estudaram a expressão de VEGFR-2 em neonatos de ratos Sprague-Dawley expostos a nitrofen, e encontraram redução dessa expressão após 30 minutos de ventilação mecânica nos grupos com HDC, o que foi compatível com o presente trabalho (75).

Como o VEGFR-2 é o receptor que, apesar da menor afinidade pelo ligante, apresenta maior atividade tirosino-quinase, a hipótese é que a expressão alterada do receptor (elevada em relação aos grupos controles) possa colaborar para as alterações vasculares encontradas na HDC. No experimento, a redução da expressão do receptor com 30 minutos de ventilação no grupo com HDC correspondeu à redução da ECM, e o aumento da expressão com o progredir

do tempo ventilatório correspondeu ao aumento da ECM, sugerindo um papel central do VEGFR-2 na patogênese da HP relacionada à HDC.

6.4.2.3 Avaliação da expressão de VEGFR-1

A deleção do gene que codifica o VEGFR-1 em ratos resulta em hiperplasia vascular e falha na formação de vasculatura funcional, levando à morte em torno do DG 8,5. Já com a deleção do domínio quinase sem afetar o domínio extracelular, há desenvolvimento vascular normal (104,105). Tais achados sugerem que o VEGFR-1 funciona como um *decoy* para o VEGF, restringindo seu acesso ao VEGFR-2 (99,106). Além disso, acredita-se que o VEGFR-1 exerça função na maturação e na manutenção da integridade vascular (67,107).

No presente trabalho, o grupo CV apresentou aumento da expressão de VEGFR-1 com a ventilação mecânica. Já nos grupos CR e HDC, houve redução da expressão com 30 minutos.

Poucos trabalhos na literatura avaliaram a expressão de VEGFR-1/2 no contexto da HDC. Sbragia et al. (2014) avaliaram a expressão de VEGFR-1 no DG 18,5, 19,5, 20,5 e 21,5 de ratos Sprague-Dawley expostos a nitrofen. Em todas essas idades, a expressão de VEGFR-1 foi menor nos portadores de HDC do que no grupo controle ($p < 0.001$) (107), o que foi compatível com os achados do presente estudo.

Dois trabalhos estudaram a expressão de VEGFR-1 em neonatos de ratos Sprague-Dawley expostos a nitrofen. Eles encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo em relação ao VEGFR-1, com níveis reduzidos do receptor nos portadores de HDC quando comparados aos controles, e aumento da expressão com 30 minutos de ventilação mecânica (51,75).

A hipótese dos autores para explicar esses achados seria que, com a menor expressão de VEGFR-1 nos portadores de HDC, além da relativa "imaturidade vascular", o VEGF ficaria livre para se ligar ao VEGFR-2, o que poderia justificar, pelo menos em parte, as alterações vasculares encontradas.

6.4.2.4 Avaliação da expressão de eNOS

O NO sintetizado pelas células endoteliais é um fator-chave na manutenção da baixa resistência vascular na circulação pulmonar (20,68,108). Isso foi demonstrado em estudos

experimentais por Steudel, Ichinose e Huang (1997), que mostraram que camundongos com deficiência de eNOS apresentam HP (68).

Em humanos, Rooij et al. (2004) compararam a expressão de eNOS em pulmões de 13 pacientes portadores de HDC com controles (pacientes entre 18 e 42 semanas de idade gestacional, natimortos ou com óbito em até 12 horas após o parto, não submetidos à ventilação mecânica e sem doença pulmonar) e não encontraram diferenças entre os grupos (21).

Shehata et al. (2006) compararam a expressão de eNOS pulmonar em 23 portadores de HDC que evoluíram a óbito em até 6 horas do nascimento com controles (insuficiência placentária ou asfixia nas primeiras 24 horas de vida), e não encontraram diferença significativa (108). No quesito experimental, Gonçalves et al. (2014) não encontraram diferença na expressão de eNOS entre ratos Sprague-Dawley com HDC e controles (67).

De fato, na comparação dos grupos C e HDC não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de eNOS.

No grupo CR, houve aumento significativo da expressão de eNOS com a ventilação espontânea. Já no grupo CV, apesar de apresentar aumento da expressão com 30 minutos, não houve diferença na expressão com o progredir da ventilação (60 e 90 minutos). Nos grupos com HDC não houve diferença com a ventilação mecânica.

Esses achados sugerem que a alteração da expressão de eNOS contribui para a HP encontrada nos portadores de HDC submetidos à ventilação mecânica.

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fato de que os grupos CR apresentaram expressão de VEGF e seus receptores em um padrão mais próximo dos grupos HDCV, porém com expressão de eNOS e resposta vascular (ECM) semelhante aos grupos CV, é mais um indício de que há, de fato, alteração na sinalização e na resposta vascular nos portadores de HDC.

Espera-se que este trabalho sirva de subsídio para futuras pesquisas que busquem elucidar quais os mecanismos exatos envolvidos nas alterações da expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS nos portadores de HDC, visando a melhoria no manejo da doença.

O trabalho apresenta algumas limitações: é possível que não tenhamos encontrado diferença estatística pelo WB devido ao tamanho da amostra. Porém, os DP encontrados pelo WB foram maiores que pela IHQ e provavelmente seria necessária uma amostra muito maior para encontrar significância estatística, e o número de neonatos por grupo foi determinado

principalmente pela dificuldade em ventilar por 60 e 90 minutos grupos CR e HDC.

7 CONCLUSÃO

7.1 GERAL

Há alteração da reatividade vascular pulmonar e da expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS na HDC em ratos durante o período de lua de mel, o que sugere que a via VEGF-NO desempenha um papel importante nesse período.

7.2 ESPECÍFICAS

- a) Não houve diferença dos parâmetros biométricos entre os grupos controle (C, CR30, CR60, CR90, CV30, CV60 e CV90), nem entre os grupos com HDC (HDC, HDCV30, HDCV60 e HDCV90), mas todos os neonatos com HDC apresentaram parâmetros biométricos menores do que os recém-nascidos dos grupos controle;
- b) A ventilação mecânica prolongada (por mais de 60 minutos) não foi capaz de mimetizar as adaptações fisiológicas do parênquima pulmonar;
- c) A ECM apresentou redução nos grupos controle (tanto no caso de ventilação espontânea quanto mecânica), enquanto teve aumento nos grupos com HDC. Esse último grupo apresentou, portanto, o fenômeno de lua de mel (*honeymoon*), com uma resposta inicial de vasodilatação não sustentável, já que após 60 e 90 minutos a ECM voltou a aumentar;
- d) Os grupos controle e os grupos com HDC apresentaram diferentes padrões na expressão de VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS.

REFERÊNCIAS¹

1. Braga A de F de A, da Silva Braga FS, Nascimento SP, Verri B, Peralta FC, Bennini Junior J, et al. Oclusão traqueal por fetoscopia em hérnia diafragmática congênita grave: estudo retrospectivo. *Brazilian J Anesthesiol*. 2017;67(4):331–6.
2. Das BP, Singh AP, Singh RB. Emergency corrective surgery of congenital diaphragmatic hernia with pulmonary hypertension: Prolonged use of dexmedetomidine as a pharmacologic adjunct. *Anesthesiol Pain Med*. 2016;6(3):3–7.
3. Dillon PW, Cilley RE, Mauger D, Zachary C, Meier A, Altman RP, et al. The Relationship of pulmonary artery pressure and survival in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2004;39(3):307–12.
4. Skari H, Bjornland K, Haugen G, Egeland T, Emblem R. Congenital diaphragmatic hernia: A meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg*. 2000;35(8):1187–97.
5. Chandrasekharan PK, Rawat M, Madappa R, Rothstein DH, Lakshminrusimha S. Congenital diaphragmatic hernia – a review. *Matern Heal Neonatol Perinatol*. 2017;3(1):6.
6. Balayla J, Abenhaim HA. Incidence, predictors and outcomes of congenital diaphragmatic hernia: A population-based study of 32 million births in the United States. *J Matern Neonatal Med*. 2014;27(14):1438–44.
7. Dehdashtian M, Bashirnejad S, Malekian A, Aramesh MR, Aletayeb MH. Seasonality, epidemiology and outcome of congenital diaphragmatic hernia in South West of Iran. *J Neonatal Surg*. 2017;6(2):28.
8. Shanmugam H, Brunelli L, Botto LD, Krikov S, Feldkamp ML. Epidemiology and prognosis of congenital diaphragmatic hernia: A population-based cohort study in Utah. *Birth Defects Res*. 2017;109(18):1451–9.
9. Patel N, Moenkemeyer F, Germano S, Cheung MMH. Plasma vascular endothelial growth factor A and placental growth factor: Novel biomarkers of pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(4):378–83.
10. Bialkowski A, Moenkemeyer F, Patel N. Intravenous sildenafil in the management of pulmonary hypertension associated with congenital diaphragmatic hernia. *Eur J Pediatr Surg*. 2015;25(2):171–6.
11. Hirako S, Tsuda H, Ito F, Okazaki Y, Hirayama T, Nagasawa H, et al. Role of catalytic iron and oxidative stress in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia and its amelioration by Saireito (TJ114). *J Clin Biochem Nutr JCBN J Clin Biochem Nutr Soc Free Radic Res Japan Kyoto*. 2017;61(0912):176–82.
12. Metkus AP, Esserman L, Sola A, Harrison MR, Adzick NS. Cost per anomaly: What does a diaphragmatic hernia cost? *J Pediatr Surg*. 1995;30(2):226–30.

¹De acordo com Estilo Vancouver.

13. Mayer S, Metzger R, Kluth D. The embryology of the diaphragm. *Semin Pediatr Surg.* 2011;20(3):161–9.
14. Iritani I. Experimental study on embryogenesis of congenital diaphragmatic hernia. *Anat Embriol.* 1984;169(2):133–9.
15. Greer JJ. Current concepts on the pathogenesis and etiology of congenital diaphragmatic hernia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;189(2):232–40.
16. Guilbert TW, Gebb SA, Shannon JM. Lung hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia occurs early in development. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2000 Dec 1;279(6):1159–71.
17. Bos AP, Tibboel D, Koot VCM, Hazebroek FWJ, Molenaar JC. Persistent pulmonary hypertension in high-risk congenital diaphragmatic hernia patients: Incidence and vasodilator therapy. *J Pediatr Surg.* 1993;28(11):1463–5.
18. Kent GM, Olley PM, Creighton RE, Dobbinson T, Bryan MH, Symchych P, et al. Hemodynamic and pulmonary changes following surgical creation of a diaphragmatic hernia in fetal lambs. *Surgery.* 1972;72(3):427–33.
19. Keijzer R, Liu J, Deimling J, Tibboel D, Post M. Dual-hit hypothesis explains pulmonary hypoplasia in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Pathol.* 2000;156(4):1299–306.
20. Boucherat O, Franco-Montoya M-L, Delacourt C, Martinovic J, Masse V, Elie C, et al. Defective angiogenesis in hypoplastic human fetal lungs correlates with nitric oxide synthase deficiency that occurs despite enhanced angiopoietin-2 and VEGF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;298(6):849–56.
21. De Rooij JD, Hösgör M, Ijzendoorn Y, Rottier R, Groenman FA, Tibboel D, et al. Expression of Angiogenesis-Related Factors in Lungs of Patients with Congenital Diaphragmatic Hernia and Pulmonary Hypoplasia of Other Causes. *Pediatr Dev Pathol.* 2004 Sep 10;7(5):468–77.
22. Kitagawa M, Hislop A, Boyden EA, Reid L. Lung hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia a quantitative study of airway, artery, and alveolar development. *Br J Surg.* 1971;58(5):342–6.
23. Lath NR, Galambos C, Rocha AB, Malek M, Gittes GK, Potoka DA. Defective pulmonary innervation and autonomic imbalance in congenital diaphragmatic hernia. *AJP Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(4):390–8.
24. Verbeken EK, Cauberghs M, Mertens I, Clement J, Lauweryns JM, Van de Woestijne KP. The senile lung; Comparison with normal and emphysematous lungs. 2. Functional aspects. *Chest.* 1992;101(3):800–9.
25. Chiu P, Hedrick HL. Postnatal management and long-term outcome for survivors with congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn.* 2008 Jul;28(7):592–603.
26. Muehlethaler V, Kunig AM, Seedorf G, Balasubramaniam V, Abman SH. Impaired VEGF and nitric oxide signaling after nitrofen exposure in rat fetal lung explants. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* 2008 Jan;294(1):110–20.

27. Delabaere A, Marceau G, Coste K, Blanchon L, Déchelotte PJ, Blanc P, et al. Effects of tracheal occlusion with retinoic acid administration on normal lung development. *Prenat Diagn.* 2017;37(5):427–34.
28. Miniati D. Pulmonary vascular remodeling. *Semin Pediatr Surg.* 2007;16(2):80–7.
29. Sharma S, Abubakar K, Keszler M. Tidal volume in infants with congenital diaphragmatic hernia supported with conventional mechanical ventilation. *Am J Perinatol.* 2015 Jan 21;32(06):577–82.
30. Dibbins AW, Wiener ES. Mortality from neonatal diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1974;9(5):653–62.
31. Fitzgerald RJ. Congenital diaphragmatic hernia: A study of mortality factors. *Ir J Med Sci.* 1977;146(1):280–4.
32. Langer JC, Filler RM, Bohn DJ, Shandling B, Ein SH, Wesson DE, et al. Timing of surgery for congenital diaphragmatic hernia: Is emergency operation necessary? *J Pediatr Surg.* 1988;23(8):731–4.
33. Heiss K, Manning P, Oldham KT, Coran AG, Polley TZ, Wesley JR, et al. Reversal of mortality for congenital diaphragmatic hernia with ECMO. *Ann Surg.* 1989;209(2):225–30.
34. Pober BR. Overview of epidemiology, genetics, birth defects, and chromosome abnormalities associated with CDH. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2007 May 15;145C(2):158–71.
35. Mandegar M, Fung YCB, Huang W, Remillard C V., Rubin LJ, Yuan JXJ. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: Role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res.* 2004;68(2):75–103.
36. 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.
37. Gallindo RM, Gonçalves FL, Figueira RL, Sbragia L. Manejo pré-natal da hérnia diafragmática congênita: presente, passado e futuro. *Rev Bras Ginecol e Obs.* 2015;37(3):140–7.
38. Nair J, Lakshminrusimha S. Update on PPHN: Mechanisms and treatment. *Semin Perinatol.* 2014;38(2):78–91.
39. Skarsgard ED, Harrison MR. Congenital diaphragmatic hernia: The surgeon's perspective. *Pediatr Rev.* 1999;20(10):71–8.
40. Gregg RL, Murphy JD, Langleben D, Crone RK, Vacanti JP, Reid LM, et al. Congenital diaphragmatic hernia: Arterial structural changes and persistent pulmonary hypertension after surgical repair. *J Pediatr.* 1985;107(3):457–64.
41. Doherty CH, Mackinnon RJ. Congenital diaphragmatic hernia – an update. *Infant.* 2006;2:244–8.
42. Shanley CJ, Hirschl RB, Schumacher RE, Overbeck MC, Delosh TN, Chapman R a, et

