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

Rebeca Rodrigues Lopes Roslindo Figueira

**Avaliação morfológica e funcional da musculatura cardíaca de
neonatos de coelhos com hérnia diafragmática congênita criada
cirurgicamente**

Ribeirão Preto
Maio 2018

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

Rebeca Rodrigues Lopes Roslindo Figueira

Bolsa Doutorado Sanduíche (SWE) Programa Ciências sem Fronteiras
Processo CNPq # 233775/2014-5 Período de Vigência: 07/2015 – 04/2016

**Avaliação morfológica e funcional da musculatura cardíaca de
neonatos de coelhos com hérnia diafragmática congênita criada
cirurgicamente**

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
defesa do título de Doutor em Ciências.
Área: Clínica Cirúrgica. Opção: Morfologia e
Medicina Experimental

Orientador no Exterior: Prof. Dr. Jose L. Peiro

Associate Professor of Surgery - University of Cincinnati - Fetal Care Center Director
Translational Research and Innovation in Endoscopic Fetal Surgery.
Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy.
Cincinnati Children's Hospital Medical Center (CCHMC)
e-mail: bcnpeiro@yahoo.es
jose.peiroibanez@cchmc.org

Orientador no Brasil: Prof. Dr. Lourenço Sbragia

Professor Associado III - Cirurgia
Divisão de Cirurgia Pediátrica
Departamento de Cirurgia e Anatomia
Escola de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo
email: sbragia@fmrp.usp.br

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que
aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).**

Ribeirão Preto
Maio 2018

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.

Figueira, Rebeca Rodrigues Lopes Roslindo. Avaliação morfológica e funcional da musculatura cardíaca de neonatos de coelhos com hérnia diafragmática congênita criada cirurgicamente.

. Ribeirão Preto, 2018.

125 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Sbragia Neto, Lourenço.

1.Hernia Diafragmática Congênita 2. Sobrecarga Cardíaca.
3.Ecocardiografia. 4. Troponina Cardíaca I.

Figueira. RRLR. **Avaliação morfológica e funcional da musculatura cardíaca de neonatos de coelhos com hérnia diafragmática congênita criada cirurgicamente.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu amado pai Ulisses Roslindo Figueira,
saudades eternas.

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Minha mãe Fátima Lopes Figueira

Por simplesmente ser. A infinidade da minha gratidão não caberia em mil páginas, jamais chegaria até aqui sem você! Te amo *tudo*!

Meu irmão Kalebe Gabriel Figueira

Por estar sempre presente, ainda que distante. Por me ensinar sobre o amor, a fé e a esperança, com muitas pitadas de humor. Você faz meus dias mais leves! É imensurável meu amor por você.

Professor Lourenço

Por seu altruísmo e capacidade de continuar a sonhar nas situações mais adversas. Por todos os ensinamentos, conselhos, dicas gastronômicas, musicais e da vida! Não há como agradecer o brilho que a sua genialidade traz no nosso dia a dia laboratorial!

Equipe do Childrens Hospital de Cincinnati Ohio

Por fazerem meus dias de trabalho mais divertidos e inusitados! Em especial ao Prof. Dr. Jose Peiro por me conceder espaço, e a oportunidade de realizar minha pesquisa em seu laboratório. À Dr. Marc Oria, sem sua ajuda jamais ultrapassaria os limites que enfrentei, e jamais alcançaria tamanho êxito nos meus resultados, obrigada por me tutoriar, mais que um professor, encontrei um amigo!

Julie Rogers

Por seu carinho e sua doçura. Em um país distante e frio, fez tudo parecer “lar”.

Juliana Pischiottin da Silva Moraes

Por sua paciência e empatia! Por se importar e sempre estar por perto pra ajudar! Obrigada Ju, pelo imenso esforço para nós pós-graduandos!

Karina e Ana Laura, colegas de Laboratório

Por todos os momentos compartilhados! Cirurgias, esfregaços, comilanças! O que seria de mim sem as guloseimas no meio da tarde!? Obrigada pela paciência, pelo amparo nos momentos difíceis e por me aguentarem nos dias mais cabulosos!

Alunos de iniciação científica

Por toda ajuda e palavras de ânimo! Por terem as dúvidas mais cabulosas e, também, por lavarem as lâminas!

Colegas pós-graduandos, Tetê, Pam, Karine, Ivair, Ricardo e Rafael

Por todas as experiências compartilhadas e sentidas! Só nós podemos traduzir as peripécias de um almoço no “Bandex”! Obrigada por fazerem parte dos momentos mais intensos da minha vida! Com animação na alegria, e afago na tristeza. Vocês são demais! Amigos pra vida toda.

Funcionários do Departamento de Cirurgia e Anatomia

Pelo apoio, cuidado e disposição em ajudar sempre que necessário. Agradeço tanto carinho.

CNPq

Pelo programa Ciências sem Fronteiras, que me concedeu a bolsa para o doutorado sanduíche.

CAPES

Pela bolsa de doutorado nesses quatro anos.

EPÍGRAFE

*“Olhando para o infinito
vejo dentro dessa imensidão
as coisas tremendas e maravilhosas
que Deus criou,
vivo cada uma delas intensamente...
me trazem paz, satisfação de estar vivo!
Sentir o vento, olhar o sol, lua, estrelas
Coisas vindas da criação de um único Deus”*

(Ulisses Figueira)

RESUMO

Figueira, RRLR. “**Avaliação morfológica e funcional da musculatura cardíaca de neonatos de coelhos com hérnia diafragmática congênita criada cirurgicamente**” 2018. 125f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A hérnia diafragmática congênita (CDH) tem incidência de aproximadamente 1:2500 nascidos vivos e mortalidade de aproximadamente 70%. A hipertensão arterial pulmonar é uma das principais complicações neonatais e pode levar à sobrecarga cardíaca. A principal estratégia de tratamento para os casos de grave hipoplasia pulmonar no período pré-natal é a traqueo-oclusão fetal (TO), no entanto, as consequências geradas ao tecido cardíaco são incertas, tanto na CDH quanto no tratamento com TO. Troponinas (cTnI e cTnT) são proteínas intracelulares miocárdicas utilizadas como indicativo de lesão cardiomiocítica. Portanto, nosso objetivo foi avaliar as alterações anatômicas, funcionais e bioquímicas dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) na CDH e CDHTO por meio das análises de ecocardiografia (ECO), histologia e bioquímica no modelo experimental de CDH. Para isso, foram utilizados neonatos de coelhos (n=10) divididos em três grupos: controle (C), hérnia diafragmática congênita (CDH), e hérnia diafragmática congênita + traqueo-oclusão (CDHTO). A cirurgia de CDH foi realizada no dia 25 da gestação (DG) da coelha (termo = 31 dias), e a TO no 27DG. A coleta foi realizada em 30DG, a ECO neonatal foi realizada imediatamente após retirada do útero e após o sacrifício os pulmões e coração foram coletados. A mortalidade da CDH foi de 20% e de CDHTO de 30%. Os resultados da ECO e da histologia mostraram hipoplasia de VE nos grupos CDH e CDHTO (* $p < 0,05$), sendo que no VD, o grupo CDH apresentou dilatação e o grupo CDHTO apresentou hipoplasia. Na imunofluorescência (IF), western blotting (WB) e RT-qPCR houve aumento de cTnI no VD dos grupos CDH e CDHTO em relação à C (* $p < 0,05$), sem alteração de expressão de cTnI no VE (NS); cTnT não apresentou alteração em ambos ventrículos (NS). Concluímos que as alterações cardíacas em CDH e CDHTO podem ser verificadas logo após o nascimento e há associação das alterações ecocardiográficas, histométricas e bioquímicas, como a hipoplasia de VE e dilatação de VD associada ao aumento tecidual de cTnI no VD no grupo CDH, indicando sofrimento cardíaco ainda no período fetal. Além disso, a realização do tratamento fetal pela TO no grupo CDH (CDHTO) não apresentou melhora das alterações do comprometimento do miocárdio.

Palavras-chave: hernia diafragmática congênita, ecocardiografia, sobrecarga cardíaca, cTnI.

ABSTRACT

Figueira, RRLR. **“Morphological and functional evaluation of the cardiac muscle in newborn rabbits with congenital diaphragmatic hernia surgically created”** 2018. 125f. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brazil, 2018.

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) has an incidence of approximately 1: 2500 live births and a mortality rate of approximately 70%. Pulmonary hypertension is one of the major neonatal complications and can lead to cardiac overload. The main treatment strategy for cases of severe prenatal pulmonary hypoplasia is fetal tracheal occlusion (TO), however, the consequences in the cardiac tissue are uncertain, in both the CDH and the TO treatment. cTnI and cTnT are myocardial intracellular proteins used as an indicative of cardiomyocyte injury that could be measured in neonates with CDH. Therefore, our aim was to evaluate the anatomical, functional and biochemical alterations in the left ventricle (LV) and in the right ventricle (RV) of neonates with CDH and CDHTO through echocardiography (ECO), histology and biochemistry analysis in the experimental rabbit CDH model. Neonates of rabbits ($n = 10$) were divided into three groups: C (control), CDH (congenital diaphragmatic hernia) and CDHTO (congenital diaphragmatic hernia + tracheal occlusion). CDH surgery was performed on day 25 of gestation (GD) of the rabbit (term = 31 days), and TO treatment on 27GD. The harvest was performed in 30GD, followed by neonatal ECO immediately after birth, then after sacrifice the lungs and heart were harvested. The mortality in the surgical groups was 20% CDH and 30% CDHTO. The ECO and histology results showed LV hypoplasia in the CDH and CDHTO (* $p < 0.05$) groups. In the RV, the CDH group presented dilation and the CDHTO group presented hypoplasia. In the immunofluorescence (IF), western blotting (WB) and RT-qPCR analysis there was an increase of cTnI in the RV of CDH and CDHTO groups in comparison with C group (* $p < 0.05$), with no alteration of cTnI expression in the LV (NS). There was no difference of cTnT expression in both ventricles (NS). We conclude that cardiac alterations in CDH and CDHTO can be verified soon after birth, also there is an association of echocardiographic, histometric and biochemical alterations, such as LV hypoplasia and RV dilation with increased cTnI tissue expression in the RV of CDH group, indicating cardiac distress still in the fetal period. In addition, the performance of CDH fetal treatment by TO, (CDHTO) group, did not improve the myocardial detriment.

Keywords: congenital diaphragmatic hernia, echocardiography, cardiac overload, cTnI.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Esquema de estudo do projeto. DG: dia gestacional. CDH: hérnia diafragmática congênita. TO: traqueo-oclusão. **Seta tracejada:** indica o procedimento cirúrgico de TO que foi realizado apenas nos grupos necessários..... 21

FIGURA 2. Cirurgia. A) Laparotomia mediana da região infra-umbilical, B) Exposição corno uterino, C) Exposição membro anterior esquerdo. CDH: D) Incisão torácica, E) Perfuração do diafragma. TO: F) Exposição traqueia, G) Oclusão traqueal por nó. H) Útero suturado. I/J) Fechamento da cavidade abdominal. K) Coelha preta após procedimento cirúrgico. L) Pós operatório – coelha monitorada em incubadora com temperatura controlada24

FIGURA 3. Representação das medidas histológicas realizadas nos ventrículos cardíacos. VD: ventrículo direito. VE: ventrículo esquerdo. Aumento 5 x. Escala 1000µm. 26

FIGURA 4 - Coleta. A) Neonato do grupo C, visualização do diafragma completo e abaixo o fígado, B) Neonato do grupo CDH, visualização do diafragma perfurado (seta branca) e fígado *up* – dentro da cavidade torácica. C) Neonato do grupo CDHTO, visualização do diafragma perfurado e pulmão expandido por TO (seta vermelha).. 33

FIGURA 5 - Gráficos da avaliação ecocardiográfica. AMV: área da valva mitral. VPAO: velocidade de pico da valva aórtica. AE/PN: razão espessura átrio esquerdo/PN. VE/PN: razão espessura ventrículo esquerdo/PN. EPVE d/PN: razão parede posterior ventricular esquerda final da diástole/PN. EPVE s/PN: razão parede posterior ventricular esquerda final da diástole/PN. TAPSE/PN: razão da função sistólica do ventrículo direito/PN; a seta preta indica o gráfico com os grupos C e CDH apenas para demonstração visual da diferença encontrada. PN: peso ao nascer. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$ 36

FIGURA 6 - Gráficos da avaliação biométrica. PN: peso ao nascer. PC: peso do coração. PC/PN: razão peso do coração/peso ao nascer. PPE: peso do pulmão esquerdo. PPT: peso pulmonar total. PPT/PN: razão peso pulmonar total/peso ao nascer. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. g: gramas. 39

FIGURA 7 – Tecido pulmonar corado por H/E. A) grupo C. B) grupo CDH. Apresentação fotomicroscópica para confirmação de diminuição da aeração pulmonar nos neonatos com CDH. Aumento 20x. Escala 100µm.....40

FIGURA 8 - Gráficos da avaliação histométrica. PE: perímetro externo. DLL: diâmetro latero-lateral. DAP: diâmetro antero-posterior. EPE: espessura da parede ventricular esquerda. EPD: espessura da parede ventricular direita. SI: septo interventricular. PIVE: perímetro interno do ventrículo esquerdo. PIVD: perímetro interno do ventrículo direito. AVE: área ventricular esquerda. AVE: área ventricular direita. * $p<0.05$. * $p<0.005$ 43

FIGURA 9 - Tecido cardíaco corado por H/E. A) grupo Controle. B) grupo CDH. C) grupo CDHTO. VD: ventrículo direito. VE: ventrículo esquerdo. Aumento 5x. Escala 1000 µm....44

FIGURA 10 – cTnI imunofluorescência do ventrículo direito. Em vermelho cTnI – filamentos do sarcômetro. Em azul DAPI - coloração nuclear. Aumento 40x. Barra = 50 µm. 46

FIGURA 11 - cTnI – imunofluorescência do ventrículo direito no grupo CDH. Em vermelho cTnI – filamentos do sarcômetro. Em azul DAPI - coloração nuclear. A) Aumento 40x. Barra = 50 µm. B) Aumento 10x. Barra = 10 µm..... 47