- al. Extracorporeal life support for neonatal respiratory failure. A 20-year experience. *Ann Surg.* 1994;220(3):269–82.
43. Steimle CN, Meric F, Hirschl RB, Bozynski M, Coran AG, Bartlett RH. Effect of extracorporeal life support on survival when applied to all patients with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1994;29(8):997–1001.
44. Collins DL, Pomerance JJ, Travis KW, Turner SW, Pappelbaum SJ. A new approach to congenital posterolateral diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1977;12(2):149–56.
45. Dao DT, Nandivada P, Vuong JT, Anez-Bustillos L, Pan A, Kishikawa H, et al. Vascular endothelial growth factor accelerates compensatory lung growth by increasing the alveolar units. *Pediatr Res.* 2018;83(6):1182–9.
46. Mura M, Binnie M, Han B, Li C, Andrade CF, Shiozaki A, et al. Functions of type II pneumocyte-derived vascular endothelial growth factor in alveolar structure, acute inflammation, and vascular permeability. *Am J Pathol.* 2010;176(4):1725–34.
47. Christou H, Yoshida A, Arthur V, Morita T, Kourembanas S. Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;18(6):768–76.
48. Del Moral PM, Sala FG, Tefft D, Shi W, Keshet E, Bellusci S, et al. VEGF-A signaling through Flk-1 is a critical facilitator of early embryonic lung epithelial to endothelial crosstalk and branching morphogenesis. *Dev Biol.* 2006;290(1):177–88.
49. Cai J, Jiang WG, Ahmed A, Boulton M. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation is regulated by interaction between VEGFR-2, SH-PTP1 and eNOS. *Microvasc Res.* 2006;71(1):20–31.
50. Tudor RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia: Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1798–807.
51. Schmidt AF, Gonçalves FLL, Regis AC, Gallindo RM, Sbragia L. Prenatal retinoic acid improves lung vascularization and VEGF expression in CDH rat. *Am J Obstet Gynecol.* 2012 Jul;207(1):25–32.
52. Larrivée B, Karsan A. Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor (review). *Int J Mol Med.* 2000;5(5):447–56.
53. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res.* 1996;33(3):181–94.
54. Shinkai M, Shinkai T, Pirker MA, Montedonico S, Puri P. Effect of nitric oxide on the development of nitrofen-induced fetal hypoplastic lung explants. *J Pediatr Surg.* 2005;40(1):17–21.
55. Solari V, Piotrowska AP, Puri P. Expression of heme oxygenase-1 and endothelial nitric oxide synthase in the lung of newborns with congenital diaphragmatic hernia and persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr Surg.* 2003;38(5):808–13.
56. North AJ, Moya FR, Mysore MR, Thomas VL, Wells LB, Wu LC, et al. Pulmonary endothelial nitric oxide synthase gene expression is decreased in a rat model of

- congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;13(6):676–82.
57. Okoye BO, Losty PD, Fisher MJ, Wilmott I, Lloyd DA. Effect of dexamethasone on endothelial nitric oxide synthase in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed*. 1998;78(3):204–8.
 58. Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(1):49–59.
 59. Gentile C, Muise-Helmericks RC, Drake CJ. VEGF-mediated phosphorylation of eNOS regulates angioblast and embryonic endothelial cell proliferation. *Dev Biol*. 2013;373(1):163–75.
 60. Tanimoto T, Jin Z-G, Berk BC. Transactivation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Flk-1/KDR Is Involved in Sphingosine 1-Phosphate-stimulated Phosphorylation of Akt and Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS). *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):42997–3001.
 61. Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252(3):743–6.
 62. Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): Rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;265(3):636–9.
 63. Shen BQ, Lee DY, Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem*. 1999;274(46):33057–63.
 64. Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997;100(12):3131–9.
 65. Frank S, Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J*. 1999;13(14):2002–14.
 66. Chang R, Andreoli S, Ng Y-S, Truong T, Smith SR, Wilson J, et al. VEGF expression is downregulated in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2004;39(6):825–8.
 67. Gonçalves FLL, Figueira RL, Simões ALB, Gallindo RM, Coleman A, Peiró JL, et al. Effect of corticosteroids and lung ventilation in the VEGF and NO pathways in congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Surg Int*. 2014;30(12):1207–15.
 68. Steudel W, Ichinose F, Huang PL, Hurford WE, Jones RC, Bevan JA, et al. Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circ Res*. 1997;81(1):34–41.
 69. Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, Morris KG, Hepler LK, Sato K, et al. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest*. 1999;103(2):291–9.

70. Van Loenhout RB, Tibboel D, Post M, Keijzer R. Congenital diaphragmatic hernia: Comparison of animal models and relevance to the human situation. *Neonatology*. 2009;96(3):137–49.
71. Montedonico S, Sugimoto K, Felle P, Bannigan J, Puri P. Prenatal treatment with retinoic acid promotes pulmonary alveologenesis in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2008;43(3):500–7.
72. Gallindo RM, Gonçalves FLL, Figueira RL, Simões ALB, Sbragia L. Standardization of pulmonary ventilation technique using volume-controlled ventilators in rats with congenital diaphragmatic hernia. *Rev Col Bras Cir*. 2014;41(3):181–7.
73. Sluiter W, Bos a P, 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.
74. 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 Sep;37(9):1253–7.
75. Gallindo RM, Gonçalves FLL, Figueira RL, Pereira LAVD, Simões ALB, Schmidt AF, et al. Ventilation causes pulmonary vascular dilation and modulates the NOS and VEGF pathway on newborn rats with CDH. *J Pediatr Surg*. 2015 May;50(5):842–8.
76. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775–7.
77. Burgos CM, Davey MG, Riley JS, Jia H, Flake AW, Peranteau WH. Lung function and pulmonary artery blood flow following prenatal maternal retinoic acid and imatinib in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2018;53(9):1681–7.
78. Desai AA, Ostlie DJ, Juang D. Optimal timing of congenital diaphragmatic hernia repair in infants on extracorporeal membrane oxygenation. *Semin Pediatr Surg*. 2015;24(1):17–9.
79. 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.
80. Kattan J, Céspedes C, González A, Vio CP. Sildenafil stimulates and dexamethasone inhibits pulmonary vascular development in congenital diaphragmatic hernia rat lungs. *Neonatology*. 2014;106(1):74–80.
81. Sun Z, Wang Y, Ji S, Wang K, Zhao Y. Computer-aided analysis with Image J for quantitatively assessing psoriatic lesion area. *Ski Res Technol*. 2015;21(4):437–43.
82. DiFiore BJW, Fauza D, Slavin R, Peters CA, Fackler JC, Wilson JM. By John W. DiFiore, Dario O. Fauza, Richard Slavin, Craig A. Peters, James C. Fackler, and Jay M. Wilson. 1994;29(2):248–57.
83. Hosoda Y. Pathology of pulmonary hypertension: A human and experimental study. *Pathol Int*. 1994;44:241–67.
84. Roublova 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;39(7):1066–72.
85. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*. 1966;30(1):23–38.
 86. De Genaro IS, de Almeida FM, Hizume-Kunzler DC, Moriya HT, Silva RA, Cruz JCG, et al. Low dose of chlorine exposure exacerbates nasal and pulmonary allergic inflammation in mice. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–13.
 87. Kadir D, Lilja HE. Risk factors for postoperative mortality in congenital diaphragmatic hernia: a single-centre observational study. *Pediatr Surg Int*. 2017;33(3):317–23.
 88. Perveen S, Ayasolla K, Zagloul N, Patel H, Ochani K, Orner D, et al. MIF inhibition enhances pulmonary angiogenesis and lung development in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res*. 2019;85(5):711–8.
 89. Burgos CM, Pearson EG, Davey M, Riley J, Jia H, Laje P, et al. Improved pulmonary function in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia following prenatal maternal dexamethasone and/or sildenafil. *Pediatr Res*. 2016;80(4):577–85.
 90. Manson JM. Mechanism of Nitrofen Teratogenesis. *Environ Health Perspect*. 1986 Dec;70(5):137.
 91. Tovar J.A., Alfonso LF, Aldazabal P, Lopez de Torre B, Uriarte S, Vilanova J. The kidney in the fetal rat model of congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen. *J Pediatr Surg*. 1992 Oct;27(10):1356–60.
 92. Wild B, St-Pierre M-E, Langlois S, Cowan KN. Elastase and matrix metalloproteinase activities are associated with pulmonary vascular disease in the nitrofen rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2017;52(5):693–701.
 93. Barghorn A, Koslowski M, Kromminga R, Hufnagl P, Tennstedt C, Vogel M. α -smooth muscle actin distribution in the pulmonary vasculature comparing hypoplastic and normal fetal lungs. *Pediatr Pathol Lab Med*. 1998;18(1):5–22.
 94. Yuan S. Aortic α -smooth muscle actin expressions in aortic disorders and coronary artery disease: An immunohistochemical study. *Anatol J Cardiol*. 2018;11–6.
 95. Chang Y-T, Ringman Uggla A, Österholm C, Tran P-K, Eklöf A-C, Lengquist M, et al. Antenatal imatinib treatment reduces pulmonary vascular remodeling in a rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2012;302(11):1159–66.
 96. Shehata SM, Sharma HS, van der Staak FH, van de 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;35(2):208–15.
 97. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581–611.
 98. Chinoy MR, Graybill MM, Miller SA, Lang CM, Kauffman GL. Angiopoietin-1 and VEGF in vascular development and angiogenesis in hypoplastic lungs. *Am J Physiol*

Cell Mol Physiol. 2002;283(1):60–6.

99. Yamamoto Y, Shiraishi I, Dai P, Hamaoka K, Takamatsu T. Regulation of embryonic lung vascular development by vascular endothelial growth factor receptors, Flk-1 and Flt-1. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol*. 2007 Aug;290(8):958–73.
100. Van der Loos CM, Meijer-Jorna LB, Broekmans MEC, Ploegmakers HPHM, Teeling P, de Boer OJ, et al. Anti-human vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody selection for immunohistochemical staining of proliferating blood vessels. *J Histochem Cytochem*. 2010;58(2):109–18.
101. Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest*. 1996;98(11):2507–11.
102. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359(6398):843–5.
103. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X-F, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376(6535):62–6.
104. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9349–54.
105. Fong G-H, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376(6535):66–70.
106. Álvarez-Aznar A, Muhl L, Gaengel K. VEGF receptor tyrosine kinases: Key regulators of vascular function. *Curr Top Dev Biol*. 2017;123:433–82.
107. Sbragia L, Nassr ACC, Gonçalves FLL, Schmidt AF, Zuliani CC, Garcia PV, et al. VEGF receptor expression decreases during lung development in congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen. *Brazilian J Med Biol Res*. 2014;47(2):171–8.
108. Shehata SMK, Sharma HS, Mooi WJ, Tibboel D. Pulmonary Hypertension in Human Newborns With Congenital Diaphragmatic Hernia Is Associated With Decreased Vascular Expression of Nitric-Oxide Synthase. *Cell Biochem Biophys*. 2006;44(1):147–55.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Tabela 3 - Avaliação biométrica: média, mediana e desvio-padrão ($\pm$ DP) do peso corporal (PC), peso do pulmão esquerdo (PPE), peso pulmonar total (PPT), razão PPE/PC e razão PPT/PC

Grupo	PC (gramas)	PPE (gramas)	PPT (gramas)	PPE/PC	PPT/PC
	média - mediana	média - mediana	média - mediana	média - mediana	média - mediana
	($\pm$DP)	($\pm$DP)	($\pm$DP)	($\pm$DP)	($\pm$DP)
	(n=7-8)	(n=7-8)	(n=7-8)	(n=7-8)	(n=7-8)
C	5,310 – 5,292 ($\pm$ 0,442)	0,054 – 0,052 ($\pm$ 0,005)	0,148 – 0,153 ($\pm$ 0,017)	0,010 - 0,010 ($\pm$ 0,001)	0,028 - 0,029 ($\pm$ 0,003)
CR30	5,340 – 5,236 ($\pm$ 0,302)	0,050 – 0,047 ($\pm$ 0,009)	0,144 – 0,144 ($\pm$ 0,018)	0,009 - 0,009 ($\pm$ 0,001)	0,027 - 0,027 ($\pm$ 0,003)
CR60	5,222 – 5,220 ($\pm$ 0,215)	0,045 – 0,046 ($\pm$ 0,004)	0,134 – 0,129 ($\pm$ 0,009)	0,009 - 0,009 ($\pm$ 0,001)	0,025 - 0,025 ($\pm$ 0,001)
CR90	5,392 – 5,422 ($\pm$ 0,449)	0,046 – 0,047 ($\pm$ 0,004)	0,133 – 0,131 ($\pm$ 0,010)	0,009 - 0,008 ($\pm$ 0,001)	0,025 - 0,024 ($\pm$ 0,002)
CV30	5,300 – 5,105 ($\pm$ 0,455)	0,054 – 0,054 ($\pm$ 0,009)	0,150 – 0,151 ($\pm$ 0,017)	0,010 - 0,010 ($\pm$ 0,001)	0,028 - 0,028 ($\pm$ 0,002)
CV60	5,351 – 5,289 ($\pm$ 0,436)	0,046 – 0,046 ($\pm$ 0,003)	0,132 – 0,131 ($\pm$ 0,013)	0,009 - 0,008 ($\pm$ 0,001)	0,025 - 0,025 ($\pm$ 0,003)
CV90	5,365 – 5,341 ($\pm$ 0,542)	0,046 - 0,045 ($\pm$ 0,007)	0,133 – 0,125 ($\pm$ 0,016)	0,009 - 0,009 ($\pm$ 0,001)	0,025 - 0,025 ($\pm$ 0,002)
HDC	4,355 – 4,258 ($\pm$ 0,343)	0,028 – 0,029 ($\pm$ 0,003)	0,086 – 0,088 ($\pm$ 0,005)	0,007 - 0,006 ($\pm$ 0,001)	0,020 - 0,020 ($\pm$ 0,002)
HDCV30	3,993 – 3,911 ($\pm$ 0,428)	0,024 – 0,023 ($\pm$ 0,007)	0,073 – 0,073 ($\pm$ 0,014)	0,006 - 0,006 ($\pm$ 0,001)	0,018 - 0,018 ($\pm$ 0,003)
HDCV60	4,093 – 4,163 ($\pm$ 0,481)	0,024 – 0,024 ($\pm$ 0,004)	0,074 – 0,073 ($\pm$ 0,010)	0,006 - 0,006 ($\pm$ 0,001)	0,018 - 0,018 ($\pm$ 0,001)
HDCV90	4,203 – 4,157 ($\pm$ 0,361)	0,023 – 0,024 ($\pm$ 0,006)	0,075 – 0,076 ($\pm$ 0,014)	0,005 - 0,005 ($\pm$ 0,001)	0,018 - 0,018 ($\pm$ 0,002)

APÊNDICE B - Tabela 4 - Comparação da avaliação biométrica entre os grupos: valor p do PC, PPE, PPT, e das razões PPE/PC e PPT/PC pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	PC valor p (n=7-8)	PPE valor p (n=7-8)	PPT valor p (n=7-8)	PPE/PC valor p (n=7-8)	PPT/PC valor p (n=7-8)
C vs. CR30	1,000	0,942	0,999	0,803	0,995
CR60	0,999	0,130	0,586	0,124	0,520
CR90	0,999	0,232	0,442	0,072	0,163
CV30	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CV60	1,000	0,284	0,349	0,153	0,199
CV90	1,000	0,286	0,456	0,123	0,196
HDC	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV30	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV90	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CR30 vs. CR60	0,999	0,905	0,940	0,979	0,977
CR90	1,000	0,972	0,876	0,937	0,748
CV30	1,000	0,953	0,998	0,879	0,983
CV60	1,000	0,985	0,804	0,988	0,801
CV90	1,000	0,985	0,885	0,979	0,798
HDC	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV30	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV90	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CR60 vs. CR90	0,999	1,000	1,000	1,000	0,999
CV30	0,999	0,145	0,459	0,176	0,402
CV60	0,999	0,999	1,000	1,000	0,999
CV90	0,999	0,999	1,000	1,000	0,999
HDC	0,003	<0,001	<0,001	0,005	<0,001
HDCV30	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV90	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

continua

conclusão

Grupo versus (vs.) grupo	PC valor <i>p</i> (n=7-8)	PPE valor <i>p</i> (n=7-8)	PPT valor <i>p</i> (n=7-8)	PPE/PC valor <i>p</i> (n=7-8)	PPT/PC valor <i>p</i> (n=7-8)
CR90 vs. CV30	1,000	0,254	0,106	0,106	0,106
CV 60	1,000	1,000	0,999	0,999	1,000
CV90	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
HDC	<0,001	<0,001	<0,001	0,010	0,004
HDCV30	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV90	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV30 vs. CV60	1,000	0,309	0,245	0,214	0,132
CV90	0,999	0,311	0,335	0,176	0,131
HDC	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV30	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV90	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV60 vs. CV90	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
HDC	<0,001	<0,001	<0,001	0,003	0,002
HDCV30	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV90	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV90 vs. HDC	<0,001	<0,001	<0,001	0,005	0,003
HDCV30	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV60	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDCV90	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
HDC vs. HDCV30	0,807	0,906	0,740	0,991	0,982
HDCV60	0,972	0,937	0,839	0,973	0,951
HDCV90	0,999	0,788	0,896	0,601	0,792
HDCV30 vs. HDCV60	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000
HDCV90	0,994	1,000	1,000	0,995	0,999
HDCV60 vs. HDCV90	0,999	0,999	1,000	0,999	0,999

APÊNDICE C - Tabela 6 - Comparação da avaliação histológica do parênquima pulmonar entre os grupos: valor p da fração de espaço aéreo pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	Fração de espaço aéreo valor p (n=4)	Grupo vs. grupo	Fração de espaço aéreo valor p (n=4)
C vs. CR30	0,967	CR90 vs. CV30	0,039
CR60	0,715	CV60	<0,001
CR90	0,407	CV90	0,009
CV30	0,981	HDC	<0,001
CV60	0,176	HDCV30	0,043
CV90	0,794	HDCV60	0,014
HDC	<0,001	HDCV90	0,002
HDCV30	0,986	CV30 vs. CV60	0,999
HDCV60	0,874	CV90	0,999
HDCV90	0,427	HDC	<0,001
CR30 vs. CR60	0,999	HDCV30	0,999
CR90	0,987	HDCV60	0,999
CV30	0,373	HDCV90	0,980
CV60	0,009	CV60 vs. CV90	0,987
CV90	0,128	HDC	0,006
HDC	<0,001	HDCV30	0,804
HDCV30	0,396	HDCV60	0,967
HDCV60	0,178	HDCV90	0,999
HDCV90	0,033	CV90 vs. HDC	<0,001
CR60 vs. CR90	0,999	HDCV30	0,999
CV30	0,119	HDCV60	0,999
CV60	0,002	HDCV90	0,999
CV90	0,031	HDC vs. HDCV30	<0,001
HDC	<0,001	HDCV60	<0,001
HDCV30	0,129	HDCV90	0,001
HDCV60	0,046	HDCV30 vs. HDCV60	0,999
HDCV90	0,007	HDCV90	0,976
		HDCV60 vs. HDCV90	0,999

APÊNDICE D - Tabela 8 - Comparação da avaliação histológica da vasculatura pulmonar entre os grupos: valor p da espessura da camada média pela histologia (ECM) pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	ECM valor p (n=4)	Grupo vs. grupo	ECM valor p (n=4)
C vs. CR30	0,827	CR90 vs. CV30	0,186
CR60	0,006	CV60	0,028
CR90	<0,001	CV90	<0,001
CV30	0,158	HDC	<0,001
CV60	<0,001	HDCV30	<0,001
CV90	<0,001	HDCV60	<0,001
HDC	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV30	<0,001	CV30 vs. CV60	<0,001
HDCV60	<0,001	CV90	<0,001
HDCV90	<0,001	HDC	<0,001
CR30 vs. CR60	<0,001	HDCV30	<0,001
CR90	<0,001	HDCV60	<0,001
CV30	0,002	HDCV90	<0,001
CV60	<0,001	CV60 vs. CV90	0,295
CV90	<0,001	HDC	<0,001
HDC	<0,001	HDCV30	<0,001
HDCV30	<0,001	HDCV60	<0,001
HDCV60	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV90	<0,001	CV90 vs. HDC	<0,001
CR60 vs. CR90	0,915	HDCV30	<0,001
CV30	0,950	HDCV60	<0,001
CV60	<0,001	HDCV90	<0,001
CV90	<0,001	HDC vs. HDCV30	<0,001
HDC	<0,001	HDCV60	<0,001
HDCV30	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV60	<0,001	HDCV30 vs. HDCV60	<0,001
HDCV90	<0,001	HDCV90	<0,001
		HDCV60 vs. HDCV90	<0,001

APÊNDICE E - Tabela 10 - Comparação da avaliação imuno-histoquímica da vasculatura pulmonar entre os grupos: valor p da espessura da camada média (ECM-IHQ) pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	ECM-IHQ valor p (n=4)	Grupo vs. grupo	ECM-IHQ valor p (n=4)
C vs. CR30	<0,001	CR90 vs. CV30	<0,001
CR60	0,001	CV60	<0,001
CR90	<0,001	CV90	<0,001
CV30	<0,001	HDC	<0,001
CV60	<0,001	HDCV30	<0,001
CV90	<0,001	HDCV60	<0,001
HDC	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV30	<0,001	CV30 vs. CV60	<0,001
HDCV60	<0,001	CV90	<0,001
HDCV90	<0,001	HDC	<0,001
CR30 vs. CR60	<0,001	HDCV30	<0,001
CR90	<0,001	HDCV60	<0,001
CV30	<0,001	HDCV90	<0,001
CV60	<0,001	CV60 vs. CV90	<0,001
CV90	<0,001	HDC	<0,001
HDC	<0,001	HDCV30	<0,001
HDCV30	<0,001	HDCV60	<0,001
HDCV60	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV90	<0,001	CV90 vs. HDC	<0,001
CR60 vs. CR90	<0,001	HDCV30	<0,001
CV30	0,797	HDCV60	<0,001
CV60	<0,001	HDCV90	<0,001
CV90	<0,001	HDC vs. HDCV30	<0,001
HDC	<0,001	HDCV60	<0,001
HDCV30	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV60	<0,001	HDCV30 vs. HDCV60	<0,001
HDCV90	<0,001	HDCV90	<0,001
		HDCV60 vs. HDCV90	<0,001

APÊNDICE F - Tabela 12 - Comparação da avaliação imuno-histoquímica de VEGF entre os grupos: valor *p* da expressão de VEGF pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	VEGF valor <i>p</i> (n=4)	Grupo vs. grupo	VEGF valor <i>p</i> (n=4)
C vs CR30	0,999	CR90 vs CV30	0,122
CR60	0,065	CV60	0,984
CR90	0,999	CV90	0,999
CV30	0,122	HDC	0,992
CV60	0,984	HDCV30	0,816
CV90	0,999	HDCV60	0,998
HDC	0,991	HDCV90	0,999
HDCV30	0,816	CV30 vs CV60	0,708
HDCV60	0,998	CV90	0,351
HDCV90	0,999	HDC	0,648
CR30 vs CR60	0,301	HDCV30	0,001
CR90	0,999	HDCV60	0,524
CV30	0,464	HDCV90	0,301
CV60	0,999	CV60 vs CV90	0,999
CV90	0,999	HDC	0,999
HDC	0,999	HDCV30	0,179
HDCV30	0,351	HDCV60	0,999
HDCV60	0,999	HDCV90	0,999
HDCV90	0,999	CV90 vs HDC	0,999
CR60 vs CR90	0,065	HDCV30	0,463
CV30	0,999	HDCV60	0,999
CV60	0,524	HDCV90	0,999
CV90	0,215	HDC vs HDCV30	0,215
HDC	0,464	HDCV60	0,999
HDCV30	0,001	HDCV90	0,999
HDCV60	0,351	HDCV30 vs HDCV60	0,301
HDCV90	0,179	HDCV90	0,524
		HDCV60 vs HDCV90	0,999

APÊNDICE G - Tabela 14 - Comparação da avaliação por *western blotting* de VEGF entre os grupos: valor *p* da expressão de VEGF pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	VEGF valor <i>p</i> (n=3-4)	Grupo vs. grupo	VEGF valor <i>p</i> (n=3-4)
C vs CR30	<0,009	CR90 vs CV30	0,014
CR60	0,038	CV60	0,020
CR90	0,003	CV90	0,012
CV30	0,999	HDC	0,475
CV60	0,999	HDCV30	0,183
CV90	0,999	HDCV60	0,823
HDC	0,750	HDCV90	0,051
HDCV30	<0,01	CV30 vs CV60	0,999
HDCV60	<0,01	CV90	0,999
HDCV90	0,999	HDC	0,961
CR30 vs CR60	0,999	HDCV30	<0,001
CR90	0,999	HDCV60	<0,001
CV30	0,039	HDCV90	0,999
CV60	0,055	CV60 vs CV90	0,999
CV90	0,035	HDC	0,981
HDC	0,726	HDCV30	<0,001
HDCV30	0,075	HDCV60	0,001
HDCV60	0,552	HDCV90	0,999
HDCV90	0,117	CV90 vs HDC	0,952
CR60 vs CR90	0,977	HDCV30	<0,001
CV30	0,144	HDCV60	<0,001
CV60	0,192	HDCV90	0,999
CV90	0,131	HDC vs HDCV30	<0,01
HDC	0,956	HDCV60	0,004
HDCV30	0,019	HDCV90	0,987
HDCV60	0,220	HDCV30 vs HDCV60	0,984
HDCV90	0,315	HDCV90	<0,001
		HDCV60 vs HDCV90	0,003

APÊNDICE H - Tabela 16 - Comparação da avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-2 entre os grupos: valor p da expressão de VEGFR-2 pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	VEGFR-2 valor p (n=4)	Grupo vs. grupo	VEGFR-2 valor p (n=4)
C vs CR30	<0,001	CR90 vs CV30	<0,001
CR60	<0,001	CV60	<0,001
CR90	<0,001	CV90	<0,001
CV30	<0,001	HDC	<0,001
CV60	<0,001	HDCV30	<0,001
CV90	<0,001	HDCV60	<0,001
HDC	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV30	<0,001	CV30 vs CV60	0,881
HDCV60	<0,001	CV90	0,048
HDCV90	<0,001	HDC	<0,001
CR30 vs CR60	<0,001	HDCV30	<0,001
CR90	<0,001	HDCV60	<0,001
CV30	<0,001	HDCV90	<0,001
CV60	<0,001	CV60 vs CV90	0,718
CV90	<0,001	HDC	<0,001
HDC	<0,001	HDCV30	<0,001
HDCV30	<0,001	HDCV60	<0,001
HDCV60	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV90	<0,001	CV90 vs HDC	<0,001
CR60 vs CR90	<0,001	HDCV30	<0,001
CV30	0,585	HDCV60	<0,001
CV60	0,029	HDCV90	<0,001
CV90	<0,001	HDC vs HDCV30	<0,001
HDC	<0,001	HDCV60	<0,001
HDCV30	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV60	<0,001	HDCV30 vs HDCV60	<0,001
HDCV90	<0,001	HDCV90	<0,001
		HDCV60 vs HDCV90	0,124

APÊNDICE I - Tabela 18 - Comparação da avaliação por *western blotting* de VEGFR-2 entre os grupos: valor *p* da expressão de VEGFR-2 pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	VEGFR-2 valor <i>p</i> (n=3-4)	Grupo vs. grupo	VEGFR-2 valor <i>p</i> (n=3-4)
C vs CR30	0,982	CR90 vs CV30	0,016
CR60	0,999	CV60	0,008
CR90	0,026	CV90	0,002
CV30	0,999	HDC	0,992
CV60	0,999	HDCV30	0,084
CV90	0,995	HDCV60	0,722
HDC	0,510	HDCV90	0,968
HDCV30	0,999	CV30 vs CV60	0,999
HDCV60	0,759	CV90	0,999
HDCV90	0,403	HDC	0,404
CR30 vs CR60	0,999	HDCV30	0,999
CR90	0,185	HDCV60	0,640
CV30	0,945	HDCV90	0,299
CV60	0,837	CV60 vs CV90	0,999
CV90	0,546	HDC	0,276
HDC	0,954	HDCV30	0,994
HDCV30	0,999	HDCV60	0,464
HDCV60	0,999	HDCV90	0,185
HDCV90	0,931	CV90 vs HDC	0,131
CR60 vs CR90	0,084	HDCV30	0,923
CV30	0,994	HDCV60	0,229
CV60	0,961	HDCV90	0,074
CV90	0,774	HDC vs HDCV30	0,785
HDC	0,840	HDCV60	0,999
HDCV30	0,999	HDCV90	0,999
HDCV60	0,980	HDCV30 vs HDCV60	0,956
HDCV90	0,772	HDCV90	0,707
		HDCV60 vs HDCV90	0,999

APÊNDICE J - Tabela 20 - Comparação da avaliação imuno-histoquímica de VEGFR-1 entre os grupos: valor p da expressão de VEGFR-1 pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	VEGFR-1 valor p (n=4)	Grupo vs. grupo	VEGFR-1 valor p (n=4)
C vs CR30	<0.001	CR90 vs CV30	<0.001
CR60	<0.001	CV60	<0.001
CR90	<0.001	CV90	<0.001
CV30	<0.001	HDC	<0.001
CV60	<0.001	HDCV30	<0.001
CV90	<0.001	HDCV60	<0.001
HDC	<0.001	HDCV90	<0.001
HDCV30	<0.001	CV30 vs CV60	0.992
HDCV60	<0.001	CV90	0,033
HDCV90	<0.001	HDC	<0.001
CR30 vs CR60	0.977	HDCV30	<0.001
CR90	0.999	HDCV60	<0.001
CV30	<0.001	HDCV90	<0.001
CV60	<0.001	CV60 vs CV90	0.002
CV90	<0.001	HDC	<0.001
HDC	<0.001	HDCV30	<0.001
HDCV30	<0.001	HDCV60	<0.001
HDCV60	<0.001	HDCV90	<0.001
HDCV90	<0.001	CV90 vs HDC	<0.001
CR60 vs CR90	0,999	HDCV30	<0.001
CV30	<0.001	HDCV60	<0.001
CV60	<0.001	HDCV90	<0.001
CV90	<0.001	HDC vs HDCV30	<0.001
HDC	<0.001	HDCV60	0.026
HDCV30	<0.001	HDCV90	0029
HDCV60	<0.001	HDCV30 vs HDCV60	<0.001
HDCV90	<0.001	HDCV90	<0.001
		HDCV60 vs HDCV90	0,999