FIGURA 12 - cTnT – imunofluorescência do ventrículo direito. Em verde cTnT – filamentos do sarcômero. Em azul DAPI - coloração nuclear. Aumento 40x. Barra = 50 µm. 48

FIGURA 13. Gráficos das análises WB e RT-qPCR. a) Gráficos da avaliação proteica por WB. b) Gráficos da avaliação de expressão genética por RT-qPCR. **TNNI3:** cTnI. **TNN2T:** cTnT. **VD:** ventrículo direito. **VE:** ventrículo esquerdo. miRNA: micro-RNA. * $p<0.05$. ** $p<0.005$ 51

FIGURA 14. Gráfico da análise de cTnI plasmática. ng/ml: nanograma por mililitro. 52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Tabela 1. Avaliação ecocardiográfica. Média e desvio padrão ($\pm$) dos parâmetros ecocardiográficos analisados.	35
TABELA 2 - Tabela 2. Resultados biométricos. Peso corporal ao nascer (PN), peso do coração (PC) e razão PC/PN. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão em gramas	37
TABELA 3 - Tabela 3. Resultados biométricos. Peso pulmonar esquerdo (PPE), peso pulmonar total (PPT) e a razão PPT/PN. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão em gramas.....	38
TABELA 4 - Tabela 4. Análise histométrica. Média $\pm$ desvio padrão de todos os parâmetros histométricos analisados (μm).	42
TABELA 5. Resultados da avaliação por WB. Média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa (razão) de cTnI e cTnT no VD e VE, em todos os grupos. Unidade arbitrária (cTn/ β -actin)..	49
TABELA 6. Resultados da análise RT-qPCR. Média $\pm$ erro padrão da expressão sequencial de TNNI3 e TNN2T no VD e VE em todos os grupos.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDH	Hérnia diafragmática congênita
CDHTO	Hérnia diafragmática congênita + Oclusão traqueal
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
VD	Ventrículo direito
VEGFA	Fator de crescimento endotelial – A
PLGF	Fator de crescimento placentário
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
ET-1	Endotelina-1
TGF-B2	Fator de crescimento transformador b2
IL-10	Interleucina 10
NO	Óxido nítrico
cTnI	Troponina cardíaca I
cTnT	Troponina cardíaca T
ECMO	Membrana de oxigenação extracorpórea
iNO	Óxido nítrico inalatório
FETO	Oclusão traqueal fetal endoscópica
TO	Oclusão traqueal
DG	Dia gestacional
ECO	Ecocardiografia
AVM	Área da valva mitral (<i>Doppler mode</i> - mm/s).
VPAO	Velocidade de pico da valva aórtica.
VE/PN	Razão tamanho do ventrículo esquerdo/ peso nascimento.
EPVEs/PN	Espessura da parede posterior do VE na sístole/ peso nascimento.
EPVEd/PN	Espessura da parede posterior do VE na diástole/ peso nascimento.
EPVDs/PN	Espessura da parede posterior do VD na sístole/ peso nascimento.
EPVDd/PN	Espessura da parede posterior do VD na diástole/ peso nascimento.
TAPSE	Função sistólica do ventrículo direito
PN	Peso corporal no nascimento
PC	Peso do coração
PPT	Peso pulmonar total
PE	Perímetro externo

DLL	Diâmetro latero-lateral
DAP	Diâmetro antero-posterior
SI	Septo interventricular
PVIE	Perímetro ventricular interno esquerdo
PVID	Perímetro ventricular interno direito
AVE	Area ventricular interna esquerda
AVD	Area ventricular interna direita
EPE	Espessura da parede ventricular esquerda
EPD	Espessura da parede ventricular direita
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
BSA	Albumina de soro bovino

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVO	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal	19
4.2. Animais	19
4.3. Formação dos Grupos Experimentais	19
4.4. Esquema de Estudo do Experimento	20
4.5. Procedimento cirúrgico padrão comum aos dois grupos	22
4.6. Criação cirúrgica da CDH e TO	22
4.7. Avaliação ecocardiográfica.....	25
4.8. Coleta	26
4.9. Avaliação biométrica	26
4.10. Avaliação histológica cardíaca	26
4.11. Expressão de cTnI e cTnT por imunofluorescência	27
4.12. Extração e quantificação de proteínas.....	28
4.13. Expressão de cTnI e cTnT por Western Blotting	28
4.14. Avaliação quantitativa dos genes TNNT2 e TNNI3 por RT-qPCR.....	28
4.15. Quantificação plasmática quantitativa de cTnI por ELISA	29
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
6. RESULTADO	33
6.1. Avaliação ecocardiográfica.....	34
6.2. Avaliação Biométrica	37
6.3. Avaliação histológica cardíaca	41
6.4. Expressão de cTnI and cTnT por imunofluorescência	45
6.5. Expressão de cTnI and cTnT por Western Blotting	49
6.6. Expressão genética de TNNT2 (cTnT) e TNNI3 (cTnI) por RT-qPCR	50
6.7. Quantificação plasmática quantitativa de cTnI por ELISA	52
7. DISCUSSÃO	54

8. CONCLUSÃO	60
9. REFERÊNCIAS	62
10. APÊNDICES.....	70
10.1. ARTIGO 1.....	70
10.2. ARTIGO 2.....	88
11. ANEXOS	105
11.1. Anexo Ecocardiografia.....	105
11.2. Anexo Análise Biométrica	107
11.3. Anexo Histologia	110
11.4. Anexo Western Blotting	113
11.5. Anexo RT-qPCR	115

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O diafragma é um músculo situado na caixa torácica que reveste a abertura inferior do tórax e compartimentaliza o tronco nas regiões torácica e abdominal ¹. A hérnia diafragmática congênita (CDH), descrita por Bochladék em 1848, ocorre em 80% dos pacientes na região póstero-lateral esquerda, e é um defeito do desenvolvimento que resulta no não fechamento do diafragma e possibilita a protrusão das vísceras abdominais para o interior da caixa torácica ^{2, 3}.

A CDH incide em aproximadamente 1:4000 nascidos vivos no mundo ⁴. No Brasil, segundo dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) e Sistema de Informações Sobre Nascidos Vivos (SINASC) no período de 2001 a 2009, um a cada 25.000 nascidos vivos no país foram diagnosticados com a doença, sendo 1:14.000 no estado de São Paulo ⁵. A mortalidade varia com os estágios do desenvolvimento e, apesar de todos os avanços diagnósticos, é de aproximadamente 30%, porcentagem que pode ser ainda maior, se incluída a “*hidden mortality*” e pacientes afetados que não são registrados, como por exemplo: os fetos não diagnosticados, as gestantes não encaminhadas para centros de referência ou os óbitos cuja CDH não foi a causa principal ^{6,7,8}. Além disso, a CDH é caracterizada por alta morbidade e alto custo de internação ⁹.

A fisiopatologia da doença inicia-se desde o útero, o comprometimento do crescimento pulmonar e as alterações anatômicas das arteríolas pulmonares caracterizam os dois principais marcos da doença: a hipoplasia e a hipertensão arterial pulmonares ^{10,7}. Essas complicações ocorrem pela herniação das vísceras abdominais para a cavidade torácica, ocupando parte do espaço normalmente reservado para acomodar os pulmões em crescimento ³.

A hipoplasia pulmonar é caracterizada por um pulmão imaturo correspondente ao desenvolvimento incompleto do parênquima pulmonar, menor ramificação bronquiolar e vascular, reduzido tamanho do pulmão, espessamento das paredes alveolares e aumento no volume de tecido intersticial, resultando em diminuição da quantidade de bronquíolos terminais e da interface capilar para troca gasosa ^{11,12,13,14}.

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) corresponde às alterações funcionais e estruturais da vasculatura pulmonar, caracterizada por proliferação e espessamento da musculatura lisa da parede arterial ^{15,16,17}.

Em condições normais, nas primeiras 24 horas após o nascimento, a pressão arterial pulmonar cai cerca de 50% e o fluxo pulmonar aumenta de oito a dez vezes. Essas mudanças de fluxo e pressão acarretam fechamento do forame oval e do ducto arterioso^{18,19,20}. Na CDH, pela baixa complacência (hipoplasia), e pelo aumento da pressão arterial pulmonar, ocorre um contínuo *bypass* de sangue por meios destas estruturas, assim o aumento da resistência vascular pulmonar gerado pelo aumento da pressão pulmonar, resulta em sobrecarga do ventrículo direito (VD) e *shunt* da direita para a esquerda através do forame oval patente entre os átrios, causando hipertensão na artéria pulmonar, persistência do padrão de circulação fetal, hipoxemia e acidose mista^{21,22 23,24}.

Progressivamente, o aumento da demanda de oxigênio pelo miocárdio combinado à perfusão coronariana diminuída, cria uma configuração para a isquemia e falha miocárdica²⁵. Além disso, a gravidade da disfunção diastólica precoce do VD nas primeiras 48 horas de vida é preditiva de morte e correlaciona-se com o tempo de permanência e duração do suporte respiratório do neonato, sugerindo que, como em outras doenças hipertensivas pulmonares, a disfunção do VD é o mediador chave da gravidade da doença²⁶.

Devido esta sobrecarga cardíaca, alguns investigadores propõem a avaliação ecocardiográfica fetal a fim de predizer o seguimento dos fetos e neonatos com CDH^{27,28,29}. Pacientes com a doença podem apresentar, também, alterações anatômicas das câmaras cardíacas esquerdas^{30,31}, o que leva à maior dependência e consequente disfunção da circulação sistêmica do VD^{17,32}.

Embora não haja um consenso do valor da massa ventricular esquerda, a literatura demonstra que a hipoplasia do ventrículo esquerdo (VE) seria um fator de mau prognóstico^{30,33,34}. Acredita-se que, as possíveis alterações cardíacas que acompanham a hipoplasia pulmonar na CDH sejam de natureza puramente mecânica, secundárias à herniação intratorácica³⁵. No entanto, publicações recentes demonstram diferenciações moleculares cardíacas, associadas à provável adaptação do coração com fatores que vão além da compressão mecânica, como por exemplo, a sobrecarga de pressão/volume e alterações circulatórias³⁶.

Potenciais biomarcadores plasmáticos de HAP e insuficiência cardíaca podem ser encontrados na literatura, tais como fator de crescimento endotelial A (VEGFA), fator de crescimento placentário (PLGF), peptídeo natriurético tipo B (BNP), componentes do sistema renina-angiotensina, ET-1, fator de crescimento transformador b2 (TGFB2), interleucina 10 (IL-10), óxido nítrico (NO) e troponinas cardíacas I (cTnI) e T (cTnT)^{26,37,38}.

As proteínas cTnI e cTnT compõe o complexo troponina-tropomiosina responsável pela contração muscular cardíaca ^{39,40,41}. Estas proteínas são produtos de genes específicos para o coração, que na presença de lesão miocárdica são liberadas para a corrente sanguínea e, portanto, correlacionam-se de forma diretamente proporcional ao nível e tempo da lesão cardiomiocítica, padronizadas como biomarcadores clínico de infarto agudo do miocárdio em adultos ^{42,43,44}.

Durante o desenvolvimento embrionário é possível encontrar as troponinas I e T em suas formas fetais, que transitam para a forma fenotípica adulta até o período pós-natal. cTnI é altamente expressa a partir das 33 semanas de vida, e em estudos realizados durante o desenvolvimento neonatal não foi possível encontrar, em qualquer estágio de desenvolvimento, cTnI em outro órgão senão o coração ^{45,46}. cTnT é encontrada em quatro isoformas durante o desenvolvimento cardíaco (cTnT1, cTnT2, cTnT3 e cTnT4), transitando, assim como a cTnI, de sua forma fetal predominante, (cTnT1 e cTnT4) para sua forma adulta (cTnT3), no período pós-natal. Neste sentido, as alterações que ocorrem nas câmaras cardíacas secundárias à CDH poderiam ser traduzidas pela expressão de cTnI e cTnT ⁴⁷. No entanto, pelas peculiaridades da doença, não existe consenso sobre qual marcador seria, de fato, o melhor para predição de diagnóstico precoce ou de mau prognóstico na HDC ^{26,37,38}.

As principais estratégias de manejo para o cuidado de neonatos com CDH visam a preservação pulmonar e a manutenção do suporte de oxigênio para coração e pulmões. Dentre elas estão membrana de oxigenação extracorpórea (ECMO), ventilação de alta frequência oscilatória, hipercapnia permissiva, óxido nítrico inalatório (iNO) e oclusão traqueal fetal endoscópica (*FETO-fetoscopic endoluminal tracheal occlusion*) ⁴⁸.

FETO é a intervenção fetal utilizada para o tratamento da CDH, desenvolvida para promover o crescimento pulmonar e diminuir as consequências da compressão pelos órgãos abdominais. Trata-se da colocação de um balão dentro da traquéia do feto, permitindo o acúmulo de líquido intra-pulmonar, expansão do pulmão e melhora na produção de surfactante ^{49,42,43}.

O mecanismo de expansão pulmonar decorrente da oclusão traqueal (TO), associado ao aumento de espaço alveolar e maturação da vasculatura pulmonar, tem sido indicado como fator redutor da HAP e da mortalidade de neonatos com CDH. Contudo, pouco se sabe sobre as alterações cardíacas sofridas nesses neonatos e suas possíveis consequências no período pós-natal, especialmente do ponto de vista funcional e molecular ^{36,50,51}.

Alguns autores sugerem que a TO como intervenção fetal na CDH possa gerar o aumento do fluxo sanguíneo pulmonar fetal, resultando em aumento da carga prévia do VE e então a diminuição da hipoplasia cardíaca esquerda. Outra explicação alternativa para o aumento do VE, em neonatos com CDH e TO, é o deslocamento cardíaco provocado pelos órgãos abdominais, ocasionando melhora nos padrões circulatórios venosos cardíacos ^{52,53}.