APÊNDICE K - Tabela 22 - Comparação da avaliação por *western blotting* de VEGFR-1 entre os grupos: valor *p* da expressão de VEGFR-1 pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	VEGFR-1 valor <i>p</i> (n=3-4)	Grupo vs. grupo	VEGFR-1 valor <i>p</i> (n=3-4)
C vs CR30	0,504	CR90 vs CV30	0,016
CR60	0,627	CV60	0,004
CR90	0,604	CV90	0,076
CV30	0,592	HDC	0,999
CV60	0,272	HDCV30	0,978
CV90	0,949	HDCV60	0,999
HDC	0,512	HDCV90	0,999
HDCV30	0,104	CV30 vs CV60	0,999
HDCV60	0,339	CV90	0,999
HDCV90	0,479	HDC	0,019
CR30 vs CR60	0,999	HDCV30	0,001
CR90	0,999	HDCV60	0,009
CV30	0,011	HDCV90	0,017
CV60	0,003	CV60 vs CV90	0,945
CV90	0,055	HDC	0,006
HDC	0,999	HDCV30	<0,01
HDCV30	0,992	HDCV60	0,003
HDCV60	0,999	HDCV90	0,005
HDCV90	0,999	CV90 vs HDC	0,075
CR60 vs CR90	0,999	HDCV30	0,007
CV30	0,018	HDCV60	0,040
CV60	0,005	HDCV90	0,067
CV90	0,082	HDC vs HDCV30	0,999
HDC	0,999	HDCV60	0,999
HDCV30	0,973	HDCV90	0,999
HDCV60	0,999	HDCV30 vs HDCV60	0,999
HDCV90	0,999	HDCV90	0,999
		HDCV60 vs HDCV90	0,999

APÊNDICE L - Tabela 24 - Comparação da avaliação imuno-histoquímica de eNOS entre os grupos: valor p da expressão de eNOS pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	eNOS valor p (n=4)	Grupo vs. grupo	eNOS valor p (n=4)
C vs CR30	<0,001	CR90 vs CV30	<0,001
CR60	0,001	CV60	<0,001
CR90	0,001	CV90	<0,001
CV30	0,007	HDC	<0,001
CV60	0,001	HDCV30	<0,001
CV90	0,012	HDCV60	<0,001
HDC	0,998	HDCV90	<0,001
HDCV30	0,999	CV30 vs CV60	0,999
HDCV60	0,923	CV90	0,999
HDCV90	0,078	HDC	<0,001
CR30 vs CR60	0,998	HDCV30	<0,001
CR90	0,028	HDCV60	<0,001
CV30	<0,001	HDCV90	<0,001
CV60	<0,001	CV60 vs CV90	0,999
CV90	<0,001	HDC	<0,001
HDC	<0,001	HDCV30	<0,001
HDCV30	<0,001	HDCV60	<0,001
HDCV60	<0,001	HDCV90	<0,001
HDCV90	<0,001	CV90 vs HDC	0,001
CR60 vs CR90	0,003	HDCV30	0,001
CV30	<0,001	HDCV60	<0,001
CV60	<0,001	HDCV90	<0,001
CV90	<0,001	HDC vs HDCV30	0,999
HDC	<0,001	HDCV60	0,999
HDCV30	<0,001	HDCV90	0,397
HDCV60	<0,001	HDCV30 vs HDCV60	0,999
HDCV90	<0,001	HDCV90	0,349
		HDCV60 vs HDCV90	0,772

APÊNDICE M - Tabela 26 - Comparação da avaliação por *western blotting* de eNOS entre os grupos: valor *p* da expressão de eNOS pelo teste de ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey

Grupo versus (vs.) grupo	eNOS valor <i>p</i> (n=3-4)	Grupo vs. grupo	eNOS valor <i>p</i> (n=3-4)
C vs CR30	0,05	CR90 vs CV30	<0,001
CR60	0,017	CV60	0,021
CR90	0,004	CV90	0,487
CV30	0,999	HDC	0,402
CV60	0,773	HDCV30	0,001
CV90	0,559	HDCV60	<0,001
HDC	0,999	HDCV90	<0,001
HDCV30	0,999	CV30 vs CV60	0,904
HDCV60	0,998	CV90	0,782
HDCV90	0,739	HDC	0,998
CR30 vs CR60	0,999	HDCV30	0,999
CR90	0,999	HDCV60	0,997
CV30	0,025	HDCV90	0,765
CV60	0,533	CV60 vs CV90	0,999
CV90	0,452	HDC	0,465
HDC	0,003	HDCV30	0,524
HDCV30	0,001	HDCV60	0,343
HDCV60	<0,001	HDCV90	0,067
HDCV90	<0,001	CV90 vs HDC	0,283
CR60 vs CR90	0,999	HDCV30	0,302
CV30	0,059	HDCV60	0,166
CV60	0,729	HDCV90	0,021
CV90	0,686	HDC vs HDCV30	0,999
HDC	0,009	HDCV60	0,999
HDCV30	0,006	HDCV90	0,996
HDCV60	0,002	HDCV30 vs HDCV60	0,999
HDCV90	<0,001	HDCV90	0,938
		HDCV60 vs HDCV90	0,991

APÊNDICE N - Tabela 27 – Valores individuais do peso corporal (PC), peso do pulmão esquerdo (PPE), peso pulmonar total (PPT), e das razões PPE/PC e PPT/PC

Neonato	PC (gramas)	PPE (gramas)	PPT (gramas)	PPE/PC (gramas)	PPT/PC (gramas)
C 1	5,446	0,048	0,134	0,009	0,025
C 2	5,251	0,051	0,156	0,010	0,030
C 3	5,238	0,059	0,163	0,011	0,031
C 4	5,751	0,060	0,168	0,010	0,029
C 5	4,962	0,048	0,119	0,010	0,024
C 6	5,334	0,060	0,159	0,011	0,030
C 7	4,535	0,051	0,141	0,011	0,031
C 8	5,960	0,053	0,149	0,009	0,025
CR30 1	5,708	0,066	0,173	0,012	0,030
CR30 2	5,203	0,052	0,149	0,010	0,029
CR30 3	5,418	0,048	0,146	0,009	0,027
CR30 4	5,852	0,058	0,160	0,010	0,027
CR30 5	4,992	0,047	0,143	0,009	0,029
CR30 6	5,215	0,047	0,140	0,009	0,027
CR30 7	5,257	0,043	0,122	0,008	0,023
CR30 8	5,072	0,037	0,117	0,007	0,023
CR60 1	5,161	0,045	0,129	0,009	0,025
CR60 2	5,253	0,047	0,127	0,009	0,024
CR60 3	5,049	0,042	0,127	0,008	0,025
CR60 4	5,186	0,049	0,137	0,009	0,026
CR60 5	5,616	0,050	0,149	0,009	0,027
CR60 6	4,885	0,040	0,125	0,008	0,026
CR60 7	5,293	0,042	0,125	0,008	0,024
CR60 8	5,334	0,048	0,142	0,009	0,027
CR90 1	6,025	0,049	0,147	0,008	0,024
CR90 2	5,903	0,050	0,136	0,008	0,023
CR90 3	5,457	0,050	0,130	0,009	0,024
CR90 4	5,563	0,050	0,132	0,009	0,024

continua

Neonato	PC (gramas)	PPE (gramas)	PPT (gramas)	PPE/PC (gramas)	PPT/PC (gramas)
CR90 5	4,747	0,044	0,122	0,009	0,026
CR90 6	5,387	0,045	0,147	0,008	0,027
CR90 7	5,161	0,041	0,120	0,008	0,023
CR90 8	4,896	0,039	0,129	0,008	0,026
CV30 1	5,998	0,058	0,160	0,010	0,027
CV30 2	5,205	0,060	0,152	0,012	0,029
CV30 3	5,510	0,062	0,170	0,011	0,031
CV30 4	5,921	0,066	0,170	0,011	0,029
CV30 5	4,873	0,050	0,150	0,010	0,031
CV30 6	4,994	0,047	0,140	0,009	0,028
CV30 7	5,004	0,044	0,127	0,009	0,025
CV30 8	4,898	0,043	0,128	0,009	0,026
CV60 1	6,022	0,047	0,128	0,008	0,021
CV60 2	5,907	0,045	0,122	0,008	0,021
CV60 3	5,367	0,048	0,140	0,009	0,026
CV60 4	5,212	0,043	0,118	0,008	0,023
CV60 5	4,739	0,049	0,143	0,010	0,030
CV60 6	5,411	0,052	0,152	0,010	0,028
CV60 7	5,179	0,045	0,135	0,009	0,026
CV60 8	4,973	0,042	0,117	0,008	0,023
CV90 1	6,013	0,055	0,156	0,009	0,026
CV90 2	5,691	0,055	0,152	0,010	0,027
CV90 3	6,029	0,051	0,147	0,008	0,024
CV90 4	5,199	0,041	0,122	0,008	0,023
CV90 5	4,968	0,040	0,118	0,008	0,024
CV90 6	5,484	0,038	0,123	0,007	0,022
CV90 7	4,472	0,046	0,119	0,010	0,027
CV90 8	5,065	0,044	0,128	0,009	0,025
HDC 1	4,918	0,030	0,087	0,006	0,018
HDC 2	4,846	0,028	0,089	0,006	0,018

continua

conclusão

Neonato	PC (gramas)	PPE (gramas)	PPT (gramas)	PPE/PC (gramas)	PPT/PC (gramas)
HDC 3	4,256	0,026	0,084	0,006	0,020
HDC 4	4,170	0,031	0,089	0,007	0,021
HDC 5	4,057	0,025	0,080	0,006	0,020
HDC 6	4,003	0,030	0,090	0,008	0,023
HDC 7	4,326	0,025	0,077	0,006	0,018
HDC 8	4,260	0,031	0,090	0,007	0,021
HDCV30 1	3,913	0,025	0,082	0,006	0,021
HDCV30 2	4,137	0,021	0,064	0,005	0,015
HDCV30 3	4,496	0,035	0,093	0,008	0,021
HDCV30 4	3,909	0,027	0,087	0,007	0,022
HDCV30 5	4,706	0,019	0,066	0,004	0,014
HDCV30 6	3,652	0,016	0,057	0,004	0,016
HDCV30 7	3,502	0,015	0,057	0,004	0,016
HDCV30 8	3,631	0,032	0,081	0,009	0,022
HDCV60 1	3,296	0,017	0,062	0,005	0,019
HDCV60 2	4,849	0,029	0,089	0,006	0,018
HDCV60 3	4,309	0,026	0,079	0,006	0,018
HDCV60 4	3,794	0,021	0,061	0,006	0,016
HDCV60 5	4,446	0,024	0,074	0,005	0,017
HDCV60 6	4,117	0,021	0,072	0,005	0,017
HDCV60 7	4,209	0,030	0,087	0,007	0,021
HDCV60 8	3,723	0,025	0,072	0,007	0,019
HDCV90 1	4,358	0,029	0,093	0,007	0,021
HDCV90 2	4,318	0,026	0,076	0,006	0,018
HDCV90 3	4,908	0,025	0,082	0,005	0,017
HDCV90 4	3,853	0,015	0,053	0,004	0,014
HDCV90 5	3,951	0,020	0,065	0,005	0,017
HDCV90 6	3,996	0,017	0,062	0,004	0,015
HDCV90 7	3,861	0,022	0,069	0,006	0,018
HDCV90 8	4,377	0,030	0,087	0,007	0,020

APÊNDICE O - Tabela 28 – Valores individuais referentes à fração de espaço aéreo

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
C 1	0,363	0,371	0,391	0,427	0,339	0,399	0,448	0,390	0,409	0,339
C 2	0,498	0,511	0,522	0,512	0,490	0,509	0,567	0,511	0,425	0,490
C 3	0,467	0,424	0,542	0,445	0,438	0,474	0,461	0,407	0,512	0,438
C 4	0,398	0,349	0,381	0,474	0,446	0,452	0,424	0,476	0,475	0,446
CR30 1	0,400	0,497	0,423	0,436	0,503	0,445	0,418	0,435	0,367	0,503
CR30 2	0,543	0,527	0,488	0,584	0,463	0,365	0,407	0,402	0,460	0,463
CR30 3	0,567	0,399	0,501	0,456	0,484	0,510	0,512	0,530	0,503	0,484
CR30 4	0,456	0,595	0,527	0,504	0,525	0,445	0,538	0,609	0,594	0,525
CR60 1	0,558	0,407	0,534	0,502	0,449	0,474	0,465	0,546	0,577	0,449
CR60 2	0,538	0,574	0,580	0,445	0,531	0,541	0,567	0,614	0,533	0,531
CR60 3	0,501	0,543	0,558	0,509	0,597	0,594	0,551	0,526	0,503	0,597
CR60 4	0,600	0,435	0,418	0,419	0,372	0,324	0,285	0,537	0,518	0,372
CR90 1	0,426	0,528	0,535	0,482	0,525	0,581	0,518	0,472	0,487	0,525
CR90 2	0,611	0,522	0,555	0,580	0,545	0,587	0,535	0,570	0,536	0,545
CR90 3	0,489	0,529	0,556	0,534	0,513	0,568	0,545	0,489	0,447	0,513
CR90 4	0,563	0,489	0,435	0,476	0,501	0,415	0,492	0,489	0,488	0,501
CV30 1	0,329	0,355	0,476	0,390	0,549	0,385	0,507	0,269	0,313	0,549

continua

conclusão										
Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
HDCV30 3	0,361	0,476	0,470	0,612	0,331	0,391	0,388	0,547	0,461	0,460
HDCV30 4	0,355	0,393	0,408	0,438	0,435	0,375	0,336	0,374	0,347	0,382
HDCV60 1	0,422	0,395	0,501	0,427	0,408	0,497	0,358	0,456	0,429	0,483
HDCV60 2	0,441	0,493	0,390	0,451	0,515	0,420	0,420	0,475	0,475	0,462
HDCV60 3	0,286	0,299	0,334	0,278	0,300	0,367	0,352	0,325	0,291	0,360
HDCV60 4	0,450	0,425	0,367	0,438	0,407	0,389	0,360	0,372	0,417	0,380
HDCV90 1	0,370	0,360	0,441	0,354	0,404	0,453	0,388	0,397	0,416	0,438
HDCV90 2	0,381	0,356	0,424	0,429	0,343	0,418	0,393	0,349	0,365	0,421
HDCV90 3	0,419	0,306	0,429	0,300	0,354	0,373	0,352	0,326	0,399	0,349
HDCV90 4	0,341	0,301	0,299	0,553	0,359	0,305	0,549	0,362	0,273	0,395

APÊNDICE P - Valores individuais referentes à espessura da camada média pela histologia