Relatos sobre as alterações no VD em neonatos com CDH são ainda mais raras comparados ao VE, especialmente se tratando da combinação CDH e TO. Logo, modelos animais para o estudo da CDH têm auxiliado na compreensão da fisiopatologia da doença, e no desenvolvimento de estratégias para o tratamento fetal. Dentre eles, se destacam os modelos toxicológico e cirúrgico.

O modelo cirúrgico simula o defeito anatômico observado na CDH, e é realizado em animais de grande e médio porte, como ovelhas e coelhos. O modelo em coelhos foi proposto e padronizado por Fauza *et al.* em 1994, a cirurgia é realizada no 25 DG da coelha (termo = 30 dias) com sobrevivência fetal média de 50% e ocorrência de hipoplasia pulmonar comprovada ⁵⁴.

No atual estudo, nós hipotetizamos que as alterações cardíacas do neonato com CDH podem ser identificadas imediatamente após o nascimento, e que a FETO altera essa resposta cardíaca, comprovando a adaptação do coração com CDH no período fetal; e ainda, que o comprometimento cardíaco está diretamente ligado à sobrevida, sendo as troponinas cardíacas I e T fortes candidatas à biomarcadores prognósticos do neonato com CDH.

Para tal, avaliamos as câmaras ventriculares cardíacas direita e esquerda por meio da ecocardiografia (ECO), da avaliação histológica e da expressão cardíaca das troponinas I e T no modelo experimental de CDH e CDHTO em neonatos de coelhos.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A CDH constitui uma malformação congênita grave e, apesar do aperfeiçoamento e dos avanços obtidos nos últimos anos, incluindo a intervenção fetal FETO e as inovações no manejo do neonato, apresenta elevada mortalidade decorrente da hipertensão arterial pulmonar e da descompensação cardíaca.

A comparação do grau de comprometimento sobre o miocárdio em neonatos com CDH, e CDH tratados com TO por meio da avaliação das troponinas cardíacas I e T associado à ecocardiografia e avaliação histológica, pode trazer resultados inéditos aos estudos relacionados à doença, o que poderia indicar os biomarcadores estudados como possíveis marcadores prognóstico da CDH. Além disso, a fisiopatologia do defeito, que implica na disfunção miocárdica, ainda não está bem compreendida, e seu estudo pode contribuir para o melhor manejo dos neonatos com CDH.

OBJETIVOS

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Estudar as alterações ventriculares esquerda e direita no modelo experimental de CDH e CDHTO em coelhos.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar:

1. Os parâmetros ecocardiográficos de neonatos correlacionando os resultados com o grau de comprometimento miocárdico.
2. A estrutura cardíaca, por análise histométrica dos ventrículos esquerdo e direito.
3. A expressão das troponinas I (cTnI) e T (cTnT) nos ventrículos esquerdo e direito correlacionando os resultados com o grau de comprometimento miocárdico.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Avaliação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

O experimento foi desenvolvido no *Children's Hospital of Cincinnati Medical Center – United States of America*, e aprovado pelo *Committe on Animal Research* IACUC#2013-0294.

4.2. Animais

Coelhas prenhas foram mantidas em biotério apropriado com temperatura controlada (24°C) sobre condições de barreira (prevenção contra contaminação) com ração e água padrões *ad libitum* no *Children's Hospital of Cincinnati Medical Center Animal*.

4.3. Formação dos Grupos Experimentais

Neonatos de coelhas foram divididos em 3 grupos experimentais resultando o total de 30 neonatos (n=10 por grupo) e 16 de coelhas prenhas.

Grupo I (**C**): neonatos de coelha com 30 dias de gestação (DG) (termo) livres de qualquer manipulação, denominado grupo controle C (10 fetos).

Grupo II (**CDH**): fetos de coelha submetidos à indução cirúrgica de hérnia diafragmática congênita à esquerda (25DG), coletados com 30DG, denominado grupo CDH (10 fetos).

Grupo III (**CDHTO**): fetos de coelhas prenhes submetidos à indução cirúrgica de CDH (25DG), e depois submetidos à cirurgia de traqueo-oclusão (TO) (27DG), coletados com 30DG, denominado grupo CDHTO (10 fetos).

4.4. Esquema de Estudo do Experimento

Figura 1. Esquema de estudo do projeto. DG: dia gestacional. CDH: hérnia diafragmática congênita. TO: traqueo-oclusão. Seta tracejada: indica o procedimento cirúrgico de TO que foi realizado apenas nos grupos necessários.

4.5. Procedimento cirúrgico padrão comum aos dois grupos

Todas as coelhas da raça *New Zealand* foram devidamente pesadas e catalogadas em fichário próprio. As coelhas prenhes com peso entre 3,7 a 4,5 kg na idade gestacional de 25 dias (termo = 30 dias) foram submetidas à cirurgia para indução da CDH e na idade gestacional de 27 dias foram submetidas à cirurgia de TO (Figura 2). As coelhas grávidas foram pesadas e anestesiadas com ketamina (35 mg/kg) (Parke-Davis) e xilazina (5 mg/kg) (Butler Animal Health) e isoflurano por intubação endotraqueal (Piramal Critical Care Inc.) para manutenção da anestesia. O fluxo anestésico foi padronizado de acordo com a respiração da coelha por meio de uma peça em T, quando em respiração espontânea, era fornecido 1 litro por minuto de oxigênio umidificado e 2% a 2,5% de isoflurano, caso contrário, foi utilizado um ventilador com a mesma mistura de gases. O sítio cirúrgico foi limpo com clorexidina a 2%, alternando com 70% de álcool isopropílico a 70% de iodeto. A temperatura corporal foi mantida a 37°C com uma manta térmica aquecida, e uma solução salina normal aquecida com 5% de dextrose foi administrada a uma taxa de 4 mL/kg/h. Saturação de oxigênio, frequência cardíaca, dióxido de carbono (CO₂) transcutâneo e temperatura corporal central foram monitorados. As cirurgias foram realizadas sob condições estéreis. Na região da incisão no plano hipodérmico e muscular, foram injetados 4 ml de anestésico local de Cloridrato de Lidocaína a 1% sem vasoconstritor (Xylestesin[®]) para evitar dor na abertura abdominal. A seguir, foi realizada laparotomia mediana da região infra-umbilical até a região da sínfise púbica, o que permitiu uma boa exposição da cavidade inferior peritoneal. A bexiga e útero foram identificados (coelhos possuem útero bicornio), e um dos cornos foi delicadamente exposto fora da cavidade abdominal. Os fetos foram identificados no sentido do ovário em direção ao cérvix uterino. O feto mais próximo do ovário foi denominado feto 1, o procedimento cirúrgico para criação de hérnia diafragmática foi realizado no feto 1 de cada corno (25DG). Para formação dos grupos CDHTO, a oclusão traqueal foi realizada nos mesmos fetos no 27DG. Os fetos não manipulados foram usados como controle.

4.6. Criação cirúrgica da CDH e TO

CDH: o procedimento cirúrgico para indução da hérnia diafragmática foi de acordo com o modelo de Fauza D. *et al*⁵⁴, no 25DG da coelha (termo =30dias). Após identificação da

posição fetal, uma sutura em bolsa com fio de Prolene 50[®] foi realizada na altura do tórax fetal visto por transparência, então procedeu-se com abertura da parede uterina, evitando comprometer os vasos laterais de irrigação, o membro anterior esquerdo (pata esquerda) foi gentilmente apanhado e exposto para fora da cavidade uterina. Uma pequena dose de 0,2 ml de Cloridrato de Lidocaína a 1% sem vasoconstritor (Xylestesin[®]) foi injetada no plano hipodérmico na região póstero lateral do tórax esquerdo próximo das últimas costelas; a seguir, uma incisão de 3 mm com tesoura microcirúrgica foi realizada neste local até entrar na cavidade torácica, então o músculo diafragma foi apanhado com micro pinça e uma incisão foi realizada para confecção da hérnia diafragmática, após procedimento, o tórax foi fechado com fio de Prolene[®] 60. Ao término do experimento, 2 ml de soro fisiológico (NaCl 0,9%) morno foram administrados na cavidade amniótica antes do fechamento da parede uterina para repor o líquido amniótico perdido. Durante todo procedimento cirúrgico o corno uterino foi irrigado com soro fisiológico (NaCl 0,9%) morno, para evitar o ressecamento do útero. Após o término da confecção da CDH fetal, o corno uterino foi novamente recolocado na cavidade abdominal, e o mesmo procedimento foi realizado no feto do corno uterino oposto. Terminada a cirurgia nos dois fetos, a cavidade abdominal foi fechada em um plano com fio de Vicryl[®] 2.0 com sutura contínua, e a pele suturada com fio de Nylon[®] 4.0 com ponto contínuo intra-dérmico. Ao final da cirurgia, 25 mg/kg de peso animal de Cefazolina Sódica (1 frasco=1g) e 2,5 mg/kg de Acetato de Medroxiprogesterona (Depo Provera[®] - 1 frasco=150mg/ml) foram administrados via intramuscular para evitar abortamento e infecção.

TO: A cirurgia de traqueo-oclusão foi realizada com 27DG, com os mesmos cuidados da cirurgia de CDH. O procedimento cirúrgico seguido foi de acordo com o modelo de Debeer *et al*⁵⁵. No 27º DG foi realizada abertura uterina e exposição da cabeça e pescoço fetais. A traquéia foi exposta usando uma linha média de incisão e então foi realizada a traqueo-oclusão por nó com fio de Vicryl[®] 4.0. Após procedimento, a cabeça do feto foi retornada ao útero e a cavidade uterina fechada com fio de de Vicryl[®] 2.0 com sutura contínua, em seguida, a pele foi fechada com fio de Nylon[®] 4.0 com ponto contínuo intra-dérmico (Figura 2).

Figura 2. Cirurgia. A) Laparotomia mediana da região infra-umbilical, B) Exposição corno uterino, C) Exposição membro anterior esquerdo. CDH: D) Incisão torácica, E) Perfuração do diafragma. TO: F) Exposição traquéia, G) Oclusão traqueal por nó. H) Útero suturado. I/J) Fechamento da cavidade abdominal. K) Coelha prenha após procedimento cirúrgico. L) Pós operatório – coelha monitorada em incubadora com temperatura controlada.

4.7. Avaliação ecocardiográfica

No 30DG, as coelhas prenhas foram anestesiadas para realização da ECO (n=10 por grupo). Cada feto foi removido do útero, pesado e colocado em uma mesa pré-aquecida (37°C) almofadada, com exposição a 2 L/min de oxigênio inalatório durante 2 – 3 minutos, e então, encaminhado para ECO. Os neonatos do grupo CDHTO tiveram as traquéias intubadas com Abocath 18G para liberação da via aérea logo após retirada do útero, ou seja, um procedimento de EXIT (*ex utero intrapartum treatment*) experimental, permitindo a entrada de ar para os pulmões o que marca a transição da vida fetal para a neonatal.

A ECO foi realizada por meio do aparelho Vevo 770 High-Resolution in Vivo Micro-Imaging System=[, Toronto, Canada) and RMV 707B Scanhead (VisualSonics Inc). Medidas anatômicas e funcionas dos ventrículos esquerdo e direito foram mensuradas pela visualização das quatro câmaras cardíacas, e uma pequena fração dos ventrículos esquerdo e direito foi obtida pelo modo-M a partir do eixo curto paraesternal.

Para fins de melhor compreensão, são apresentados apenas os parâmetros que apresentaram diferenças diretamente ligadas ao objetivo do presente estudo:

- AVM: área da valva mitral (*Doppler mode*- mm/s).
- VPAO: velocidade de pico da valva aórtica.
- VE/PN: razão tamanho do ventrículo esquerdo/ peso nascimento.
- EPVEs/PN e EPVEd/PN: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole e diástole, respectivamente/ peso nascimento.
- EPVDs/PN e EPVDd/PN: espessura da parede posterior do ventrículo direito na sístole e diástole, respectivamente/ peso nascimento.
- TAPSE (função sistólica do ventrículo direito): medida da excursão sistólica do plano anular tricúspide usado para avaliar a função longitudinal do ventrículo direito. Indicador de hipertensão pulmonar.

Todos os valores de parâmetros anatômicos foram divididos pelo PN (peso ao nascer) de cada indivíduo estudado.

4.8. Coleta

Após a ECO, o neonato foi anestesiado com uma pequena dose de ketamina (35 mg/kg) (Parke-Davis), e foi realizada laparotomia mediana para confirmação visual da CDH/ CDHTO, e a seguir , esternotomia para coleta do pulmão e coração, que foram mensurados e encaminhados para histologia (4 amostras por grupo) e biologia molecular (6 amostras por grupo). Após a colheita de todos os fetos, a coelha foi eutanaziada usando um composto de thionembutal e cloreto de potássio por via intravenosa.

4.9. Avaliação biométrica

Para análise biométrica foi realizada avaliação de peso corporal no nascimento (PN), peso cardíaco (PC) e a razão PC/PN. Para avaliar a severidade e o crescimento pulmonar nos grupos CDH e CDHTO, mensurou-se o peso pulmonar total (PPT) e a razão PPT/PN.

4.10. Avaliação histológica cardíaca

Os cortes histológicos do coração foram realizados em plano transversal, logo abaixo do septo atrioventricular, corados com hematoxilina-eosina e fotografados em microscópio Leica (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Inglaterra) e videocâmera (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça). Os parâmetros histológicos medidos foram: a) perímetro externo (PE), b) diâmetro latero-lateral (DLL), c) diâmetro antero-posterior (DAP), d) septo interventricular (SI) e) perímetro ventricular interno esquerdo (PVIE) e direito (PVID), f) área ventricular interna esquerda (AVE) e direita (AVD), g) espessura da parede ventricular esquerda (EPE), e direita (EPD) utilizando-se o programa Leica Qwin (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, Inglaterra) (Figura 3). Foram realizadas aferições de cada parâmetro em quatro amostras histológicas por grupo, e para a análise de espessura da camada dos ventrículos direito e esquerdo (EPE e EPD) foi realizada a média de cinco diferentes campos por amostra, gerando um total de 20 campos por grupo com aumento 5X (escala 1000µm).

Figura 3. Representação das medidas histológicas realizadas nos ventrículos cardíacos. VD: ventrículo direito. **VE:** ventrículo esquerdo. Aumento 5 x. Escala 1000µm.

4.11. Expressão de cTnI e cTnT por imunofluorescência

Cortes transversais ventriculares foram fixados em formalina a 10% neutra tamponada no período de 24-36h, processados rotineiramente e incluídos em parafina. Cortes de tecido de quatro microns de espessura foram desparafinizados em xilol por 5 min. As lâminas foram reidratadas em álcoois graduados. A atividade da peroxidase endógena foi inibida por incubação em 3 % de peroxidase de hidrogênio em metanol, durante 15 min, seguido por uma lavagem de 15 min em solução salina tamponada com fosfato (PBS) + Triton (1%) e duas de 15 min em PBS. As lâminas em seguida foram incubadas em bloqueio PBS+BSA (5%) durante 20 min e depois incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários: cTnI (1:100) (ab10231 - Abcam Cambridge, MA 02139-1517 USA) e cTnT (1:500) (ab10214, Abcam Cambridge, MA 02139-1517, USA) diluídos em PBS+BSA (5%). Após a remoção dos anticorpos primários com três lavagens de 5 min em PBS, as lâminas foram lavadas em quatro banhos de 10 min com PBS. As lâminas então, foram incubadas por 1h no anticorpo secundário anti-mouse (1:1000) (ab150117, goat Anti-Mouse IgG H&L - Alexa Fluor® 488, Abcam Cambridge, MA 02139-1517 USA) diluído em PBS+BSA (5%). Após isso, DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) foi acrescentado para coloração nuclear (azul) e colocação das lamínulas. Foram utilizadas quatro lâminas histológicas por grupo para análise.

4.12. Extração e quantificação de proteínas

Proteínas foram extraídas dos ventrículo esquerdo e direito separadamente. Cada 20-40mg de tecido foi homogeneizado por sonicação (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) usando tampão T-PER (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) + Proteinase K + PhosphoSTOP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), o homogenato foi centrifugado a 1000 rpm por 5 min. A concentração total de proteína foi verificada por método do ácido bicinchonínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolína) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), seguindo as orientações da companhia.

4.13. Expressão de cTnI e cTnT por Western Blotting

Proteínas cardíacas dos ventrículos esquerdo e direito (20ug) foram separadas por eletroforese em gel gradiente de acrilamida 4-12% por 50 min à 200 V, e transferidas para membrana PVDF (Life Technologies, CA, USA) por 1,5h à 20V. Depois de bloqueio com BSA (5%) por 1 hora, as membranas foram incubadas com os anticorpos cTnI (1:100) (ab10231 - Abcam Cambridge, MA 02139-1517 USA), cTnT (1:500) (ab10214, Abcam Cambridge, MA 02139-1517, USA) e β -actina (1:10000) (ab8226, Abcam, Cambridge, MA, USA) *overnight* à 4°C. As membranas foram lavadas com PBS-T (triton 1%) e incubadas em anticorpo secundário anti-mouse (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody) por 1h e depois reveladas usando o kit SuperSignal WestPico Chemiluminescent substrato (Thermo Scientific, Rockford, USA) por 5 minutos. As bandas foram quantificadas usando o programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) e normalizadas pelo controle β -Actina. Para cada grupo foram utilizadas seis amostras diferentes.

4.14. Avaliação quantitativa dos genes TNNT2 e TNNT3 por RT-qPCR

Os ventrículos esquerdo e direito foram homogeneizados em tampão RLT e o RNA foi extraído usando o kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Science, Hilden, Germany), de acordo com as instruções da empresa. Os ácidos nucleicos foram analisados quantitativamente por espectrofotometria (Epoch Biotek, Biotek Instruments, Winooski, Vermont, USA). 1ug de RNA/amostra foi retrotranscrita usando kit RT² First strand (Qiagen Sciences, Germantown,

MD, USA), e então, processadas em RT-qPCR (*quantitative reverse transcription PCR – polymerase chain reaction*) pelo *probe* específico TaqMan^R Gene Expression Assay: TNNT2 (cTnT) e como controle interno HPRT1 (hipoxantina fosforribosiltransferase) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A quantificação relativa da expressão da sequência específica foi realizada baseada em $2^{-\Delta\Delta C}$ e a progressão do erro foi calculada. Foram utilizadas seis amostras diferentes por grupo.

Sequência Genética estudada:

TNNT2 *sequence*: 5'-ACCGAGAAGGAAAACCGGGAGGTGG-3'

HPRT1 *sequence*: 5'-GAGTGGACTTCGACGACATCCACCG-3'

4.15. Quantificação plasmática quantitativa de cTnI por ELISA

Para quantificação dos níveis plasmáticos de cTnI foram utilizados 200µl de plasma por amostra, as amostras que não apresentaram esse volume, ou que foram contaminadas, não puderam ser usadas para essa análise, portanto, somaram-se seis amostras do grupo C, dez amostras do grupo CDH, e duas do grupo CDHTO. A detecção foi realizada por meio do kit ELISA - ULTRA-SENSITIVE MOUSE CARDIAC TROPONIN-I (Life Diagnostics, Inc., Cat. No. CTNI-1-US, West Chester, PA, USA) seguindo-se o protocolo da companhia. A concentração de cTnI na amostra foi calculada por absorbância à 450nm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparações estatísticas foram feitas usando análise de variância *one-way* (ANOVA) com pós teste de Tukey para os resultados morfológicos e de ECO, e análise Kruskal-Wallis com pós test *Dunn's* foram realizadas para os resultados de histometria, western blotting e expressão gênica. Os valores de significância foram considerados quando $p < 0.05$. O programa usado para análise estatística dos dados foi o GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADO

6. RESULTADO

No presente estudo foram utilizadas 16 coelhas *New-Zealand*, que gestaram 42 fetos com 30 neonatos sobreviventes (10 por grupo). Para as análises de histologia e imunofluorescência (IF) foram destinados 4 neonatos por grupo, e para as análises de biologia molecular foram utilizados 6 neonatos. A mortalidade no grupo CDH foi de 20% e no grupo CDHTO foi de 30% (Figura 4). Foram escolhidos para os grupos CDH e CDHTO os neonatos que apresentaram CDH em escala C ou D, ou seja, que atingisse 50% ou mais da parede postero-lateral do diafragma, de acordo com Lally K. et al ⁵⁶.

Figura 4. Coleta. A) Neonato do grupo C, visualização do diafragma completo e abaixo o fígado, B) Neonato do grupo CDH, visualização do diafragma perfurado (seta branca) e fígado *up* – dentro da cavidade torácica. C) Neonato do grupo CDHTO, visualização do diafragma perfurado e pulmão expandido por TO (seta vermelha).

6.1. Avaliação ecocardiográfica

Os parâmetros ecocardiográficos AVM e VPAO apresentaram-se menores no grupo CDHTO, o primeiro comparado ao grupo C e o segundo ao grupo CDH (* $p < 0,05$). A razão VE/PN foi menor no grupo CDHTO comparado ao grupo C (* $p < 0,05$). As razões EPVEd/PN e EPVEs/PN apresentaram-se menores no grupo CDH comparado ao grupo C (* $p < 0,05$). A razão TAPSE/PN exibiu diminuição nos grupos CDH e CDHTO em comparação com o grupo C (** $p < 0,005$); mas foram similares quando comparados entre si (NS). (Tabela 1, Figura 5).

Tabela 1. Avaliação ecocardiográfica. Média e desvio padrão ($\pm$) dos parâmetros ecocardiográficos analisados.

	C (n=10)	CDH (n=10)	CDHTO (n=10)
AVM (mm/s)	192,62 (34,33) ^{*c}	180,15 (36,19)	133,11 (29,28) ^{*a}
VPAO (mm/s)	157,92 (47,80)	172,4 (37,95) ^{*c}	115,13 (62,61) ^{*b}
VE/PN (mm)	2,73 (0,78) ^{*c}	2,48 (1,07)	1,84 (0,77) ^{*a}
EPVE d/PN (mm)	0,03 (0,01) ^{*b}	0,02 (0,00) ^{*a}	0,03 (0,01)
EPVE s/PN (mm)	0,04 (0,01) ^{*b}	0,03 (0,00) ^{*a}	0,04 (0,01)
TAPSE/PN (mm)	0,03 (0,01) ^{**b,c}	0,02 (0,00) ^{**a}	0,02 (0,00) ^{*a}

PN: peso ao nascer. **AVM:** área da valva mitral. **VPAO:** velocidade de pico da valva aórtica. **VE/PN:** razão espessura ventrículo esquerdo/PN. **EPVE d/BW:** razão parede posterior ventricular esquerda final da diástole/PN. **EPVE s/PN:** razão parede posterior ventricular esquerda final da diástole/PN. **TAPSE/PN:** razão da função sistólica do ventrículo direito/PN. **a:** comparação com o grupo C. **b:** comparação com o grupo CDH. **c:** comparação com o grupo CDHTO. ^{*} $p < 0,05$. ^{**} $p < 0,005$.

Figura 5. Gráficos da avaliação ecocardiográfica. AVM: área da valva mitral. VPAO: velocidade de pico da valva aórtica. AE/PN: razão espessura átrio esquerdo/PN. VE/PN: razão espessura ventrículo esquerdo/PN. EPVE d/PN: razão parede posterior ventricular esquerda final da diástole/PN. EPVE s/PN: razão parede posterior ventricular esquerda final da diástole/PN. TAPSE/PN: razão da função sistólica do ventrículo direito/PN. PN: peso ao nascer. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$.

6.2. Avaliação Biométrica

PN foi menor no grupo CDHTO comparado aos grupos C e CDH (** $p < 0,005$). Não houve diferença em PC e na razão PC/PN (Tabela 2, Figura 6). A avaliação de peso pulmonar foi realizada para constatação da diminuição do tamanho do pulmão, os resultados demonstraram PPE menor no grupo CDH em comparação ao grupo C (** $p < 0,005$), não apresentando diferença quando comparado ao grupo CDHTO (NS). O PPT, e a razão PPT/PN foram menores no grupo CDH (** $p < 0,005$) e maiores no grupo CDHTO (** $p < 0,005$). (Tabela 3, Figura 6). A Figura 7 apresenta duas fotomicrografias, a do grupo controle e do grupo CDH para melhor compreensão visual das alterações histológicas pulmonares.

Tabela 2. Resultados biométricos. Peso corporal ao nascer (PN), peso do coração (PC) e razão PC/PN. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão em gramas.

	PN (g) (n=10)	PC (g) (n=10)	PC/PN (g) (n=10)
C	40,42 ($\pm 5,58$) ^{**c}	0,255 ($\pm 0,076$)	0,0063 ($\pm 0,0015$)
CDH	39,59 ($\pm 4,47$) ^{*c}	0,240 ($\pm 0,053$)	0,0061 ($\pm 0,0016$)
CDHTO	35,45 ($\pm 3,96$) ^{**a*b}	0,260 ($\pm 0,041$)	0,0074 ($\pm 0,0012$)

a: comparação com o grupo C. **b:** comparação do grupo CDH. **c:** comparação com o grupo CDHTO. g: gramas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$.

Tabela 3. Resultados biométricos. Peso pulmonar esquerdo (PPE), peso pulmonar total (PPT) e a razão PPT/PN. Dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão em gramas.

	PPE (g) (n=10)	PPT (g) (n=10)	PPT/PN (g) (n=10)
C	0,364 ($\pm$ 0,074) ^{**b}	0,907 ($\pm$ 0,235) ^{**b}	0,022 ($\pm$ 0,003) ^{**b}
CDH	0,195 ($\pm$ 0,062) ^{**a,c}	0,498 ($\pm$ 0,126) ^{**a,c}	0,013 ($\pm$ 0,003) ^{**a,c}
CDHTO	0,335 ($\pm$ 0,162) ^{**b}	0,999 ($\pm$ 0,431) ^{**b}	0,028 ($\pm$ 0,011) ^{**b}

a: comparação com o grupo C. **b:** comparação do grupo CDH. **c:** comparação com o grupo CDHTO. g: gramas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$

Figura 6. Gráficos da avaliação biométrica. PN: peso ao nascer. PC: peso do coração. PC/PN: razão peso do coração/peso ao nascer. PPE: peso do pulmão esquerdo. PPT: peso pulmonar total. PPT/PN: razão peso pulmonar total/peso ao nascer. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$. g: gramas.

Figura 7. Tecido pulmonar corado por H/E. A) grupo C. B) grupo CDH. Apresentação fotomicroscópica para confirmação de diminuição dos espaços aéreos pulmonares nos neonatos com CDH. Aumento 20x. Escala 100µm.

6.3. Avaliação histológica cardíaca

Na análise de histometria o PE foi menor no grupo CDHTO comparado a todos os outros grupos (** $p < 0,005$). O DLL apresentou-se diminuído no grupo CDHTO, comparado aos grupos C e CDH (** $p < 0,005$). Não houve diferença nas análises de DAP e SI entre os grupos (NS). EPE foi menor no grupo CDH comparado ao grupo C (* $p < 0,05$), sem diferença entre os demais grupos (NS). Da mesma maneira a EPD foi menor em CDH comparado ao grupo C (* $p < 0,05$), sem diferença entre os demais grupos (NS). O PVIE apresentou-se diminuído nos grupos CDH e CDHTO comparados ao grupo C (** $p < 0,005$). O PVID apresentou-se aumentando no grupo CDH comparado a todos os outros grupos (** $p < 0,005$), e diminuído no grupo CDHTO comparado a todos os outros grupos (* $p < 0,05$). A AVE foi menor nos grupos CDH e CDHTO comparado ao grupo C (** $p < 0,005$), sem diferença entre os demais grupos (NS). AVD foi maior em CDH quando comparada aos grupos C e CDHTO (* $p < 0,05$) (Tabela 4, Figura 8, Figura 9).

Tabela 4. Análise histométrica. Média $\pm$ desvio padrão de todos os parâmetros histométricos analisados (μm).