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
C 1	0,313	0,301	0,299	0,277	0,312	0,339	0,294	0,282	0,280	0,294
C 2	0,299	0,282	0,272	0,331	0,281	0,317	0,292	0,300	0,295	0,252
C 3	0,320	0,290	0,312	0,286	0,315	0,284	0,296	0,299	0,304	0,288
C 4	0,280	0,306	0,302	0,289	0,269	0,293	0,249	0,301	0,301	0,388
CR30 1	0,326	0,326	0,282	0,272	0,302	0,349	0,339	0,277	0,360	0,303
CR30 2	0,346	0,326	0,318	0,337	0,300	0,295	0,288	0,282	0,296	0,320
CR30 3	0,297	0,328	0,330	0,286	0,281	0,305	0,319	0,289	0,278	0,288
CR30 4	0,288	0,350	0,311	0,289	0,302	0,292	0,339	0,283	0,287	0,285
CR60 1	0,280	0,304	0,287	0,192	0,209	0,300	0,264	0,342	0,306	0,274
CR60 2	0,290	0,258	0,308	0,209	0,292	0,209	0,261	0,279	0,272	0,283
CR60 3	0,252	0,280	0,275	0,246	0,278	0,243	0,232	0,257	0,338	0,246
CR60 4	0,250	0,275	0,282	0,262	0,294	0,318	0,290	0,250	0,270	0,303
CR90 1	0,205	0,284	0,295	0,250	0,341	0,277	0,189	0,307	0,254	0,213
CR90 2	0,271	0,269	0,271	0,265	0,299	0,271	0,253	0,215	0,293	0,209
CR90 3	0,246	0,280	0,282	0,247	0,283	0,272	0,260	0,270	0,275	0,277
CR90 4	0,253	0,277	0,238	0,319	0,264	0,324	0,224	0,194	0,293	0,202
CV30 1	0,281	0,282	0,303	0,246	0,260	0,342	0,309	0,206	0,261	0,214

continua

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
CV30 2	0,299	0,275	0,280	0,272	0,243	0,262	0,278	0,278	0,267	0,264
CV30 3	0,270	0,281	0,293	0,308	0,251	0,293	0,285	0,278	0,283	0,334
CV30 4	0,281	0,275	0,265	0,304	0,318	0,297	0,287	0,265	0,294	0,300
CV60 1	0,222	0,235	0,257	0,250	0,264	0,260	0,243	0,261	0,236	0,257
CV60 2	0,232	0,240	0,219	0,282	0,221	0,259	0,275	0,236	0,203	0,216
CV60 3	0,235	0,252	0,245	0,248	0,211	0,220	0,257	0,195	0,238	0,228
CV60 4	0,244	0,243	0,190	0,275	0,268	0,240	0,218	0,225	0,278	0,276
CV90 1	0,206	0,226	0,247	0,265	0,208	0,243	0,322	0,217	0,203	0,246
CV90 2	0,234	0,230	0,232	0,187	0,235	0,259	0,222	0,268	0,176	0,191
CV90 3	0,191	0,177	0,212	0,226	0,245	0,212	0,253	0,286	0,278	0,196
CV90 4	0,218	0,238	0,184	0,241	0,175	0,197	0,218	0,213	0,247	0,223
HDC 1	0,469	0,441	0,441	0,366	0,445	0,554	0,478	0,518	0,590	0,489
HDC 2	0,462	0,475	0,475	0,512	0,485	0,502	0,481	0,468	0,511	0,474
HDC 3	0,507	0,487	0,418	0,468	0,501	0,492	0,489	0,526	0,488	0,432
HDC 4	0,489	0,506	0,473	0,424	0,458	0,444	0,477	0,553	0,488	0,532
HDCV30 1	0,441	0,359	0,385	0,354	0,324	0,359	0,312	0,304	0,407	0,330
HDCV30 2	0,329	0,344	0,329	0,309	0,375	0,321	0,371	0,367	0,362	0,349
continua										

conclusão										
Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
HDCV30 3	0,338	0,327	0,312	0,337	0,347	0,346	0,359	0,348	0,365	0,327
HDCV30 4	0,332	0,302	0,348	0,363	0,368	0,420	0,320	0,309	0,358	0,302
HDCV60 1	0,461	0,451	0,424	0,411	0,432	0,408	0,449	0,445	0,430	0,437
HDCV60 2	0,465	0,493	0,467	0,418	0,426	0,432	0,426	0,406	0,446	0,412
HDCV60 3	0,478	0,456	0,454	0,448	0,425	0,454	0,436	0,388	0,469	0,474
HDCV60 4	0,460	0,426	0,458	0,395	0,469	0,442	0,349	0,424	0,540	0,419
HDCV90 1	0,665	0,615	0,484	0,640	0,470	0,547	0,520	0,561	0,507	0,430
HDCV90 2	0,539	0,460	0,457	0,455	0,472	0,579	0,586	0,605	0,533	0,546
HDCV90 3	0,557	0,639	0,534	0,419	0,455	0,402	0,599	0,442	0,421	0,557
HDCV90 4	0,518	0,601	0,496	0,523	0,418	0,525	0,526	0,544	0,508	0,500

APÊNDICE Q – Valores individuais referentes à espessura da camada média por imuno-histoquímica

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
C 1	0,403	0,351	0,299	0,486	0,352	0,313	0,421	0,348	0,570	0,443
C 2	0,398	0,386	0,375	0,367	0,407	0,383	0,393	0,410	0,394	0,385
C 3	0,441	0,381	0,443	0,359	0,512	0,346	0,343	0,311	0,354	0,348
C 4	0,454	0,392	0,293	0,427	0,410	0,399	0,444	0,308	0,405	0,444
CR30 1	0,415	0,421	0,411	0,402	0,364	0,422	0,424	0,405	0,394	0,425
CR30 2	0,434	0,440	0,400	0,418	0,365	0,402	0,436	0,392	0,396	0,412
CR30 3	0,391	0,420	0,432	0,426	0,406	0,424	0,412	0,413	0,394	0,357
CR30 4	0,416	0,406	0,418	0,428	0,411	0,398	0,390	0,391	0,408	0,424
CR60 1	0,399	0,317	0,396	0,375	0,384	0,394	0,356	0,390	0,388	0,396
CR60 2	0,375	0,408	0,348	0,455	0,370	0,369	0,414	0,412	0,361	0,354
CR60 3	0,382	0,383	0,374	0,356	0,386	0,401	0,379	0,358	0,383	0,381
CR60 4	0,398	0,374	0,327	0,377	0,372	0,374	0,381	0,407	0,379	0,393
CR90 1	0,344	0,361	0,350	0,375	0,369	0,372	0,373	0,371	0,346	0,361
CR90 2	0,354	0,364	0,359	0,329	0,370	0,342	0,373	0,367	0,372	0,374
CR90 3	0,333	0,360	0,349	0,371	0,348	0,378	0,360	0,343	0,385	0,363
CR90 4	0,348	0,354	0,356	0,368	0,375	0,367	0,341	0,383	0,367	0,354
CV30 1	0,353	0,374	0,381	0,378	0,362	0,375	0,397	0,384	0,366	0,379

continua

conclusão										
Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
HDCV30 3	0,472	0,451	0,443	0,447	0,443	0,424	0,466	0,455	0,441	0,469
HDCV30 4	0,441	0,442	0,434	0,470	0,462	0,456	0,441	0,463	0,455	0,462
HDCV60 1	0,506	0,474	0,524	0,478	0,517	0,513	0,517	0,515	0,528	0,512
HDCV60 2	0,514	0,511	0,508	0,503	0,470	0,507	0,507	0,491	0,503	0,507
HDCV60 3	0,499	0,515	0,516	0,501	0,509	0,502	0,490	0,517	0,516	0,476
HDCV60 4	0,509	0,496	0,513	0,501	0,508	0,501	0,493	0,517	0,507	0,503
HDCV90 1	0,595	0,595	0,569	0,608	0,564	0,562	0,592	0,596	0,576	0,579
HDCV90 2	0,591	0,568	0,576	0,544	0,614	0,589	0,586	0,564	0,588	0,596
HDCV90 3	0,589	0,600	0,585	0,584	0,568	0,592	0,571	0,563	0,588	0,589
HDCV90 4	0,595	0,585	0,594	0,563	0,564	0,607	0,566	0,567	0,598	0,570

APÊNDICE R – Valores individuais referentes à expressão imuno-histoquímica de VEGF

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
C 1	0,14	0,12	0,14	0,10	0,10	0,12	0,16	0,10	0,10	0,12
C 2	0,10	0,18	0,10	0,12	0,08	0,20	0,14	0,10	0,10	0,20
C 3	0,10	0,12	0,08	0,12	0,10	0,10	0,12	0,10	0,22	0,16
C 4	0,12	0,10	0,08	0,18	0,10	0,14	0,08	0,10	0,10	0,20
CR30 1	0,16	0,10	0,14	0,14	0,10	0,12	0,10	0,10	0,12	0,08
CR30 2	0,12	0,20	0,12	0,16	0,12	0,12	0,08	0,08	0,06	0,14
CR30 3	0,16	0,14	0,16	0,06	0,10	0,12	0,10	0,08	0,16	0,18
CR30 4	0,16	0,10	0,14	0,12	0,12	0,08	0,16	0,06	0,12	0,10
CR60 1	0,12	0,10	0,10	0,06	0,14	0,08	0,18	0,06	0,06	0,10
CR60 2	0,14	0,06	0,08	0,10	0,10	0,18	0,08	0,06	0,10	0,16
CR60 3	0,12	0,08	0,08	0,06	0,10	0,16	0,06	0,06	0,18	0,12
CR60 4	0,16	0,10	0,06	0,14	0,12	0,12	0,06	0,10	0,14	0,16
CR90 1	0,12	0,16	0,12	0,08	0,16	0,14	0,06	0,16	0,10	0,10
CR90 2	0,14	0,08	0,16	0,08	0,12	0,14	0,18	0,12	0,08	0,10
CR90 3	0,18	0,08	0,16	0,10	0,16	0,10	0,12	0,18	0,16	0,10
CR90 4	0,14	0,08	0,08	0,18	0,10	0,14	0,14	0,10	0,16	0,08
CV30 1	0,16	0,08	0,12	0,08	0,08	0,06	0,12	0,08	0,10	0,10
continua										

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
CV30 2	0,08	0,14	0,10	0,08	0,10	0,16	0,12	0,08	0,08	0,14
CV30 3	0,10	0,10	0,06	0,10	0,10	0,08	0,10	0,10	0,18	0,14
CV30 4	0,10	0,12	0,08	0,16	0,08	0,12	0,08	0,12	0,14	0,18
CV60 1	0,14	0,08	0,12	0,12	0,08	0,14	0,14	0,12	0,12	0,14
CV60 2	0,08	0,18	0,08	0,14	0,10	0,16	0,12	0,12	0,08	0,18
CV60 3	0,12	0,10	0,10	0,08	0,12	0,08	0,10	0,08	0,20	0,14
CV60 4	0,14	0,12	0,10	0,16	0,08	0,10	0,12	0,10	0,14	0,08
CV90 1	0,08	0,16	0,10	0,10	0,16	0,10	0,10	0,18	0,06	0,08
CV90 2	0,12	0,10	0,12	0,10	0,10	0,14	0,18	0,10	0,12	0,12
CV90 3	0,18	0,10	0,14	0,12	0,14	0,10	0,14	0,16	0,16	0,12
CV90 4	0,10	0,12	0,08	0,14	0,12	0,12	0,14	0,08	0,18	0,06
HDC 1	0,10	0,12	0,14	0,08	0,08	0,14	0,12	0,08	0,18	0,08
HDC 2	0,12	0,16	0,12	0,12	0,14	0,06	0,18	0,08	0,08	0,18
HDC 3	0,10	0,16	0,08	0,14	0,08	0,10	0,12	0,16	0,18	0,14
HDC 4	0,14	0,10	0,16	0,08	0,10	0,16	0,06	0,08	0,08	0,14
HDCV30 1	0,10	0,14	0,14	0,12	0,14	0,12	0,12	0,08	0,14	0,12
HDCV30 2	0,12	0,16	0,10	0,06	0,18	0,16	0,14	0,12	0,12	0,18
continua										

conclusão										
Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
HDCV30 3	0,16	0,12	0,14	0,14	0,08	0,18	0,12	0,18	0,20	0,14
HDCV30 4	0,18	0,18	0,06	0,14	0,08	0,14	0,10	0,12	0,10	0,18
HDCV60 1	0,18	0,06	0,12	0,08	0,08	0,12	0,20	0,08	0,08	0,10
HDCV60 2	0,10	0,14	0,16	0,14	0,08	0,18	0,10	0,06	0,14	0,14
HDCV60 3	0,08	0,14	0,08	0,14	0,06	0,18	0,14	0,10	0,18	0,14
HDCV60 4	0,10	0,14	0,08	0,16	0,12	0,08	0,12	0,06	0,18	0,14
HDCV90 1	0,06	0,18	0,16	0,16	0,12	0,08	0,16	0,08	0,10	0,10
HDCV90 2	0,16	0,14	0,08	0,12	0,08	0,18	0,12	0,08	0,10	0,16
HDCV90 3	0,20	0,10	0,10	0,12	0,08	0,10	0,16	0,10	0,18	0,12
HDCV90 4	0,08	0,16	0,14	0,10	0,10	0,06	0,12	0,08	0,10	0,22

conclusão										
Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
HDCV30 2	0,38	0,36	0,36	0,38	0,38	0,38	0,40	0,38	0,35	0,32
HDCV30 3	0,38	0,34	0,40	0,36	0,36	0,38	0,34	0,40	0,36	0,34
HDCV30 4	0,34	0,34	0,36	0,40	0,36	0,42	0,34	0,40	0,36	0,36
HDCV60 1	0,60	0,56	0,58	0,56	0,58	0,54	0,54	0,52	0,52	0,58
HDCV60 2	0,62	0,60	0,56	0,56	0,52	0,62	0,60	0,52	0,56	0,56
HDCV60 3	0,56	0,58	0,54	0,50	0,52	0,64	0,50	0,66	0,60	0,56
HDCV60 4	0,64	0,62	0,54	0,54	0,56	0,52	0,56	0,52	0,52	0,60
HDCV90 1	0,58	0,56	0,64	0,58	0,56	0,50	0,62	0,60	0,52	0,64
HDCV90 2	0,60	0,64	0,64	0,56	0,60	0,56	0,54	0,54	0,52	0,56
HDCV90 3	0,60	0,58	0,54	0,58	0,54	0,52	0,60	0,64	0,60	0,58
HDCV90 4	0,62	0,54	0,60	0,60	0,58	0,56	0,60	0,56	0,58	0,58

APÊNDICE T – Valores individuais referentes à expressão imuno-histoquímica de VEGFR-1

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
C 1	0,56	0,52	0,54	0,42	0,44	0,46	0,58	0,52	0,54	0,48
C 2	0,46	0,52	0,54	0,50	0,54	0,50	0,34	0,52	0,46	0,52
C 3	0,50	0,44	0,46	0,40	0,50	0,44	0,48	0,50	0,42	0,38
C 4	0,42	0,40	0,38	0,44	0,48	0,42	0,36	0,40	0,42	0,44
CR30 1	0,36	0,30	0,36	0,38	0,36	0,38	0,36	0,34	0,36	0,40
CR30 2	0,46	0,38	0,36	0,36	0,40	0,34	0,40	0,40	0,44	0,32
CR30 3	0,40	0,38	0,34	0,44	0,36	0,38	0,32	0,34	0,34	0,42
CR30 4	0,34	0,40	0,36	0,42	0,40	0,42	0,38	0,40	0,38	0,38
CR60 1	0,38	0,42	0,36	0,40	0,38	0,40	0,36	0,36	0,40	0,34
CR60 2	0,28	0,36	0,38	0,34	0,40	0,34	0,32	0,40	0,36	0,38
CR60 3	0,34	0,42	0,40	0,38	0,32	0,36	0,34	0,34	0,30	0,38
CR60 4	0,40	0,40	0,32	0,30	0,40	0,36	0,34	0,38	0,36	0,32
CR90 1	0,34	0,36	0,40	0,36	0,34	0,38	0,40	0,34	0,38	0,40
CR90 2	0,32	0,42	0,30	0,36	0,42	0,36	0,36	0,32	0,38	0,32
CR90 3	0,34	0,38	0,40	0,36	0,38	0,40	0,34	0,38	0,38	0,36
CR90 4	0,40	0,38	0,34	0,40	0,30	0,34	0,38	0,42	0,42	0,36
CV30 1	0,58	0,56	0,58	0,52	0,54	0,53	0,54	0,52	0,52	0,56

continua

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
CV30 2	0,58	0,60	0,58	0,56	0,58	0,58	0,54	0,54	0,54	0,60
CV30 3	0,60	0,56	0,58	0,56	0,58	0,58	0,56	0,54	0,54	0,58
CV30 4	0,58	0,56	0,54	0,60	0,56	0,54	0,56	0,58	0,60	0,58
CV60 1	0,60	0,60	0,60	0,58	0,56	0,58	0,56	0,60	0,60	0,56
CV60 2	0,60	0,60	0,54	0,56	0,58	0,58	0,54	0,56	0,58	0,60
CV60 3	0,56	0,54	0,58	0,54	0,56	0,58	0,60	0,56	0,54	0,60
CV60 4	0,56	0,58	0,60	0,58	0,60	0,58	0,60	0,56	0,58	0,54
CV90 1	0,58	0,54	0,52	0,44	0,48	0,50	0,54	0,52	0,56	0,50
CV90 2	0,52	0,56	0,54	0,54	0,56	0,50	0,46	0,54	0,52	0,56
CV90 3	0,54	0,50	0,50	0,46	0,54	0,56	0,52	0,54	0,50	0,48
CV90 4	0,52	0,54	0,52	0,54	0,50	0,48	0,52	0,60	0,56	0,54
HDC 1	0,22	0,26	0,22	0,24	0,20	0,20	0,22	0,26	0,28	0,30
HDC 2	0,28	0,32	0,26	0,30	0,26	0,30	0,26	0,24	0,24	0,20
HDC 3	0,24	0,24	0,26	0,28	0,28	0,26	0,24	0,26	0,28	0,22
HDC 4	0,22	0,24	0,26	0,30	0,28	0,22	0,24	0,24	0,26	0,26
HDCV30 1	0,14	0,12	0,14	0,10	0,10	0,12	0,16	0,10	0,10	0,12
HDCV30 2	0,10	0,18	0,10	0,12	0,08	0,20	0,14	0,10	0,10	0,20
continua										

conclusão										
Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
HDCV30 3	0,10	0,12	0,08	0,12	0,10	0,10	0,12	0,10	0,22	0,16
HDCV30 4	0,12	0,10	0,08	0,18	0,10	0,14	0,08	0,10	0,10	0,20
HDCV60 1	0,18	0,22	0,18	0,20	0,14	0,16	0,18	0,24	0,24	0,26
HDCV60 2	0,24	0,28	0,22	0,24	0,22	0,24	0,22	0,18	0,22	0,16
HDCV60 3	0,18	0,20	0,22	0,24	0,24	0,22	0,20	0,22	0,16	0,18
HDCV60 4	0,18	0,20	0,22	0,34	0,24	0,18	0,20	0,22	0,20	0,22
HDCV90 1	0,20	0,22	0,16	0,20	0,16	0,14	0,18	0,22	0,24	0,20
HDCV90 2	0,30	0,26	0,22	0,26	0,22	0,26	0,24	0,20	0,20	0,14
HDCV90 3	0,20	0,22	0,20	0,22	0,18	0,26	0,20	0,22	0,24	0,20
HDCV90 4	0,18	0,20	0,24	0,30	0,24	0,18	0,20	0,20	0,22	0,18

APÊNDICE U – Valores individuais referentes à expressão imuno-histoquímica de eNOS

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
C 1	0,08	0,10	0,12	0,08	0,06	0,10	0,08	0,12	0,08	0,16
C 2	0,08	0,08	0,12	0,12	0,08	0,06	0,06	0,08	0,12	0,08
C 3	0,08	0,10	0,06	0,08	0,10	0,08	0,16	0,12	0,12	0,14
C 4	0,12	0,10	0,08	0,12	0,06	0,06	0,16	0,12	0,10	0,10
CR30 1	0,22	0,20	0,22	0,18	0,16	0,14	0,20	0,18	0,18	0,16
CR30 2	0,20	0,22	0,14	0,22	0,16	0,16	0,26	0,10	0,16	0,14
CR30 3	0,18	0,22	0,12	0,22	0,18	0,18	0,12	0,20	0,18	0,12
CR30 4	0,24	0,22	0,16	0,20	0,14	0,26	0,10	0,22	0,20	0,24
CR60 1	0,20	0,24	0,20	0,22	0,20	0,10	0,14	0,22	0,14	0,20
CR60 2	0,16	0,18	0,20	0,18	0,22	0,16	0,22	0,14	0,18	0,12
CR60 3	0,18	0,18	0,08	0,20	0,20	0,18	0,16	0,14	0,16	0,20
CR60 4	0,20	0,18	0,14	0,18	0,16	0,18	0,14	0,20	0,18	0,24
CR90 1	0,24	0,28	0,24	0,26	0,24	0,10	0,12	0,26	0,18	0,24
CR90 2	0,20	0,22	0,24	0,22	0,26	0,20	0,18	0,18	0,22	0,16
CR90 3	0,22	0,22	0,08	0,24	0,24	0,22	0,20	0,18	0,20	0,24
CR90 4	0,16	0,22	0,18	0,22	0,22	0,20	0,16	0,22	0,10	0,20
CV30 1	0,10	0,14	0,12	0,12	0,10	0,12	0,10	0,12	0,16	0,18

continua

Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
CV30 2	0,10	0,14	0,16	0,12	0,14	0,10	0,06	0,16	0,12	0,12
CV30 3	0,16	0,10	0,10	0,12	0,10	0,10	0,06	0,18	0,12	0,10
CV30 4	0,10	0,12	0,12	0,14	0,12	0,10	0,18	0,14	0,10	0,16
CV60 1	0,12	0,12	0,14	0,06	0,18	0,10	0,10	0,16	0,14	0,16
CV60 2	0,14	0,12	0,14	0,10	0,12	0,12	0,16	0,10	0,18	0,08
CV60 3	0,12	0,14	0,12	0,10	0,14	0,10	0,12	0,10	0,12	0,18
CV60 4	0,14	0,12	0,16	0,10	0,14	0,10	0,12	0,10	0,14	0,14
CV90 1	0,12	0,14	0,14	0,16	0,12	0,16	0,12	0,08	0,06	0,10
CV90 2	0,14	0,12	0,12	0,10	0,12	0,14	0,16	0,08	0,12	0,08
CV90 3	0,16	0,14	0,10	0,12	0,16	0,14	0,10	0,12	0,14	0,12
CV90 4	0,10	0,16	0,12	0,14	0,10	0,10	0,12	0,10	0,16	0,08
HDC 1	0,06	0,10	0,10	0,12	0,08	0,12	0,08	0,06	0,06	0,10
HDC 2	0,08	0,10	0,06	0,06	0,10	0,08	0,16	0,04	0,08	0,06
HDC 3	0,10	0,12	0,08	0,08	0,12	0,10	0,04	0,12	0,14	0,12
HDC 4	0,04	0,12	0,08	0,14	0,10	0,10	0,12	0,08	0,16	0,06
HDCV30 1	0,08	0,08	0,06	0,10	0,06	0,06	0,08	0,10	0,08	0,08
HDCV30 2	0,08	0,06	0,06	0,10	0,06	0,14	0,14	0,10	0,06	0,16
continua										

conclusão										
Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Neonato										
HDCV30 3	0,08	0,10	0,06	0,10	0,10	0,14	0,12	0,10	0,16	0,10
HDCV30 4	0,08	0,10	0,08	0,10	0,06	0,06	0,16	0,08	0,12	0,10
HDCV60 1	0,10	0,08	0,08	0,10	0,08	0,12	0,10	0,06	0,08	0,10
HDCV60 2	0,10	0,10	0,08	0,12	0,06	0,06	0,10	0,08	0,08	0,12
HDCV60 3	0,08	0,12	0,06	0,12	0,08	0,08	0,08	0,06	0,12	0,10
HDCV60 4	0,08	0,12	0,08	0,06	0,10	0,08	0,06	0,10	0,10	0,10
HDCV90 1	0,06	0,06	0,04	0,06	0,02	0,06	0,06	0,12	0,06	0,16
HDCV90 2	0,06	0,06	0,04	0,06	0,08	0,06	0,04	0,16	0,10	0,14
HDCV90 3	0,08	0,04	0,08	0,06	0,08	0,06	0,06	0,18	0,10	0,16
HDCV90 4	0,08	0,06	0,04	0,04	0,06	0,04	0,04	0,08	0,14	0,18

APÊNDICE V - Valores individuais referentes à expressão de VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 e NOS por *western blotting*

Neonato	VEGF	VEGFR-2	VEGFR-1	eNOS
C 1	17,43	36,80	146,93	29,98
C 2	16,64	44,10	104,41	35,99
C 3	25,79	26,70	128,16	32,59
CR30 1	49,40	58,70	46,30	81,10
CR30 2	57,90	37,30	68,90	80,60
CR30 3	83,70	59,30	86,20	86,40
CR30 4	76,40	56,00	83,20	83,70
CR60 1	44,00	54,60	65,80	89,60
CR60 2	97,00	74,70	88,60	93,40
CR60 3	37,10	15,50	73,40	102,10
CR60 4	61,60	44,40	89,10	57,70
CR90 1	54,60	32,80	74,00	98,70
CR90 2	69,00	27,00	76,40	75,70
CR 90 3	85,90	38,40	93,90	70,20
CR90 4	78,00	34,50	78,50	91,00
CV30 1	35,08	19,00	176,31	30,56
CV30 2	31,95	31,40	173,57	24,85
CV30 3	13,94	13,20	161,57	38,99
CV60 1	29,10	37,70	135,82	33,77
CV60 2	42,52	12,00	257,18	78,30
CV60 3	14,54	71,04	155,93	17,48
CV90 1	21,80	78,91	124,53	46,96
CV90 2	26,37	27,61	166,94	51,72
CV90 3	31,18	47,30	172,17	74,53
HDC 1	15,95	32,85	55,60	38,80
HDC 2	35,35	50,96	101,17	36,40
HDC 3	52,15	65,06	92,84	10,30
HDCV30 1	111,71	42,59	71,19	37,10
HDCV30 2	95,06	85,69	62,35	5,30

continua

conclusão

Neonato	VEGF	VEGFR-2	VEGFR-1	eNOS
HDCV30 3	103,32	50,96	41,36	40,00
HDCV60 1	80,87	65,06	82,20	34,30
HDCV60 2	92,82	42,59	64,27	16,90
HDCV60 3	97,18	85,69	69,35	18,70
HDCV90 1	31,99	49,77	176,96	5,60
HDCV90 2	24,43	126,63	72,53	22,00
HDCV90 3	30,64	44,64	73,29	6,60

APÊNDICE W – Parecer do Comitê de Ética para Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o adendo do Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número **088/2017** sobre o projeto intitulado "*Avaliação de diferentes tempos da ventilação mecânica e estudo morfológico da remodelação das arteríolas pulmonares em neonatos de ratos com hérnia diafragmática congênita*", sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de novembro de 2017.

We declare that the Addendum to the Protocol n° 088/2017, entitled "*Assessment of different mechanical ventilation periods and morphologic study of pulmonary arterial remodeling in rats neonates with congenital diaphragmatic hernia*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 11/27/2017.

Ribeirão Preto, 27 de novembro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

APÊNDICE X – Artigo enviado para publicação.

American Journal of Obstetrics and Gynecology
Honeymoon period in mechanically ventilated newborn Sprague Dawley rats with CDH
is associated with transient changes in the VEGF signaling pathway
--Manuscript Draft--

Article Type:	Original Research
Section/Category:	Translational Obstetrics
Corresponding Author:	Karina Costa Universidade Estadual de Maringá Maringá, PR BRAZIL
First Author:	Karina Miura da Costa
Order of Authors:	Karina Miura da Costa
	Alexandre Todorovic Fabro
	Christiane Becari
	Rebeca Rodrigues Lopes Roslindo Figueira
	Augusto Frederico Schmidt
	Rodrigo Ruano
	Lourenço Sbragia
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL

Honeymoon period in mechanically ventilated newborn Sprague Dawley rats with CDH is associated with transient changes in the VEGF signaling pathway

Translational Research

Karina M. DA COSTA¹, Alexandre T. FABRO², Christiane BECARI³, Rebeca R. L. R. FIGUEIRA¹, Augusto F. SCHIMDT⁴, Rodrigo RUANO⁵, Lourenço SBRAGIA¹

1 Laboratory of Experimental Fetal Surgery, Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

2 Department of Pathology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

3 Division of Vascular and Endovascular Surgery, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

4 Division Neonatology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA

5 Division of Maternal-Fetal Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

Corresponding author:

Prof. Dr. Lourenço Sbragia

Division of Pediatric Surgery – Department of Surgery and Anatomy

Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo

Phone: +55 1636152593 (Department) / 1636150440 (Laboratory) /Fax: 1636330836

Email: sbragia@fmrp.usp.br

Av. Bandeirantes 3900 - Monte Alegre

Ribeirão Preto - SP - Brazil

Zip code: 14049-900

ABSTRACT

Background: Patients with congenital diaphragmatic hernia (CDH) have a short postnatal period of ventilatory stability called the honeymoon period, after which changes in pulmonary vascular reactivity result in pulmonary hypertension. However, the mechanisms involved are still unknown.

Objective: To evaluate mechanical ventilation's effect in the honeymoon period on VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS expression on experimental CDH in rats.

Study design: Neonates whose mothers were not exposed to nitrofen formed the control groups (C) and neonates with left-sided defects formed the CDH groups (CDH). Both were subdivided into non-ventilated and ventilated for 30, 60 and 90 minutes (n=7 each). The left lungs (n=4) were evaluated by immunohistochemistry of the pulmonary vasculature (media wall thickness), VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS. Western blotting (n=3) was performed to quantify the expression of VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS.

Results: CDH had lower biometric parameters than C. Regarding the pulmonary vasculature, C showed a reduction in media wall thickness with ventilation, while CDH presented reduction with 30 minutes, and increase with the progression of the ventilatory time (honeymoon period). CDH and C groups presented different patterns of VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS expressions. The receptors and eNOS findings were significant by immunohistochemistry but not by western blotting, while VEGF was significant by western blotting but not by immunohistochemistry.

Conclusion: VEGF, its receptors and eNOS were altered in CDH after mechanical ventilation. These results suggest that the VEGF-NO pathway plays an important role in the honeymoon period of experimental CDH.

Key Words: Arterioles, Congenital Diaphragmatic Hernia, eNOS enzyme, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, Ventilation.