	C (n=4)	CDH (n=4)	CDHTO (n=4)
PE	19380,0 ($\pm 782,1$) ^{**c}	19081,4 ($\pm 435,7$) ^{**c}	15756,9 ($\pm 1377,3$) ^{**a,b}
DLL μm	6411,3 ($\pm 365,3$) ^{**c}	6759,2 ($\pm 326,6$) ^{**c}	5114,1 ($\pm 511,3$) ^{**a,b}
DAP μm	5316,7 ($\pm 407,2$)	4769,8 ($\pm 402,1$)	4718,9 ($\pm 271,8$)
EPE μm	1256,8 ($\pm 193,7$) ^{*b}	1075,7 ($\pm 80,1$) ^{*a}	1141,3 ($\pm 167,9$)
EPD μm	1045,9 ($\pm 34,6$) ^{*b}	814,9 ($\pm 117,0$) ^{*a}	828,4 ($\pm 263,1$)
SI μm	1107,9 ($\pm 152,4$)	1152,8 ($\pm 219,1$)	1001,2 ($\pm 83,9$)
PIVE μm	10267,4 ($\pm 1762,3$) ^{*b**c}	7606,4 ($\pm 214,1$) ^{*a}	6017,7 ($\pm 1862,1$) ^{**a}
PIVD μm	11669,2 ($\pm 1192,8$) ^{*b**c}	14700,5 ($\pm 1313,1$) ^{*a**c}	7543,0 ($\pm 2089,2$) ^{**a,b}
AVE (μm^2)	2852,5 x 10 ³ ($\pm 742,5$) ^{**b*c}	1259,6 x 10 ³ ($\pm 437,2$) ^{**a}	1505,2 x 10 ³ ($\pm 797,4$) ^{*a}
AVD (μm^2)	2165,6 x 10 ³ ($\pm 1248,2$) ^{*b}	4361,7 x 10 ³ ($\pm 1222,6$) ^{*a,c}	2120,1 x 10 ³ ($\pm 642,7$) ^{*b}

PE: perímetro externo. **DLL:** diâmetro latero-lateral. **DAP:** diâmetro antero-posterior. **EPE:** espessura da parede ventricular esquerda. **EPD:** espessura da parede ventricular direita. **SI:** septo interventricular. **PIVE:** perímetro interno do ventrículo esquerdo. **PIVD:** perímetro interno do ventrículo direito. **AVE:** área ventricular esquerda. **AVE:** área ventricular direita. **a:** comparação com o grupo C. **b:** comparação do grupo CDH. **c:** comparação com o grupo CDHTO. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

Figura 8. Gráficos da avaliação histométrica. PE: perímetro externo. DLL: diâmetro latero-lateral. DAP: diâmetro antero-posterior. EPE: espessura da parede ventricular esquerda. EPD: espessura da parede ventricular direita. SI: septo interventricular. PIVE: perímetro interno do ventrículo esquerdo. PVD: perímetro interno do ventrículo direito. AVE: área ventricular esquerda. AVD: área ventricular direita. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

Figura 9. Tecido cardíaco corado por H/E. A) grupo Controle. B) grupo CDH. C) grupo CDHTO. **VD:** ventrículo direito. **VE:** ventrículo esquerdo. Aumento 5x. Escala 1000 µm.

6.4. Expressão de cTnI and cTnT por imunofluorescência

A IF foi realizada para confirmação dos dados obtidos na análise de WB, por isso, foi checada, de maneira qualitativa, juntamente com técnico de laboratório para verificação dos resultados e para demonstração fotomicroscópica das proteínas no tecido. Assim como na avaliação histológica a expressão das troponinas I e T por IF foi verificada nos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD). Foi possível visualizar aumento da intensidade de coloração da cTnI no VD nos grupos CDH (Figura 10, Figura 11 – ilustração aproximada) e CDHTO comparados ao grupo C. Sem visualização de diferença na expressão de cTnI no VE entre os grupos. A intensidade de coloração de cTnT foi maior no VD do grupo CDHTO comparados ao grupo C, sem diferença entre os demais grupos (Figura 12); da mesma maneira não houve diferença na expressão de cTnT no VE. Esses resultados são similares aos encontrados no WB.

Figura 10. cTnI – imunofluorescência do ventrículo direito. Em vermelho cTnI – filamentos do sarcômetro. Em azul DAPI - coloração nuclear. Aumento 40x. Barra = 50 μ m.

Figura 11. cTnI – imunofluorescência do ventrículo direito no grupo CDH. Em vermelho cTnI – filamentos do sarcômetro. Em azul DAPI - coloração nuclear. **A)** Aumento 40x. Barra = 50 µm. **B)** Aumento 10x. Barra = 10 µm.

Figura 12. cTnT – imunofluorescência do ventrículo direito. Em verde cTnT – filamentos do sarcômero. Em azul DAPI - coloração nuclear. Aumento 40x. Barra = 50 μ m.

6.5. Expressão de cTnI and cTnT por Western Blotting

Na avaliação por WB, alterações significativas da concentração de ambas proteínas foram encontradas no VD, por outro lado, nenhuma diferença foi encontrada no VE.

No VD, a expressão de cTnI estava aumentada nos grupos CDH e CDHTO comparados ao grupo C (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.005$). A expressão de cTnT foi aumentada no grupo CDHTO comparado ao grupo C (** $p < 0.005$), sem diferença quando comparada a CDH (NS); (Tabela 5, Figura 13).

Tabela 5. Resultados da avaliação por WB. Média $\pm$ desvio padrão da expressão relativa (razão) de cTnI e cTnT no VD e VE, em todos os grupos. Unidade arbitrária (cTn/ β -actin).

	Ventrículo Direito		Ventrículo Esquerdo	
	cTnI (n=6)	cTnT (n=6)	cTnI (n=6)	cTnT (n=6)
C	0,641 ($\pm 0,137$) ^{**b*c}	0,752 ($\pm 0,240$) ^{**c}	1,041 ($\pm 0,601$)	0,999 ($\pm 0,054$)
CDH	1,126 ($\pm 0,434$) ^{**a}	0,825 ($\pm 0,151$)	0,668 ($\pm 0,183$)	0,887 ($\pm 0,244$)
CDHTO	0,905 ($\pm 0,315$) ^{*a}	1.033 (± 0.144) ^{**a}	0,871 (± 0.216)	0,898 (± 0.187)

a: comparação com o grupo C. **b:** comparação do grupo CDH. **c:** comparação com o grupo CDHTO. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

6.6. Expressão genética de TNNI3 (cTnI) e TNN2T (cTnT) por RT-qPCR

Seis amostras de VD e VE por grupo foram usadas para realização das análises de RT-qPCR. A expressão de TNNI3 (cTnI) no VD foi aumentada nos grupos CDH e CDHTO comparados ao grupo C (** $p < 0.005$), já a expressão de TNN2T (cTnT) foi diminuída no grupo CDH quando comparado com CDHTO (** $p < 0.005$). No VE não houve diferença entre os grupos na expressão, tanto de TNNI3, quanto de TNN2T (NS) (Tabela 6, Figura 13).

Tabela 6. Resultados da análise RT-qPCR. Média $\pm$ erro padrão da expressão sequencial de TNNI3 e TNN2T no VD e VE em todos os grupos.

	Ventrículo Direito		Ventrículo Esquerdo	
	TNNI3 (n=6)	TNN2T (n=6)	TNNI3 (n=6)	TNN2T (n=6)
C	1.000 (± 0.087) ^{**b,c}	1.000 (± 0.027)	1.000 (± 0.157)	1.000 (± 0.153)
CDH	1.567 (± 0.185) ^{**a}	0.861 (± 0.076) ^{**c}	1.120 (± 0.148)	0.797 (± 0.113)
CDHTO	1.407 (± 0.158) ^{**a}	1.204 (± 0.090) ^{**b}	0.677 (± 0.158)	0.972 (± 0.101)

a: comparação com o grupo C. **b:** comparação com o grupo CDH. **c:** comparação com o grupo CDHTO. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

Figura 13. Gráficos das análises WB e RT-qPCR. a) Gráficos da avaliação proteica por WB. **b)** Gráficos da avaliação de expressão genética por RT-qPCR. TNNI3: cTnI. TNN2T: cTnT. VD: ventrículo direito. VE: ventrículo esquerdo. miRNA: micro-RNA. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Em nosso estudo, avaliamos imediatamente após o nascimento, as alterações cardíacas funcionais e anatômicas correlacionadas à expressão das troponinas cardíacas I e T em modelo de CDH e CDHTO induzida em fetos de coelhos.

Nossos resultados demonstraram menor peso pulmonar nos neonatos com CDH, comprovando, indiretamente, a hipoplasia pulmonar. Por outro lado, o peso cardíaco não apresentou alteração entre os grupos. Esses resultados já haviam sido encontrados por nossa equipe no mesmo modelo, onde o grupo CDH não apresentou menor peso cardíaco em comparação ao grupo C ⁵⁷. Da mesma forma, Vuckovic A. *et. al.* ⁵⁸ também relataram a manutenção do peso do coração entre os grupos. Tannuri U. ⁵⁹, em contrapartida, no mesmo modelo verificou diminuição do peso cardíaco, não demonstrando contudo, a razão entre o peso cardíaco/peso corporal, o que evitaria a influência do tamanho corporal do neonato sobre o peso cardíaco.

Apesar de não encontrarmos diferença na análise biométrica cardíaca, as alterações ecocardiográficas e histométricas foram significativamente alteradas nos grupos CDH e CDHTO, tanto no VE quanto no VD. Na avaliação ecocardiográfica, ambos os grupos apresentaram alterações funcionais e anatômicas. Os parâmetros EPVE s/PN↓ e EPVE d/PN↓ apresentaram-se diminuídos no grupo CDH ($p<0,05$), corroborando para a confirmação de estrutura diminuída do VE. No grupo CDHTO verificamos a diminuição de AVM↓, VE/PN↓, comparado ao grupo C ($p<0,05$).

Esses dados indicam diminuição do tamanho de VE em ambos os grupos, sendo que no grupo CDHTO há redução na área da valva mitral (CDHTO *versus* C) ($p<0,05$), associada à alteração funcional da valva aórtica (VPAO↓) que apresentou diminuição comparada à CDH ($p<0,05$).

O VD, nos grupos CDH e CDHTO, demonstrou alteração funcional com TAPSE/PN↓ diminuído, indicando comprometimento da função ventricular direita, provavelmente decorrente da HAP ⁶⁰.

S. Aggarwal *et. al.* ⁶¹, em análise retrospectiva, constataram, por meio de avaliação de ecocardiográfica, a diminuição do tamanho de VE e do índice de função miocárdica (MPI) nos neonatos com CDH, além de menor ejeção de VE, disfunção global ventricular e HAP, comparados a neonatos controle. Outra análise retrospectiva similar, apresentada anteriormente por K. Suda *et. al.* ³⁴, demonstraram, por ECO, a correlação do tamanho das artérias pulmonares

hiliares com o prognóstico do neonato com CDH, diferentemente da hipoplasia ventricular esquerda, que apesar de também estar presente no seu estudo, não foi considerada um possível indicador primário de mortalidade.

Diversos outros estudos apontam a diminuição do VE na CDH como fator indicativo de mau prognóstico, o que explicaria a alta mortalidade, ainda que, contrária à evolução do manejo pulmonar nesses neonatos^{30, 51, 28}. A redução de VE, pode estar associada com a compressão mecânica exercida pelos órgãos abdominais e, à concomitante hipoplasias arteriais e venosas intra-uterinas, o que explicaria o rápido desenvolvimento da HAP, e dilatação imediata do VD após o nascimento²⁸. Ainda hoje, a avaliação ecocardiográfica funcional e anatômica intra-uterina pode ser de difícil acesso, mas já se sabe que fetos com CDH apresentam sinais de disfunção diastólica no período perinatal^{62, 63}. Inúmeros estudos demonstram resultados similares quanto às alterações cardíacas na CDH^{64, 65, 66}.

Contudo, as controvérsias na literatura com relação aos aspectos benéficos ou não da intervenção fetal por TO, permanecem^{52, 67, 68}. Os achados da ECO em nosso estudo, não demonstraram melhora nos aspectos funcionais e anatômicos cardíacos, nos neonatos do grupo CDHTO. A preocupação na literatura é de que, os casos inexplicáveis de mortes imediatas ou 24h depois da realização da TO, sejam possivelmente ocasionados pelo rápido aumento da pressão intratorácica e pelo aumento do volume intra-pulmonar que resultariam em comprometimento do débito cardíaco, tornando a intervenção questionável^{69, 70}.

Estudo realizado por Miegheem V. *et al.*⁵³ avaliaram os efeitos cardíacos da TO em neonatos com CDH, e demonstraram melhora no índice de função miocárdica, sugerindo que o aumento do fluxo sanguíneo após TO reduziu a derivação através do ductus arteriosus e a pós-carga do VE, resultando em uma melhora da pré-carga do VE. Rocha A. *et al.*⁵² verificaram resultados similares aos de Miegheem V., exibindo aumento do diâmetro da valva aórtica (AoV), comprimento de VE, razão VE:VD e volume do VE no final da diástole, indicando melhora da função ventricular esquerda.

Esses resultados demonstraram efeito benéfico da TO sobre o coração, diferente do nosso experimento que demonstrou certo comprometimento da função miocárdica. Entretanto maior morbidade e alterações morfológicas nos neonatos submetidos à TO^{71, 68}.

Na avaliação histológica verificamos o aumento de DLL↑, PIVD↑ e AVD↑, e diminuição de EPE↓, EPD↓, PIVE↓ e AVE↓ no grupo CDH ($p < 0,05$), corroborando com os achados ecocardiográficos, além de demonstrar a dilatação ventricular direita, que associada ao resultado de TAPSE↓ sugere a provável HAP já instalada nesses neonatos.

No grupo CDHTO houve diminuição dos parâmetros DLL↓, PIVD↓ e PIVE↓ ($p<0,05$), ou seja, diminuição de ambos os ventrículos (VE e VD), demonstrando a possível consequência da compressão cardíaca ocasionada pelo aumento no tamanho dos pulmões, somada à compressão por órgãos abdominais. Semelhantemente, Zambaiti E. *et al.* ⁶⁸, verificaram alterações histológicas em neonatos de ovelhas com CDH e CDHTO, como aumento no tamanho dos miócitos e diminuição na relação núcleo/citoplasma.

Tratando-se das alterações à nível molecular, Steurer S. *et al.* ⁷² demonstraram, em estudo prospectivo, a eficácia dos níveis plasmáticos do peptídeo natriurético tipo-B (BNP) como sensível marcador prognóstico do neonato com CDH, especialmente durante as primeiras 24 horas de vida. Semelhantemente, Partridge *et al.* ⁷³ demonstraram que o aumento dos níveis plasmáticos de BNP em neonatos com CDH foi um marcador indicativo de HAP e um requisito para indicação de ECMO.

Em estudo experimental de CDH em coelhos, Pelizzo *et al.* ³⁶ verificaram a distribuição não homogênea do marcador endotelial ET-1 (endotelina-1) e do marcador de crescimento e diferenciação celular TGF- β (fator de transformação do crescimento- β) indicando provável remodelação cardíaca como resposta à adaptação na doença. Em outro estudo do mesmo grupo, foi demonstrado no modelo de CDH em ovelhas o aumento da expressão de ET-1 e TGF- β no grupo com TO, suportando a hipótese de que a TO aumenta a quantidade de fibras contráteis ($\uparrow$ ET-1), e que há um esforço de proteção cardíaca na tentativa de restaurar a função miocárdica normal (TGF- β $\uparrow$)⁶⁸.

Nossos achados de IF, WB e RT-qPCR demonstraram, de maneira semelhante às outras análises, o aumento da cTnI no VD do grupo CDH ($p<0,05$), sem alterações na expressão de cTnT, comprovando que houve sofrimento cardíaco imediatamente após o nascimento. No grupo CDHTO, verificamos aumento de cTnI e cTnT no VD, indicando descompensação ventricular direita e tanto na CDH quanto na CDHTO não encontramos alterações moleculares no VE..

A expressão diferenciada entre cTnI e cTnT não são específicas à um tipo de lesão, ambas fazem parte do mesmo complexo e são utilizadas como padrão para identificar lesão cardíaca, especialmente a cTnI, por isso, a explicação para a alteração individual de cada uma delas, pode ser apenas, pelo entendimento de suas funções.

cTnI é encontrada durante todo o desenvolvimento fetal na isoforma predominante ssTnI (slow skeletal troponin I), presente nos músculos esquelético estriado de um adulto, que se diferencia de maneira transitória e gradual em troponina cardíaca até os 9 meses de idade ⁷⁴.

O complexo troponina consiste em três subunidades: troponina C (cTnC), a subunidade de ligação a cálcio; troponina I (cTnI), inibidora da actomiosina; e troponina T (cTnT), subunidade de ligação à tropomiosina. Durante a diástole, a cTnI interage fortemente com a actina e a tropomiosina e, como resultado, a cTnI-tropomiosina previne a interação da actomiosina através do bloqueio dos sítios de ligação da miosina na actina; o oposto ocorre durante a sístole, quando a cTnI interage com cTnC, liberando os sítios bloqueados e induzindo movimento da tropomiosina, que resulta em contração muscular. A região inibitória da cTnI é responsável por não permitir a contração muscular através da ligação à actina durante a diástole⁷⁵. O aumento na expressão das troponinas indica lesão cardíaca, podendo estar correlacionada a diversos fatores.

Acreditamos que o aumento exclusivo da cTnI no VD em CDH e CDHTO indicam algum grau de sofrimento cardíaco por provável compressão mecânica dos órgãos abdominais não somente contra o pulmão, mas também, contra o coração. Poderíamos hipotetizar, que o crescimento na expressão desses marcadores esteja ligado exclusivamente à adaptação celular cardíaca^{76,77}.

Para o uso clínico, as troponinas são quantificadas a nível plasmático por meio da expressão de cTnI e cTnT em adultos e neonatos.

Jia *et. al.*⁴² verificaram, em coração animal e humano com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio (AMI), o aumento dos níveis teciduais de cTnI a partir de 0.5h e a depleção a partir de 1h. Apesar dos níveis plasmáticos não terem sido estudados nesse trabalho, sabe-se que 1h é tempo suficiente para que a troponina I seja liberada para níveis séricos em adultos com AMI. Neste caso, a avaliação dos níveis séricos de cTnI em pacientes adultos é padronizada com 99% de acuracidade quando coletada a partir de 3h após apresentação dos sinais, conforme a Sociedade Europeia de Cardiologia (ESC)^{6,43,78}.

Trevisanuto D. *et. al.*⁷⁹ verificaram altos níveis séricos de cTnI em 13 neonatos com mais de 28 semanas de gestação diagnosticados com asfixia perinatal. Além da asfixia perinatal, outras doenças neonatais como encefalopatia hipóxico isquêmica, defeitos congênitos cardíacos e restrição do crescimento intra-uterino apresentaram altos níveis séricos de cTnI^{80,81,82}.

Até o momento, há apenas um estudo que avalia a expressão plasmática de cTnI em neonatos com CDH. Astoria M.A. *et al.*⁸³ verificaram a correlação prognóstica dos níveis de cTnI em 48 neonatos submetidos a terapia com ECMO e demonstraram a correlação do pico de cTnI >2.8 ng/ml com a alta taxa de mortalidade e mau prognóstico. Neste estudo foram incluídos neonatos com CDH, no entanto, juntamente com outras variáveis, como peso ao

nascer e tempo de utilização de ECMO, o pico de cTnI foi considerado uma variável independente associada com mortalidade na CDH.

A cTnT é marcada por sua alteração na doença e desenvolvimento, apontando o potencial do miocárdio em expressar múltiplas isoformas de TnT ⁸⁴. Com relação à expressão de cTnT na CDH, ainda não há relatos na literatura. No entanto, alguns estudos demonstram o aumento de cTnT em neonatos com disfunção cardíaca em diversas doenças ⁸⁵. Perugu S. *et al.* ⁸⁵ verificaram, em estudo prospectivo, aumento da expressão da cTnT em neonatos de muito baixo peso (MBP) proporcionalmente à severidade da doença. Sadoh W. *et al.* encontraram altos níveis plasmáticos de cTnT em neonatos com asfixia perinatal grave e correlacionaram com injúrias cardiomiocíticas.

São diversos os estudos correlacionando os altos níveis de cTnT no plasma com a insuficiência ou injúria cardíaca neonatal ^{86,87,88}, ainda que esta esteja correlacionada apenas com a hemodinâmica do neonato. Tarkowska A *et. al.* ⁸¹, descreveram aumento da cTnT plasmática em neonatos com defeitos cardíacos congênitos (DCC) apenas quando existia alteração hemodinâmica e esta era independente do tipo de defeito, dos sintomas clínicos de falência cardíaca ou dos marcadores ecocardiográficos de função do VE.

A avaliação plasmática de cTnI em nosso estudo, não apresentou diferença entre os grupos, exceto por três indivíduos do grupo CDH, que não apresentaram correlação com peso pulmonar, severidade da CDH ou fígado *up* (quantidade de fígado dentro do tórax).

Uma das limitações do trabalho, destacamos o curto tempo de vida dos animais estudados, fator provável para não alteração dos níveis plasmáticos de cTnI, que poderiam ser estudados pelo prolongamento do tempo de vida, destes neonatos.

Finalmente, em nosso estudo foi possível constatar o acesso imediato das alterações cardíacas do VE e VD após o nascimento no modelo experimental de CDH em coelho, e ainda, comprovar a correlação dos achados ecocardiográficos com os achados histométricos e bioquímicos (cTnI e cTnT). E ainda, concluir de maneira inédita que a intervenção fetal TO não restaurou o dano tecidual miocárdico já que não houve melhora do parâmetro ecocardiográfico TAPSE, e aumento na expressão tecidual de cTnI/cTnT, como ocorrido no grupo CDH. Futuros estudos serão necessários para avaliar a correlação das alterações anatômicas, bioquímicas e funcionais em animais submetidos à ventilação mecânica.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Ao estudarmos as alterações ventriculares esquerda e direita no modelo experimental de CDH e CDHTO em coelhos verificamos que elas poderam ser acessadas logo após o nascimento, e estão correlacionadas com alterações ecocardiográficas, histométricas e bioquímicas, como a hipoplasia de VE e dilatação de VD associado ao aumento tecidual de cTnI no grupo CDH, demonstrando sinais de sofrimento cardíaco ainda no período fetal. Além disso, verificamos que o tratamento promovido pela oclusão traqueal (CDHTO) não restaurou o dano tecidual cardíaco, já que não houve melhora do parâmetro ecocardiográfico TAPSE, e aumento na expressão tecidual de cTnI.

A avaliação demonstrou que:

1. O parâmetro ecocardiográfico TAPSE (medida indireta de disfunção ventricular), diminuído nos grupos CDH e CDHTO, demonstrando que a intervenção fetal (TO) não colaborou para a melhora funcional do coração.
2. Estrutura histológica cardíaca dilatada no VD, e diminuída no VE do grupo CDH, e ainda, um coração estruturalmente diminuído em ambos os ventrículos no grupo CDHTO .
3. Expressão tecidual proteica e gênica de cTnI aumentadas no VD dos grupos CDH e CDHTO, e cTnT aumenta no VE do grupo CDHTO, indicando sofrimento cardíaco. Contudo, a nível plasmático, a cTnI não demonstrou eficácia para predição de lesão cardíaca nesse modelo.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

1. Moore KLDAF. *Clinically Oriented Anatomy*. 5th ed. 2007.
 2. Moore, Keith L; Persuad TVN. TM. Chapter 10- Respiratory System. In: *The Deveoping Human: Clinically oriented embryology*. Philadelphia Saunders. 2009.
 3. Torfs CP, Curry CJ, Bateson TF, et al. A population-based study of congenital diaphragmatic hernia. *Teratology* 1992; 46: 555–65.
 4. Skari H, Bjornland K, Haugen G, et al. Congenital diaphragmatic hernia: A meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 1187–1197.
 5. Gallindo RM, Gonçalves FL, Figueira RL, et al. [Prenatal management of congenital diaphragmatic hernia: present, past and future]. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2015; 37: 140–7.
 6. Lally KP. Congenital diaphragmatic hernia. *Curr Opin Pediatr* 2002; 14: 486–90.
 7. Harrison MR, Adzick NS, Estes JM, et al. A prospective study of the outcome for fetuses with diaphragmatic hernia. *JAMA* 1994; 271: 382–4.
 8. Harrison MR, Bjordal RI, Langmark F, et al. Congenital diaphragmatic hernia: The hidden mortality. *J Pediatr Surg* 1978; 13: 227–230.
 9. Putnam LR, Tsao K, Morini F, et al. Evaluation of Variability in Inhaled Nitric Oxide Use and Pulmonary Hypertension in Patients With Congenital Diaphragmatic Hernia. *JAMA Pediatr* 2016; 170: 1188.
 10. Kardon G, Ackerman KG, McCulley DJ, et al. Congenital diaphragmatic hernias: from genes to mechanisms to therapies. *Dis Model Mech* 2017; 10: 955–970.
 11. Eastwood MP, Russo FM, Toelen J, et al. Medical interventions to reverse pulmonary hypoplasia in the animal model of congenital diaphragmatic hernia: A systematic review. *Pediatr Pulmonol* 2015; 50: 820–838.
 12. Makanga M, Maruyama H, Dewachter C, et al. Prevention of pulmonary hypoplasia and pulmonary vascular remodeling by antenatal simvastatin treatment in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 308: L672–82.
 13. Nakamura Y, Yamamoto I, Fukuda S, et al. Pulmonary acinar development in diaphragmatic hernia. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 372–6.
 14. Wu J, Yamamoto H, Gratacos E, et al. Lung development following diaphragmatic hernia in the fetal rabbit. *Hum Reprod* 2000; 15: 2483–8.
-

15. Harting MT. Congenital diaphragmatic hernia-associated pulmonary hypertension. *Semin Pediatr Surg* 2017; 26: 147–153.
 16. Yamataka T, Puri P. Pulmonary artery structural changes in pulmonary hypertension complicating congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 387–90.
 17. Gosche JR, Islam S, Boulanger SC. Congenital diaphragmatic hernia: searching for answers. *Am J Surg* 2005; 190: 324–32.
 18. Morin FC, Stenmark KR. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 2010–2032.
 19. Roessingh AS de B, de Lagausie P, Ibrahima T, et al. Neuronal nitric oxide synthase does not contribute to the modulation of pulmonary vascular tone in fetal lambs with congenital diaphragmatic hernia (nNOS in CDH lambs). *Pediatr Pulmonol* 2008; 43: 313–321.
 20. Gao Y, Raj JU. Regulation of the Pulmonary Circulation in the Fetus and Newborn. *Physiol Rev* 2010; 90: 1291–1335.
 21. Manso PH, Figueira RL, Prado CM, et al. Early neonatal echocardiographic findings in an experimental rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* 2015; 48: 234–9.
 22. Varisco BM, Sbragia L, Chen J, et al. Excessive Reversal of Epidermal Growth Factor Receptor and Ephrin Signaling Following Tracheal Occlusion in Rabbit Model of Congenital Diaphragmatic Hernia. *Mol Med* 2016; 22: 1.
 23. Lindberg L, Olsson AK, Jögi P, et al. How common is severe pulmonary hypertension after pediatric cardiac surgery? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 1155–63.
 24. Buss M, Williams G, Dilley A, et al. Prevention of heart failure in the management of congenital diaphragmatic hernia by maintaining ductal patency. A case report. *J Pediatr Surg* 2006; 41: e9-11.
 25. Patel N. Use of Milrinone to Treat Cardiac Dysfunction in Infants with Pulmonary Hypertension Secondary to Congenital Diaphragmatic Hernia: A Review of Six Patients. *Neonatology* 2012; 102: 130–136.
 26. Patel N, Moenkemeyer F, Germano S, et al. 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: L378–L383.
 27. Crawford DC, Wright VM, Drake DP, et al. Fetal diaphragmatic hernia: the value of fetal echocardiography in the prediction of postnatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 1989;
-