INTRODUCTION

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) has an incidence of 1.09-2.67:10,000 live births (1–3), with a survival rate of 67% (4). The degree of lung hypoplasia and pulmonary hypertension (PH) are the main determinants of neonatal outcome in CDH (5,6). Newborns with CDH often experience a honeymoon period during which they have adequate oxygenation. The mechanisms involved in this period are not clearly understood, but it could shed light on potential therapeutic strategies to improve lung function in CDH.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) play a central role in the pathogenesis of this PH in CDH. VEGF regulates angiogenesis, vasculogenesis and vascular remodeling, and acts by binding to the receptors VEGFR-1 (VEGF receptor 1, also known as *fms*-like tyrosine kinase - Flt-1) and VEGFR-2 (VEGF receptor 2, also called fetal liver kinase - Flk-1) (7–11). VEGFR-1 reduces cell proliferation and organizes branching and the capillary network, while VEGFR-2 is responsible for vascular proliferation, promotes vascular branching and maintains endothelial cells (12–14). VEGF can stimulate the production of endothelial NO synthase (eNOS or NOS3) and, consequently, of NO (a major regulator of smooth muscle cells proliferation) (11,15), which, in turn, promotes VEGF upregulation (8).

Understanding how PH begins and which mechanisms lead to vascular remodeling are the key to CDH treatment evolution (16). Given the critical role of VEGF, its receptors and eNOS on vasculogenesis and angiogenesis, the aim of this study was to evaluate the effect of mechanical ventilation during the honeymoon period on the expression of these molecules and on vascular reactivity in the nitrofen CDH model.

MATERIALS AND METHODS

Animal model of CDH

After approval by the Committee on Ethics in the Use of Animals of Ribeirão Preto Medical School (CEUA #088/2017), CDH was induced in Sprague Dawley rats by the administration of 100 mg of nitrofen (2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether, Maybridge®, Cambridge, United Kingdom) dissolved in 1 mL of olive oil by oral gavage on gestational day (GD) 9.5.

Experimental groups

Rats were delivered by cesarian section on GD 21.5. Neonates were separated into eight groups

with $n=7$ neonates each: non-ventilated controls (C); controls ventilated for 30 minutes (C30), 60 minutes (C60), or 90 minutes (C90), all from dams that were not exposed to nitrofen; neonates with CDH that were not submitted to ventilation (CDH), and neonates with CDH ventilated for 30 minutes (CDH30), 60 minutes (CDH60) and 90 minutes (CDH90), all with left side defects.

Harvest

For neonates belonging to the ventilated groups, after cesarean section on GD 21.5, a tracheostomy was performed and a 24 G catheter was placed, which was connected to MiniVent type 845 (Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Germany), with a frequency of 80 breaths per minute, FiO_2 1.0, inspiration-expiration ratio 1:1, and PEEP 0 cmH₂O. The tidal volume was 13.5 mL/kg in the control groups (75 μ L) and 9 mL/kg (50 μ L) in the groups with CDH, based on a previous study by our laboratory (17). Non-ventilated animals were delivered by cesarian section, weighted, and immediately euthanized. After weighing (non-ventilated groups) or completing ventilation, the neonates were euthanized by decapitation, the lungs were removed and weighed, and the left lungs were fixed for histological, immunohistochemical (IHC) or snap frozen for molecular processing.

Morphometry

Body weight (BW), total lung weight (TLW), left lung weight (LLW) and the ratios TLW/BW and LLW/BW were measured.

Immunohistochemistry

The left lung histological sections ($n=4$ neonates from each group) were deparaffinized in xylol and dehydrated with ethanol. Endogen peroxidase blockage was prepared by incubating of the slides in a 10% solution of hydrogen peroxidase (3%) and phosphate-buffered saline (PBS) for 10 minutes. Antigen retrieval was performed by the heat-mediated method: the slides were placed in 10 mM citrate buffer, pH 6.0 for 40 minutes in Optisteam Plus steamer (model 652, Krups North America, USA), then cooled in an ice-water bath for 15 minutes, and washed in distilled water. After that, slides were incubated in a 10% goat serum blocking solution, diluted in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 minutes to block nonspecific binding sites. Depending on the protein studied, the sections were incubated with the following primary antibodies: mouse anti-VEGF 1:50 in 1% bovine serum albumin (BSA)

(sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), rabbit anti-VEGFR-1 1:50 in 1% BSA (sc-316, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), mouse anti-VEGFR-2 1:50 in 1% BSA (sc-6251, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), mouse anti-SMA 1:200 (clone 1A4, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) or rabbit anti-eNOS 1:100 in 1% BSA (sc-654, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) at 4 °C overnight. After being washed, the sections were incubated in a secondary anti-mouse antibody conjugated with horseradish peroxidase 1:100 in 1% BSA (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) or anti-rabbit 1:200 in 1% BSA (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) for two hours. As a negative control, the primary antibody was omitted. Vectastain ABC (Vector Labs, Burlingame, California, USA) and DAB (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) kits were used. The slides were counterstained with Harris' hematoxylin, dehydrated and assembled. They were photographed using a Nikon Eclipse 80i photomicroscope (Nikon Instruments Inc., Melville, New York, USA) with 40x magnification, and the images were captured using NIS-Elements (Nikon Corporation, Tochigi, Japan).

IHC evaluation of pulmonary vasculature

The external diameter (ED) (delimited by the external elastic lamina) and the internal diameter (ID) (delimited by the internal elastic lamina) of ten vessels per animal were measured using Fiji Image J (version 2.0.0-rc-67/1.52d, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). The media wall thickness (MWT) was calculated using the formula: $MWT = (ED - ID) / ED$ (18,19).

IHC evaluation of VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS expression

IHC analysis of VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS were performed based on stereology principles, using the 50 hits Weibel reticulum (20). For each slide studied, ten random fields were photographed. The calculation was made by counting the number of times the reticulum lines crossed the parenchyma, marked by the IHC, and the result was divided by the number of lines in the reticulum crossing the lung parenchyma (21,22).

Western blotting

Left lungs from n=3 animals per group were homogenized in 1 mL/organ of extraction buffer (pH 7.4) containing 100 mM Tris, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF),

0.1 mg/mL aprotinin, and 100 mM Triton-X 1% at 4 °C with a tissue homogenizer (Bio-Gen PRO200, Pro Scientific, Oxford, USA), operated at maximum speed for 30 seconds. The extracts were centrifuged at 12,000 rpm at 4 °C (Hettich Mikro 200R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Germany) for 30 minutes to remove insoluble material, and the supernatants of these tissues were used for protein quantification using the Bradford method. Then, 50 µg of protein were denatured, run on SDS-PAGE gel electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membranes in two stages at 100 V for one hour each. The membranes were blocked for 1 hour in Intercept® (PBS) blocking buffer (#927-70001, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) at room temperature. After this period, they were incubated with VEGF (1:1000, ab1316, Abcam, Burlingame, CA, USA), VEGFR-1 (1:1000, Ptglab #13687-1-AP, Proteintech Group Inc., Rosemont, IL, USA), VEGFR-2 (1:1000, Cell Signal #9698S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) or eNOS (1:2000, ab76198, Abcam, Burlingame, CA, USA), and β -Actin (1:10000, ab8226, Abcam, Burlingame, CA, USA). All antibodies were diluted in Intercept® (PBS) blocking buffer (#927-70001, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) and the membranes were incubated at 4°C overnight. After this period, the membranes were washed in TBST 1x and incubated with IRDye 680RD goat anti-rabbit (1:10000, #925-68071, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) or IRDye® 800CW donkey anti-mouse (1:10000, #926-32212, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) in Intercept® (PBS) blocking buffer (#927-70001, Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) for 1 hour at room temperature, and washed with TBST 1x. Images were acquired with Odyssey CLX Imaging System (LI-COR Corporate, Lincoln, NE, United States) and analyzed using Image Studio Lite software (version 5.2, LI-COR Inc., Lincoln, Nevada, USA). Protein expression was normalized with a loading control (β -actin).

Statistical analysis

Data were analyzed using ANOVA with Tukey-Kramer post-test and expressed as mean and standard deviation (SD). A *p* value <0.05 was considered significant. The analysis was performed using GraphPad Prism version 8.4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA).

RESULTS

Twenty-nine adult female rats were required: seven were not exposed to nitrofen and generated 72 neonates, and 22 were exposed to nitrofen and gestated 195 newborns.

Morphometry

Newborns with CDH had lower birthweight, lower lung weight and lower lung to body weight ratios, showing significant pulmonary hypoplasia compared to controls (Fig. 1).

MWT measurement

MWT was measured in histological sections immunostained for SMA (Fig. 2). Non-ventilated newborn rats with CDH had increased MWT compared to non-ventilated controls (C vs. CDH, $p<0.001$), with a decrease in the MWT at 30 minutes of ventilation (CDH vs. CDH30, $p<0.001$) followed by a progressive increase at 60 minutes (CDH30 vs. CDH60, $p<0.001$), and 90 minutes of ventilation, when it reached values similar to non-ventilated animals (CDH60 vs. CDH90, $p<0.001$). In the control groups, there was a reduction in MWT between 30 and 60 minutes (C30 vs. C60, $p<0.001$), as seen in Fig. 3.

Expression of VEGF, VEGFR-1/2 e eNOS

We observed an increased expression of VEGF at 30 minutes of ventilation in the groups with CDH (CDH vs. CDH30, $p<0.01$), and a reduction after 60 minutes (CDH60 vs. CDH90, $p<0.01$) in WB, but without statistical difference by IHC. There was no difference in the expression of VEGF among control animals (Fig. 5).

Assessment of expression. Of the VEGF receptors showed that VEGFR-1 was increased with ventilation at 30 minutes in the control groups (C vs. C30, $p<0.01$), followed by a reduction in VEGFR-1 expression with the progression of ventilation towards 90 minutes (C60 vs. C90, $p<0.01$). The groups with CDH showed a reduction of VEGFR-1 at 30 minutes of ventilation (CDH vs. CDH30, $p<0.01$) with subsequent increase (CDH30 vs. CDH60, $p<0.01$). Concerning VEGFR-2, controls showed an increased expression of VEGFR-2 with ventilation at 30 minutes (C vs. C30, $p<0.01$). In the CDH animals, there was a reduction of VEGFR-2 expression with ventilation at 30 minutes (CDH vs. CDH30, $p<0.01$) and an increase after that period (CDH30 vs. CDH60, $p<0.01$).

In the control groups, there was an increase in eNOS expression with ventilation (C vs. C30, $p=0.01$; C60 vs. C90, $p<0.01$), while the groups with CDH presented a reduction in its expression (CDH vs. CDH30, $p<0.01$).

Although WB expression presents a similar pattern to the IHC for VEGFR-1/2 and eNOS, there was no significant difference, possibly due to sample size.

DISCUSSION

Principal findings

Mechanical ventilation causes a transiente improvement in vascular lumen diameter in CDH, which is associated with an increase in VEGF expression.

Results

This study's results were consistent with other publications addressing fetal morphometry, which observed lower birth weight and pulmonary hypoplasia in newborn rats exposed to nitrofen (16,23–26).

Concerning ventilatory times, 30 minutes of the life of a newborn rat corresponds to about 13 hours of life for a human newborn; 60 minutes of the newborn rat corresponds to about 26 hours of the human newborn; and 90 minutes from the rat, 40 hours from the human (27). These periods were thus determined to study the critical moment of the adaptation from fetal to neonatal circulation, which happens in the first 24 hours of life of the human newborn (28). Previous studies have evaluated the MWT of controls and CDH after 30 minutes of ventilation, with results similar to those found here (16,24–26,29,30). However, the mechanisms of these changes in the pulmonary vasculature are not yet understood (31), and no study had evaluated this parameter with continued ventilation for 60 and 90 minutes.

Control groups showed a reduction in MWT (vasodilation) with ventilation. In groups with CDH, despite the reduction at 30 minutes, the response was not sustained after 60 and 90 minutes, and MWT increased again. These findings suggest that there is, in fact, a pathological vascular adaptation in patients with CDH, a group in which the response to ventilation corresponds to vasoconstriction and may be one of the causes of the persistence of the fetal pulmonary circulation pattern (32). We did not find publications that described this phenomenon in rats with CDH, and the hypothesis is that it corresponds to the honeymoon period.

This phenomenon was first described by Collins et al., who questioned the hypothesis that pulmonary hypoplasia was solely responsible for the CDH patients' high morbidity and mortality because, in isolation, it did not explain the transient clinical stability in the first hours of life. They postulated that this period's pathophysiology is likely due to a dynamic event, not only to pulmonary hypoplasia (33).

Little is known about the molecular mechanisms involved in the honeymoon period of patients with CDH and the changes that culminate in their end.

VEGF, a potent mitogenic and angiogenic factor (34), is one of the factors responsible for the differentiation and proliferation of endothelial cells during embryogenesis (11), and both its proper expression and that of its receptors are necessary for normal vascular development (12).

The deletion of the gene that encodes VEGFR-1 in rats results in vascular hyperplasia and failure in the formation of functional vasculature, leading to death around GD 8.5. However, with the deletion of the kinase domain without affecting the extracellular domain, there is normal vascular development (35). Such findings suggest that VEGFR-1 functions as a decoy for VEGF, restricting its access to VEGFR-2 (37,38). In addition, VEGFR-1 is believed to play a role in the maturation and maintenance of vascular integrity (13), and that its inhibition promotes VEGFR-2 expression (12). The deletion of the VEGFR-2 gene leads to early embryonic death due to a deficiency in vascular formation (14).

There is a reciprocal regulation between VEGF and NO (15,36–39). NO, synthesized by endothelial cells, is a key factor in maintaining low vascular resistance in the pulmonary circulation (40,41), which was demonstrated experimentally by Steudel et al., who recorded PH in mice with eNOS deficiency (42).

The publications that refer to the expression of VEGF, its receptors and eNOS in the CDH context present divergent results. As for VEGF, some studies have not observed changes (11,16,40,43), although Boucherat et al. have described very high levels in some neonates with CDH (40). Others found reduced (44,45) or increased levels (7,31,46,47). Few studies in the literature have evaluated the expression of VEGFR-1/2 in the context of the CDH. Previous studies carried out in our laboratory found decreased expression of VEGFR-1 (16,25,48). There are reports of increased VEGFR-2 in sheep (47) and reduced in mice (11,48). Gallindo et al. studied this receptor's expression immediately after birth and after 30 minutes of ventilation and found reduced expression after ventilation in the groups with CDH (16).

The expression of eNOS in CDH is another point where the literature is controversial. While some studies have shown no difference (24,41,49), others found reduced (40,47,50–52) or increased expression in CDH (5). Regarding the effect of mechanical ventilation, Shinkai et al. found an increase in eNOS mRNA during the first hour of ventilation, followed by a decrease after six hours (53). We hypothesized that the conflicting results found in the literature are related to the degree of PH presented in each case, and the expression of VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS can be more or less affected, according to that degree.

The increase of VEGF expression after 30 minutes of ventilation in rats with CDH could represent an attempt to “return to normality” (stimulating vasodilation), which cannot be sustained since there is a decrease in expression at 90 minutes.

As VEGFR-2 is the receptor that, despite the lower affinity for the ligand, presents greater tyrosine kinase activity, the hypothesis is that its altered expression contributes to the vascular changes found in the CDH. Considering the IHC results, the reduction of the receptor expression in CDH after ventilation for 30 minutes corresponded to the reduction of the MWT, and the increase of the expression with the progress of the ventilatory time (60 and 90 minutes) corresponded to its increase, suggesting a central role of the VEGFR-2 in the pathogenesis of CDH-related PH.