- 96: 705–10.
28. Schwartz SM, Vermilion RP, Hirschl RB. Evaluation of left ventricular mass in children with left-sided congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr* 1994; 125: 447–51.
 29. Thébaud B, Azancot A, de Lagausie P, et al. Congenital diaphragmatic hernia: antenatal prognostic factors. Does cardiac ventricular disproportion in utero predict outcome and pulmonary hypoplasia? *Intensive Care Med* 1997; 23: 10062–9.
 30. Siebert JR, Haas JE, Beckwith JB. Left ventricular hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1984; 19: 567–71.
 31. Sharland GK, Lockhart SM, Heward AJ, et al. Prognosis in fetal diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 9–13.
 32. Egan MJ, Husain N, Stines JR, et al. Mid-term differences in right ventricular function in patients with congenital diaphragmatic hernia compared with controls. *World J Pediatr* 2012; 8: 350–4.
 33. Sabharwal A, Davis C, Howatson A. Post-Mortem Findings in Fetal and Neonatal Congenital Diaphragmatic Hernia. *Eur J Pediatr Surg* 2000; 10: 96–99.
 34. Suda K, Bigras JL, Bohn D, et al. Echocardiographic predictors of outcome in newborns with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics* 2000; 105: 1106–9.
 35. Karamanoukian HL, O'Toole SJ, Rossman JR, et al. Can cardiac weight predict lung weight in patients with congenital diaphragmatic hernia? *J Pediatr Surg* 1996; 31: 823–5.
 36. Pelizzo G, Bussani R, Zandonà L, et al. Cardiac Adaptation to Severe Congenital Diaphragmatic Hernia. *Fetal Pediatr Pathol* 2016; 35: 10–20.
 37. Baptista MJ, Nogueira-Silva C, Areias JC, et al. Perinatal profile of ventricular overload markers in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 627–33.
 38. Schaible T, Veit M, Tautz J, et al. Serum cytokine levels in neonates with congenital diaphragmatic hernia. *Klin Pädiatrie* 2011; 223: 414–8.
 39. Adams JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* 1993; 88: 750–63.
 40. Katus HA, Remppis A, Scheffold T, et al. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991; 67: 1360–7.
 41. Adams JE, Schechtman KB, Landt Y, et al. Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. *Clin Chem* 1994; 40: 1291–5.
-

42. Jia J, Shen Y, Xue A, et al. Immunohistochemical analysis of cardiac troponin inhibitor in an experimental model of acute myocardial infarction experimental model and in human tissues. *Pathol Res Pract* 2015; 211: 456–61.
 43. Kim S-H, Kim H-S, Lee M-M. Re-expression of fetal troponin isoforms in the postinfarction failing heart of the rat. *Circ J* 2002; 66: 959–64.
 44. Mormile R, Vittori G, Vitale R, et al. And what about cord blood cardiac troponin I (cTnI) levels as an inclusion criterion for therapeutic hypothermia after perinatal asphyxia? *J Pediatr Endocrinol Metab* 2013; 26: 189–90.
 45. Adams JE, Bodor GS, Dávila-Román VG, et al. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993; 88: 101–6.
 46. Bodor GS, Porterfield D, Voss EM, et al. Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. *Clin Chem* 1995; 41: 1710–5.
 47. Gomes A V, Venkatraman G, Davis JP, et al. Cardiac troponin T isoforms affect the Ca(2+) sensitivity of force development in the presence of slow skeletal troponin I: insights into the role of troponin T isoforms in the fetal heart. *J Biol Chem* 2004; 279: 49579–87.
 48. Degenhardt J, Enzensberger C, Tenzer A, et al. Myocardial Function Pre- and Post-Fetal Endoscopic Tracheal Occlusion (FETO) in Fetuses with Left-Sided Moderate to Severe Congenital Diaphragmatic Hernia. *Ultraschall der Medizin - Eur J Ultrasound* 2016; 38: 65–70.
 49. Costa S, Zecca E, De Rosa G, et al. Is serum troponin T a useful marker of myocardial damage in newborn infants with perinatal asphyxia? *Acta Paediatr* 2007; 96: 181–4.
 50. Gonçalves FLL, Figueira RL, Gallindo RM, et al. Tracheal occlusion and ventilation changes the nitric oxide pathway in congenital diaphragmatic hernia model. *J Surg Res* 2016; 203: 466–75.
 51. Baumgart S, Paul JJ, Huhta JC, et al. Cardiac malposition, redistribution of fetal cardiac output, and left heart hypoplasia reduce survival in neonates with congenital diaphragmatic hernia requiring extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr* 1998; 133: 57–62.
 52. Rocha LA da, Byrne FA, Keller RL, et al. Left heart structures in human neonates with congenital diaphragmatic hernia and the effect of fetal endoscopic tracheal occlusion. *Fetal Diagn Ther* 2014; 35: 36–43.
 53. Van Mieghem T, Gucciardo L, Doné E, et al. Left ventricular cardiac function in fetuses with congenital diaphragmatic hernia and the effect of fetal endoscopic tracheal
-

- occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 34: 424–429.
54. Fauza DO, Tannuri U, Ayoub AAR, et al. Surgically produced congenital diaphragmatic hernia in fetal rabbits. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 882–886.
55. Debeer A, Sbragia L, Vrancken K, et al. Antenatal fetal VEGF therapy to promote pulmonary maturation in a preterm rabbit model. *Early Hum Dev* 2010; 86: 99–105.
56. Lally KP, Lasky RE, Lally PA, et al. Standardized reporting for congenital diaphragmatic hernia – An international consensus. *J Pediatr Surg* 2013; 48: 2408–2415.
57. Manso PH, Figueira RL, Prado CM, et al. Early neonatal echocardiographic findings in an experimental rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* 2015; 48: 234–9.
58. Vuckovic A, Herber-Jonat S, Flemmer AW, et al. Antenatal BAY 41-2272 reduces pulmonary hypertension in the rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016; 310: L658–69.
59. Tannuri U. Heart hypoplasia in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*; 56: 173–8.
60. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2010; 23: 685–713; quiz 786–8.
61. Aggarwal S, Stockmann P, Klein MD, et al. Echocardiographic measures of ventricular function and pulmonary artery size: prognostic markers of congenital diaphragmatic hernia? *J Perinatol* 2011; 31: 561–6.
62. Cruz-Lemini M, Valenzuela-Alcaraz B, Granados-Montiel J, et al. Characterizing cardiac dysfunction in fetuses with left congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn*. Epub ahead of print 15 April 2018. DOI: 10.1002/pd.5253.
63. Baptista MJ, Nogueira-Silva C, Areias JC, et al. Perinatal profile of ventricular overload markers in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 627–633.
64. Shah M, Phillips MR, Quintana M, et al. Echocardiography allows for analysis of pulmonary arterial flow in mice with congenital diaphragmatic hernia. *J Surg Res* 2018; 221: 35–42.
65. Sehgal A, Tan K, Ferguson P. Cardiac Function Assessments in Left Bochdalek's Hernia: Clinical Relevance. *Pediatr Cardiol* 2018; 39: 829–836.
66. Altit G, Bhombal S, Van Meurs K, et al. Diminished Cardiac Performance and Left
-

- Ventricular Dimensions in Neonates with Congenital Diaphragmatic Hernia. *Pediatr Cardiol* 2018; 39: 993–1000.
67. Degenhardt J, Enzensberger C, Tenzer A, et al. Myocardial Function Pre- and Post-Fetal Endoscopic Tracheal Occlusion (FETO) in Fetuses with Left-Sided Moderate to Severe Congenital Diaphragmatic Hernia. *Ultraschall Med* 2017; 38: 65–70.
68. Zambaiti E, Bussani R, Calcaterra V, et al. Myocardial effects of fetal endoscopic tracheal occlusion in lambs with CDH. *Prenat Diagn* 2016; 36: 362–7.
69. Gallot D, Boda C, Ughetto S, et al. Prenatal detection and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a French registry-based study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 29: 276–83.
70. Jani JC, Nicolaides KH, Gratacós E, et al. Severe diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 34: 304–310.
71. Ali K, Bendapudi P, Polubothu S, et al. Congenital diaphragmatic hernia-influence of fetoscopic tracheal occlusion on outcomes and predictors of survival. *Eur J Pediatr* 2016; 175: 1071–6.
72. Steurer MA, Moon-Grady AJ, Fineman JR, et al. B-type natriuretic peptide: prognostic marker in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res* 2014; 76: 549–554.
73. Partridge EA, Peranteau WH, Herkert L, et al. Right- versus left-sided congenital diaphragmatic hernia: a comparative outcomes analysis. *J Pediatr Surg* 2016; 51: 900–2.
74. Sasse S, Brand NJ, Kyprianou P, et al. Troponin I gene expression during human cardiac development and in end-stage heart failure. *Circ Res* 1993; 72: 932–8.
75. Bohlooli Ghashghaee N, Tanner BCW, Dong W-J. Functional significance of C-terminal mobile domain of cardiac troponin I. *Arch Biochem Biophys* 2017; 634: 38–46.
76. Feng J, Schaus BJ, Fallavollita JA, et al. Preload induces troponin I degradation independently of myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 2035–7.
77. Hessel MHM, Atsma DE, van der Valk EJM, et al. Release of cardiac troponin I from viable cardiomyocytes is mediated by integrin stimulation. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2008; 455: 979–986.
78. Mueller C, Giannitsis E, Möckel M, et al. Rapid rule out of acute myocardial infarction: novel biomarker-based strategies. *Eur Hear journal Acute Cardiovasc care* 2017; 6: 218–222.
79. Trevisanuto D, Picco G, Golin R, et al. Cardiac Troponin I in Asphyxiated Neonates. *Neonatology* 2006; 89: 190–193.
-

80. Liu X, Chakkarapani E, Stone J, et al. Effect of cardiac compressions and hypothermia treatment on cardiac troponin I in newborns with perinatal asphyxia. *Resuscitation* 2013; 84: 1562–7.
 81. Tarkowska A, Furmaga-Jabłońska W. The evaluation of diagnostic role of cardiac troponin T (cTnT) in newborns with heart defects. *ScientificWorldJournal* 2012; 2012: 682538.
 82. Iacovidou N, Boutsikou M, Gourgiotis D, et al. Perinatal changes of cardiac troponin-I in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Mediators Inflamm* 2007; 2007: 53921.
 83. Astoria MT, Karam SE, Moores RR, et al. Cardiac Troponin Levels in Neonates Who Require ECMO for Noncardiac Indications Are Elevated in Nonsurvivors. *Am J Perinatol* 2015; 32: 859–64.
 84. Anderson PA, Malouf NN, Oakeley AE, et al. Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ Res* 1991; 69: 1226–33.
 85. Perugu S, Rehan VK, Chow SL, et al. Plasma biomarkers and echocardiographic indices of left ventricular function in very low birth weight infants. *J Neonatal Perinatal Med* 2014; 7: 213–22.
 86. Helmer C, Skranes JH, Liestøl K, et al. Using adrenaline during neonatal resuscitation may have an impact on serum cardiac troponin-T levels. *Acta Paediatr* 2015; 104: e378–83.
 87. Cetin I, Kantar A, Unal S, et al. The assessment of time-dependent myocardial changes in infants with perinatal hypoxia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25: 1564–8.
 88. Korraa A, Ezzat MH, Bastawy M, et al. Cardiac troponin I levels and its relation to echocardiographic findings in infants of diabetic mothers. *Ital J Pediatr* 2012; 38: 39.
-

10. APÊNDICES

10.1. ARTIGO 1

Tracheal occlusion changes left and right ventricular morphology in CDH: a experimental study in rabbits.

Rebeca Lopes Figueira¹, Lourenço Sbragia¹, Federico Scorletti², Marc Oria², Arslam M. ², Jeanne M. James³, José Luis Peiró^{2*}

1- Laboratory of Experimental Fetal Surgery, Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

2- The Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy. Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA.

3- The Center of Cardiology Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA.

^{*2}Corresponding author:

Prof. Dr. José Luís Peiró
Associate Professor of Surgery - University of Cincinnati
Fetal Care Center Director
Translational Research and Innovation in Endoscopic Fetal Surgery.
Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy.
Cincinnati Children's Hospital Medical Center (CCHMC)
3333 Burnet Avenue, MLC 11025
Cincinnati, Ohio -USA - 45229-3039
Phone: +1 513 803-4563 - Fax: +1 513 636-2735
E-mail: bcnpeiro@yahoo.es
jose.peiroibanez@cchmc.org

Abstract

Aim: Cardiac pathological alterations and adaptations in CDH have been appointed as the cause of continuous high morbidity and mortality. In this study we aimed to evaluate the left and right ventricular anatomical and functional changes in CDH and CDH with tracheal occlusion (TO) through echocardiography and histological analysis, also the tissue expression of cardiac troponins (cTnI and cTnT) as a possible indicator for cardiac distress. **Material and Methods:** IACUC#2013-0294. 20 pregnant rabbits were divided into three groups (n=10 *per* group): **a)** Control (C) **b)** Congenital Diaphragmatic Hernia (CDH). **c)** Congenital Diaphragmatic Hernia+Tracheal Occlusion (CDHTO). At E30 we performed echocardiography and then harvested heart and lungs. Body weight (BW), heart weight (HW), HW/BW ratio, total lung weight (TLW), left lung weight (LLW), TLW/BW ratio; histometry and evaluation of cTnI and cTnT in left and right ventricles by immunofluorescence (IF), western blotting (WB) and RT-qPCR were performed. **Results:** mortality in CDH group was 38%. Biometrical results showed decreased BW in CDHTO group ($p<0.05$), TLW LLW and the ratio TLW/BW were decreased in CDH group and increased in CDHTO group ($p<0.05$). There was no difference in HW and HW/BW ratio. Echocardiographical analysis pointed to a smaller LV and RV disfunction by TAPSE in the CDH group, and a smaller bLV in the CDHTO group ($p<0.05$). Histometric analysis showed LV smallness and RV dilatation in CDH group, and LV and RV decreased in CDHTO group ($p<0.05$). IF, WB and RT-qPCR analyses demonstrated increased expression of cTnI in the RV of CDH and CDHTO groups ($p<0.05$), also increased expression of cTnT in the RV of CDHTO group ($p<0.05$), with no difference in the LV (NS). **Conclusion:** For this experimental model, our study showed that it is possible to access the cardiac changes in CDH immediately after birth, and the LV smallness and RV dilation with possible distress (cTnI expression) in right ventricular tissue it is not reversed by TO intervention, unlike the CDHTO ventricular changes that showed a smaller and more compromised heart than CDH.