There was a reduction (significant by IHC) of VEGFR-1 expression in the groups with CDH compared to controls. Because VEGFR-1 is believed to act as a decoy (35,54), the already elevated VEGF would be more available for binding with VEGFR-2, promoting stimulation of vascular proliferation (31), which could be one of the triggers for the end of the honeymoon period. Moreover, eNOS does not have its activity increased, which was expected to happen by VEGFR-2 stimulation.

Clinical implications

Advances in CDH patients' care have led to an increase in survival, but mortality is still high and is mainly caused by PH (55). Hence, the importance of understanding the pathological changes that determine the beginning of this phenomenon.

Our results support the theory of a defect in VEGF-NO expression and signaling in CDH patients (5,11,47,56), which could be related to the altered vascular reactivity in this group, suggesting an important role of VEGF-NO in the honeymoon period of experimental CDH.

Strengths and limitations

This is the first study to evaluate VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS during the honeymoon period in experimental CDH.

The study has some limitations: it is possible that we have not found statistical differences in WB due to the sample size. However, the number of neonates was determined mainly by the difficulty in ventilating patients with CDH for 60 and 90 minutes. Furthermore, we did not expand the lungs for evaluation because there is no difference in the histological evaluation for hypoplastic lungs in the rats' toxicological model (57).

CONCLUSIONS

Understanding the pathways that trigger the onset of PH in CDH is one of the key points for the evolution in treating the disease. This study's findings show that there is a change in the expression of VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS in CDH induced by nitrofen after 30, 60 and 90 minutes of mechanical ventilation. These results suggest that the VEGF-NO pathway plays an important role in the honeymoon period in experimental CDH.

REFERENCES

1. Balayla J, Abenhaim HA. Incidence, predictors and outcomes of congenital diaphragmatic hernia: a population-based study of 32 million births in the United States. *J Matern Neonatal Med.* 2014 Sep 29;27(14):1438–44.
2. Dehdashtian M, Bashirnejad S, Malekian A, Aramesh MR, Aletayeb MH. Seasonality, Epidemiology and Outcome of Congenital Diaphragmatic Hernia in South West of Iran. *J Neonatal Surg.* 2017 Apr 15;6(2):28.
3. Shanmugam H, Brunelli L, Botto LD, Krikov S, Feldkamp ML. Epidemiology and Prognosis of Congenital Diaphragmatic Hernia: A Population-Based Cohort Study in Utah. *Birth Defects Res.* 2017 Nov 1;109(18):1451–9.
4. Seetharamaiah R, Younger JG, Bartlett RH, Hirschl RB. Factors associated with survival in infants with congenital diaphragmatic hernia requiring extracorporeal membrane oxygenation: a report from the Congenital Diaphragmatic Hernia Study Group. *J Pediatr Surg.* 2009 Jul;44(7):1315–21.
5. Mous DS, Kool HM, Wijnen R, Tibboel D, Rottier RJ. Pulmonary vascular development in congenital diaphragmatic hernia. *Eur Respir Rev.* 2018 Mar 31;27(147):170104.
6. Harting MT. Congenital diaphragmatic hernia-associated pulmonary hypertension. *Semin Pediatr Surg.* 2017 Jun;26(3):147–53.
7. Patel N, Moenkemeyer F, Germano S, Cheung MMH. Plasma vascular endothelial growth factor A and placental growth factor: novel biomarkers of pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(4):L378–83.
8. Abman SH. Impaired Vascular Endothelial Growth Factor Signaling in the Pathogenesis of Neonatal Pulmonary Vascular Disease. In: Yuan JX-J, Ward JPT, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 323–35. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 661).
9. Acarregui MJ, Penisten ST, Goss KL, Ramirez K, Snyder JM. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Human Fetal Lung In Vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Jan;20(1):14–23.
10. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996 Apr;380(6573):435–9.

11. Chinoy MR, Graybill MM, Miller SA, Lang CM, Kauffman GL. Angiopoietin-1 and VEGF in vascular development and angiogenesis in hypoplastic lungs. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2002 Jul 1;283(1):L60–6.
12. Yamamoto Y, Shiraishi I, Dai P, Hamaoka K, Takamatsu T. Regulation of Embryonic Lung Vascular Development by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors , Flk-1 and Flt-1. 2007;973(May 2006):958–73.
13. Fong G-H, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995 Jul;376(6535):66–70.
14. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X-F, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995 Jul;376(6535):62–6.
15. Parenti A, Morbidelli L, Cui X-L, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, et al. Nitric Oxide Is an Upstream Signal of Vascular Endothelial Growth Factor-induced Extracellular Signal-regulated Kinase^{1/2} Activation in Postcapillary Endothelium. *J Biol Chem*. 1998 Feb 13;273(7):4220–6.
16. Gallindo RM, Gonçalves FLL, Figueira RL, Pereira LAVD, Simões ALB, Schmidt AF, et al. Ventilation causes pulmonary vascular dilation and modulates the NOS and VEGF pathway on newborn rats with CDH. In: *Journal of Pediatric Surgery*. 2015.
17. Gallindo RM, Gonçalves FLL, Figueira RL, Simões ALB, Sbragia L. Standardization of pulmonary ventilation technique using volume-controlled ventilators in rats with congenital diaphragmatic hernia. *Rev Col Bras Cir*. 2014;41(3):181–7.
18. Hosoda Y. Pathology of pulmonary hypertension: A human and experimental study. *Pathol Int*. 1994;44:241–67.
19. 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;39(7):1066–72.
20. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*. 1966 Jul 1;30(1):23–38.
21. de Genaro IS, de Almeida FM, Hizume-Kunzler DC, Moriya HT, Silva RA, Cruz JCG, et al. Low dose of chlorine exposure exacerbates nasal and pulmonary allergic inflammation in mice. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–13.
22. Arantes-Costa FM, Lopes FDTQS, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, et al. Effects of Residual Oil Fly Ash (ROFA) in Mice with

- Chronic Allergic Pulmonary Inflammation. *Toxicol Pathol*. 2008 Jul 22;36(5):680–6.
23. Perveen S, Ayasolla K, Zagloul N, Patel H, Ochani K, Orner D, et al. MIF inhibition enhances pulmonary angiogenesis and lung development in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res*. 2019;85(5):711–8.
 24. Gonçalves FLL, Figueira RL, Simões ALB, Gallindo RM, Coleman A, Peiró JL, et al. Effect of corticosteroids and lung ventilation in the VEGF and NO pathways in congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Surg Int*. 2014;30(12):1207–15.
 25. Schmidt AF, Gonçalves FLL, Regis AC, Gallindo RM, Sbragia L. Prenatal retinoic acid improves lung vascularization and VEGF expression in CDH rat. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;
 26. Burgos CM, Davey MG, Riley JS, Jia H, Flake AW, Peranteau WH. Lung function and pulmonary artery blood flow following prenatal maternal retinoic acid and imatinib in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2018 Sep;53(9):1681–7.
 27. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775–7.
 28. Greggel RL, Murphy JD, Langleben D, Crone RK, Vacanti JP, Reid LM, et al. Congenital diaphragmatic hernia: Arterial structural changes and persistent pulmonary hypertension after surgical repair. *J Pediatr*. 1985 Sep;107(3):457–64.
 29. Wild B, St-Pierre M-E, Langlois S, Cowan KN. Elastase and matrix metalloproteinase activities are associated with pulmonary vascular disease in the nitrofen rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2017;52(5):693–701.
 30. Burgos CM, Pearson EG, Davey M, Riley J, Jia H, Laje P, et al. Improved pulmonary function in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia following prenatal maternal dexamethasone and/or sildenafil. *Pediatr Res*. 2016 Oct 4;80(4):577–85.
 31. Oue T, Yoneda A, Shima H, Taira Y, Puri P. Increased vascular endothelial growth factor peptide and gene expression in hypoplastic lung in nitrofen induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Surg Int*. 2002 May 1;18(4):221–6.
 32. Barghorn A, Koslowski M, Kromminga R, Hufnagl P, Tennstedt C, Vogel M. α -Smooth muscle actin distribution in the pulmonary vasculature comparing hypoplastic and normal fetal lungs. *Pediatr Pathol Lab Med*. 1998;18(1):5–22.
 33. Collins DL, Pomerance JJ, Travis KW, Turner SW, Pappelbaum SJ. A new approach to congenital posterolateral diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 1977 Apr;12(2):149–56.
 34. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress.

- Endocr Rev. 2004 Aug 1;25(4):581–611.
35. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9349–54.
 36. Morbidelli L, Chang CHO, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol Circ Physiol*. 1996 Jan 1;270(1):H411–5.
 37. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest*. 1997 Jun 1;99(11):2625–34.
 38. Dulak J, Józkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, et al. Nitric Oxide Induces the Synthesis of Vascular Endothelial Growth Factor by Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Mar;20(3):659–66.
 39. Papapetropoulos A, García-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997;100(12):3131–9.
 40. Boucherat O, Franco-Montoya M-L, Delacourt C, Martinovic J, Masse V, Elie C, et al. Defective angiogenesis in hypoplastic human fetal lungs correlates with nitric oxide synthase deficiency that occurs despite enhanced angiopoietin-2 and VEGF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;298(6):L849–56.
 41. Shehata SMK, Sharma HS, Mooi WJ, Tibboel D. Pulmonary Hypertension in Human Newborns With Congenital Diaphragmatic Hernia Is Associated With Decreased Vascular Expression of Nitric-Oxide Synthase. 2006;44(7):147–55.
 42. Steudel W, Ichinose F, Huang PL, Hurford WE, Jones RC, Bevan JA, et al. Pulmonary Vasoconstriction and Hypertension in Mice With Targeted Disruption of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS 3) Gene. *Circ Res*. 1997 Jul;81(1):34–41.
 43. Botden SM, Heiweggen K, van Rooij IA, Scharbatke H, Lally PA, van Heijst A, et al. Bilateral congenital diaphragmatic hernia: prognostic evaluation of a large international cohort. *J Pediatr Surg*. 2017;52(9).
 44. Chang R, Andreoli S, Ng Y-S, Truong T, Smith SR, Wilson J, et al. VEGF expression is downregulated in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2004 Jun;39(6):825–8.

45. Okazaki T, Sharma HS, Aikawa M, Yamataka A, Nagai R, Miyano T, et al. Pulmonary expression of vascular endothelial growth factor and myosin isoforms in rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 1997 Mar;32(3):391–4.
46. Shehata SMK, Mooi WJ, Okazaki T, El-banna I, Sharma HS. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in lungs of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypertension. *Thorax*. 1999;54:427–31.
47. Acker SN, Seedorf GJ, Abman SH, Nozik-Grayck E, Partrick DA, Gien J. Pulmonary artery endothelial cell dysfunction and decreased populations of highly proliferative endothelial cells in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2013 Dec 15;305(12):L943–52.
48. Sbragia L, Nassr ACC, Gonçalves FLL, Schmidt AF, Zuliani CC, Garcia PV, et al. VEGF receptor expression decreases during lung development in congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen. *Brazilian J Med Biol Res*. 2014 Feb;47(2):171–8.
49. De Rooij JD, Hösgör M, Ijzendoorn Y, Rottier R, Groenman FA, Tibboel D, et al. Expression of angiogenesis-related factors in lungs of patients with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypoplasia of other causes. *Pediatr Dev Pathol*. 2004;
50. Solari V, Piotrowska AP, Puri P. Expression of heme oxygenase-1 and endothelial nitric oxide synthase in the lung of newborns with congenital diaphragmatic hernia and persistent pulmonary hypertension. *J Pediatr Surg*. 2003 May;38(5):808–13.
51. North AJ, Moya FR, Mysore MR, Thomas VL, Wells LB, Wu LC, et al. Pulmonary endothelial nitric oxide synthase gene expression is decreased in a rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Dec;13(6):676–82.
52. Karamanoukian HL, Peay T, Love JE, Abdel-Rahman E, Dandonna P, Azizkhan RG, et al. Decreased pulmonary nitric oxide synthase activity in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 1996 Aug;31(8):1016–9.
53. Shinkai M, Shinkai T, Pirker MA, Montedonico S, Puri P. Effect of nitric oxide on the development of nitrofen-induced fetal hypoplastic lung explants. *J Pediatr Surg*. 2005;40(1):17–21.
54. Álvarez-Aznar A, Muhl L, Gaengel K. VEGF Receptor Tyrosine Kinases: Key Regulators of Vascular Function. *Curr Top Dev Biol*. 2017;123:433–82.
55. 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 19;27(9):535–49.

56. Muehlethaler V, Kunig AM, Seedorf G, Balasubramaniam V, Abman SH. Impaired VEGF and nitric oxide signaling after nitrofen exposure in rat fetal lung explants. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2008 Jan;294(1):L110–20.
57. Eastwood MP, Russo FM, Toelen J, Deprest J. Medical interventions to reverse pulmonary hypoplasia in the animal model of congenital diaphragmatic hernia: A systematic review. *Pediatr Pulmonol*. 2015 Aug;50(8):820–38.

Figure 1 – Nitrofen-induced CDH decreases birthweight and causes pulmonary hypoplasia

Newborn rats with nitrofen-induced CDH had lower body weight, left lung weight, total lung weight, total lung weight to body weight ratio (TLW/BW), and left lung weight to body weight ratio (LLW/BW). C: control. C30: control ventilated for 30 minutes. C60: control ventilated for 60 minutes. C90: control ventilated for 90 minutes. CDH: congenital diaphragmatic hernia. CDH30: CDH ventilated for 30 minutes. CDH60: CDH ventilated for 60 minutes. CDH90: CDH ventilated for 90 minutes. *p<0.05.

Figure 2 – Mechanical ventilation induces a transient improvement of the media wall thickness (MWT) of the pulmonary arteries in the CDH

A: Photomicrographs of representative histological sections showing pulmonary arteries immunostained for smooth muscle actin (SMA). B: MWT measurement of pulmonary arteries on immunostained sections showing increased MWT in CDH animals with improvement in ventilated animals at 30 and 60 minutes and return to levels similar to non-ventilated CDH animals after 90 minutes of mechanical ventilation (n=10 arteries measured in four animals per group). Dashed lines refer to the arteries' media wall thickness. CDH: congenital diaphragmatic hernia. Magnification = $\times 400$; bar = 50 μm . C: control. C30: control ventilated for 30 minutes. C60: control ventilated for 60 minutes. CDH: congenital diaphragmatic hernia. CDH30: CDH ventilated for 30 minutes. CDH60: CDH ventilated for 60 minutes. CDH90: CDH ventilated for 90 minutes.

Figure 3 - Positive immunostaining in the different groups

Representative lung sections of immunohistochemical staining for VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS. C: control. C30: control ventilated for 30 minutes. C60: control ventilated for 60 minutes. C90: control ventilated for 90 minutes. CDH: congenital diaphragmatic hernia. CDH30: CDH ventilated for 30 minutes. CDH60: CDH ventilated for 60 minutes. CDH90: CDH ventilated for 90 minutes. Magnification = $\times 400$; bar = 50 μm .

Figure 4 - VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 and eNOS immunostaining and Western blotting counts

VEGF, VEGFR-1/2 and eNOS immunostaining and western blotting counts per group. C: control. C30: control ventilated for 30 minutes. C60: control ventilated for 60 minutes. C90: control ventilated for 90 minutes. CDH: congenital diaphragmatic hernia. CDH30: CDH ventilated for 30 minutes. CDH60: CDH ventilated for 60 minutes. CDH90: CDH ventilated for 90 minutes.