Key words: congenital diaphragmatic hernia, tracheal occlusion, cardiac adaptation, cTnI.

1. INTRODUCTION

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is the congenital malformation of the diaphragma that allows herniation of abdominal contents into the thorax, resulting in lung and heart compression¹⁻³. The incidence of CDH is 1 in 3000 live births, and the mortality rate is between 30-50%⁴⁻⁶. Pulmonary hypertension (PH) and hypoplasia have been studied for decades as the major contributors to the mortality of CDH⁷⁻¹³. However, despite intensive research on the pulmonary alterations and the notable improvement of perinatal care over the past years, some authors consider that still there is a missing link in the pathophysiology of CDH, considering the continuous high morbidity and mortality¹⁴⁻¹⁷. Recent studies has been pointed the cardiac pathological alterations and adaptations in CDH as the possible main factor of the high morbimortality¹²⁻¹⁶. The adaptation to a post-natal circulatory pattern is a complex process characterized by two major changes of cardiovascular adaptation, the transition of fetal circulation to an adult type of circulation and an increase in the cardiac output. In the fetal circulation the low oxygen tension and pulmonay blood flow contribute to the high pulmonar vascular resistance (PVR). After delivery PVR must fall dramatically to increase pulmonary blood flow and to occur oxygen exchange in the lungs¹⁸⁻²⁰.

The impaired development of the pulmonary vasculature and the disordered pulmonar vascular remodeling in CDH cause the elevated PVR and PH after birth, resulting in right ventricle (RV) decreased function over time, and in left ventricle (LV) underdevelopment (hypoplasia), reducing flow through the mitral and aortic valves and leading the neonate with CDH to a cardiac failure and systemic circulatory problems¹⁴⁻¹⁶. Some studies also considerer that the cardiac pathological alterations in CDH and the cardiopulmonary vascular remodeling may be a factor of severe prognosis of more impact than only pulmonary underdevelopment^{12,14}. Currently, the clinical management protocols for neonatos with CDH remains focus on lung preservation, including extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), high-frequency oscillation ventilation, permissive hypercapnia and fetal endoscopic tracheal occlusion (FETO)^{17,21,22}. FETO treatment is the most common intervention in CDH, it is performed by the introduction of a small balloon at 24th weeks of gestation to induce lung stretching by accumulation of lung fluid, thus leading to lung growth, increased aoveolar airspace and maturation of pulmonar vasculature^{16,21,22}. However, the effects of FETO on the pulmonary, and especially, on the cardiac tissue remains unclear. Clinical trials have been showing a improvement in cardiac function in CDH neonates treated with FETO, while in others studies there is no change in cardiac or pulmonar function after FETO intervention^{16,21,23,24}. Besides that, few experimental studies have been showing a alterion of growing and endothelial factors^{25,26}.

In our study we aimed to evaluate the left and right ventricular anatomical and functional changes in CDH and CDH with tracheal occlusion (TO) through echocardiography and histological analysis, also the tissue expression of cardiac troponins (cTnI and cTnT) as a possible indicator for cardiac distress.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Ethical in animal experimentation

The experiment was approved by the Committee on Animal Research from *Children's Hospital of Cincinnati Medical Center* IACUC#2013-0294.

2.2. Animals

Pregnant rabbits were maintained in housing at 24 degrees Celsius under barrier conditions with standard chow and water *ad libitum* at Children's Hospital of Cincinnati Medical Center Animal.

2.3. Experimental groups

20 pregnant rabbits were divided into three groups: **a)** Control (C): non manipulated rabbit fetus, sacrificed at day E30 (n=10). **b)** Congenital Diaphragmatic Hernia (CDH): rabbit fetuses underwent to CDH surgery on day E25 and sacrificed on day E30 (n=10). **c)** Congenital Diaphragmatic Hernia+Tracheal Occlusion (CDHTO): rabbit fetuses underwent to CDH surgery on day E25, TO surgery on day E27 and sacrificed on day E30 (n=10).

2.4. CDH and TO surgery procedures

The pregnant rabbits were weighed and anesthetized with ketamine (35 mg/kg) (Parke-Davis, Morris Plains, NJ-USA) and xylazine (5 mg/kg) (Butler, Columbus, OH-USA) and endotracheally intubated titrating isoflurane (Piramal Critical Care Inc., Bethlehem, PA - USA) to maintain anesthesia. If the pregnant rabbit was spontaneously breathing, then it was provided 1 liter per minute humidified oxygen and 2-2.5% isoflurane through a T-piece. If the rabbit was not spontaneously breathing, it was placed on a ventilator with the same gas mixture. After shaving the surgical site was cleaned with 2% chlorhexidine alternating with 70% isopropyl alcohol 70% iodine three times. Body temperature was maintained at 37°C with a heated water blanket and warmed normal saline solution with 5% dextrose was administered at a rate of 4 mL/kg/hr. Oxygen saturation, heart rate, transcutaneous CO₂, and core body temperature were monitored.

Surgical creation of CDH was performed as described by Fauza, *et al.* at E25 (term = 31 days)²⁷. An incision on the uterine wall was made and the fetus was exposed. A left posterior thoracotomy was performed, and the diaphragm muscle was identified and gently cut with micro-scissors until abdominal contents were observed coming up to the thorax. Then the thorax and hysterotomy sites were closed and 2 mL of warm normal saline solution was infused into the amniotic cavity. Fetuses in the other uterine horn were similarly operated upon. The abdominal wall was closed in two planes.

TO surgery was performed according Debeer, *et al.*²⁶. On day E27 the uterus was opened and the fetal head and neck were exposed. The trachea was exposed using a midline incision and the trachea was ligated with a 4.0 Vicryl. The head was returned to the uterus and uterine and skin closure was completed as in the CDH creation.

2.5. Harvest

At day E30, pregnant rabbits and fetuses were anesthetized with visual confirmation of CDH and TO surgeries. Each fetus was removed from the uterus and leaded to echocardiography, weighed, then the heart and lung were collected immediately according to the experimental needs. After fetal harvest, the pregnant rabbit was euthanized using thioembutal and potassium chloride intravenously.

2.6. Ecochardiographical evaluation.

At day E30, after birth, neonatal echocardiography was performed, using a Vevo 770 High-Resolution In Vivo Micro-Imaging System and RMV 707B Scanhead (VisualSonics Inc). For the TO group, before echocardiography, it was performed a catheterization using a 24G Vialon™ (BD Insyte Autoguard, Becton Dickson Infusion Therapy System Inc., Sandy-Utah, EUA) to allow pulmonary fluid exit and neonatal oxygenation. Left ventricle (LV) dimensions, including end-diastolic and end-systolic dimensions (LVED and LVES, respectively), interventricular septal thickness in diastole and systole (IVSd and IVSs, respectively) and LV posterior wall thickness in diastole and systole (LVPWd and LVPWs, respectively) were measured directly. Fractional shortening (FS), EF and the LVPW to wall thickness ratios in systole and diastole were then calculated.

Measurements included LV end-diastolic diameter (in parasternal long-axis, M-mode, and short-axis view), left atrial (LA) and RV diameter (in the short-axis view), and fractional shortening (FS). LV and RV measurements were done at end diastole and systole, and LA measurements were done at just before the opening of the mitral valve. Each echocardiogram was analyzed by two readers (Jain and James) after acquisition of the images.

2.7. Biometrical assessment

To evaluate the effect of CDH on heart growth, we measured the body (BW), heart (HW), and the HW/BW ratio weights of rabbit fetuses. The left lung (LLW), total lung (TLW) and TLW/BW weights ratio were measured to confirm the CDH severity.

2.8. Sample processing

LV and RV were collected for biometrical, histological, immunofluorescence and molecular biology analysis. Lungs were collected for biometrical analysis. The samples for histology and immunofluorescence were fixed for 24h in paraformaldehyde 4%, then dehydrated in alcohol and posterior embedded in paraffin blocks. Heart samples for protein and RNA extraction were dissected and quickly submerged in liquid nitrogen and freeze at -80°C.

2.9. Histometric analysis

Histological sections in the short-axis cross section (4 μ m) of the left and right ventricles were stained with hematoxylin-eosin and pictures were taken with photomicroscope Leica (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heerbrugg, Switzerland). The histometric measured parameters were: external perimeter (EP), side to side diameter (SD), anteroposterior diameter (AP), interventricular septum (IS), left ventricular wall thickness (LVWT), right ventricular wall thickness (RVWT), left ventricular internal perimeter (LVIP), right ventricular internal perimeter (RVIP), left ventricular area (LVA), right ventricular area (RVA). Five samples by group were measured by using imaging software NIS Elements 3.2 (Nikon Inc., Melville, NY, USA).

2.10. cTnI and cTnT evaluation by immunofluorescence

Slides of the heart were dried permeabilized with 0.1 % Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in phosphate buffered saline PBS. 3 % BSA in PBS was used to block for 1 hour and followed by incubation with primary cTnI (1:100) (ab10231 - Abcam Cambridge, MA 02139-1517 USA) and cTnT (1:500) (ab10214, Abcam Cambridge, MA 02139-1517, USA) overnight at 4° C in a humid chamber. Slides were washed and incubated for 1 hour in secondary antibody anti-mouse (1:1000) (ab150117, goat Anti-Mouse IgG H&L - Alexa Fluor® 488, Abcam Cambridge, MA 02139-1517 USA) in PBS+BSA (5%). Slides were washed and mounted in with DAPI (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) mounting media. Fluorescence signal was quantified measuring the intensity of 10 fields of a given pixel area along the entire tissue using the imaging software NIS Elements 3.2 (Nikon Inc., Melville, NY, USA) and quantified normalizing intensities to background subtraction.

2.11. Protein Extration

Proteins were extracted from the LV and RV separately. Each 20-40mg of tissue was homogenated by sonication (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) using T-PER (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) + Proteinase K + PhosphoSTOP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in 1.5 tubes by sonication and the homogenate were centrifuge at 10000 rpm for 5 minutes. Protein concentration was assessed by the BCA-mini method (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

2.12. cTnI and cTnT evaluation by Western Blotting

LV and RV tissue protein (20 ug) were loaded in 4 to 12% acrylamide gels and samples were electrophoresed for 50 minutes at 200 V, and transferred to PVDF membranes (Life Technologies, CA, USA) for 1.5h at 20V. After blocking with BSA (5%) for 1 hour, membranes were hybridized with antibodies cTnI (1:100) (ab10231 - Abcam Cambridge, MA 02139-1517 USA), cTnT (1:500) (ab10214, Abcam Cambridge, MA 02139-1517, USA) and β -actin (1:10000) (ab8226, Abcam, Cambridge, MA, USA) overnight at 4° C. Membranes were washed and hybridized to secondary antibody anti-mouse (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody) for 1 h and developed using a SuperSignal WestPico

Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA). Bands were quantified by the Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) and normalized by the β -Actin.

2.13. RNA extraction and gene expression by RT-qPCR

LV and RV were homogenated (IkaT10 basic Ultra-Turrax homogenizer, USA) with RLT buffer and RNA was extracted using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Science, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Nucleic acids were quantitatively analyzed by spectrophotometry (Epoch Biotek, Biotek Instruments, Winooski, Vermont). 1 μ g of RNA/sample was retrotranscribed using RT² First strand Kit (Qiagen Sciences, Maryland, USA) and then run on a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR) for the specific TaqMan^R Gene Expression Assay probes: TNNT3 (cTnI - Hs00165957_m1), TNNT2 (cTnT - Oc03396241_m1) and HPRT1 as the housekeeping (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The relative quantification of transcript expression was performed based on the $2^{-\Delta\Delta C}$ and the progression of the error was calculated.

Gene sequence:

TNNT3 *sequence*: 5'-ACCGAGAAGGAAAACCGGGAGGTGG-3'

TNNT2 *sequence*: 5'-GAGTGGACTTCGACGACATCCACCG-3'

2.14. Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Inter-group comparisons of biometric and echocardiography analysis were performed with the ANOVA one-way test followed by non-parametric Tukey's test. Histometric, immunofluorescence, western blotting and RT-qPCR statistical analysis was performed using ANOVA one-way test followed by non-parametric Tukey's test and the unpaired Student's T-test. The Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) package was used for statistical calculations.

3. RESULTS

A total of ten rabbits neonates *per* group were used to perform this study. The mortality of the CDH group was approximately 38%, therefore to complete n=10 for this group we performed 16 fetuses surgeries.

3.1. Biometrical assessment

BW was reduced in the CDHTO group compared with C and CDH groups (** $p < 0.005$ and * $p < 0.05$, respectively). There were no difference in HW and HW/BW ratio (Table 1, Figure 1). LLW was reduced in CDH group in comparison with C and CDHTO groups (** $p < 0.005$). The TLW, and TLW/BW were reduced in CDH group compared with the other groups (** $p < 0.005$) (Table 2, Figure 1).

Table 1. Biometrical assessment. Body weight (BW), heart weight (HW) and HW/BW ratio. Data are reported as mean $\pm$ standard deviation.

	BW (g)	HW (g)	HW/BW (g)
C	40.42 (± 5.58) ^{**c}	0.255 (± 0.076)	0.0063 (± 0.0015)
CDH	39.59 (± 4.47) ^{*c}	0.240 (± 0.053)	0.0061 (± 0.0016)
CDHTO	35.45 (± 3.96) ^{**a*b}	0.260 (± 0.041)	0.0074 (± 0.0012)

a: comparing to C group. b: comparing to CDH group. c: comparing to CDHTO group. g: grams.
* $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

Table 2. Biometrical assessment. Lung left weight (LLW), total lung weight (TLW) and TLW/BW ratio. Data are reported as mean $\pm$ standard deviation.

	LLW (g)	TLW (g)	TLW/BW (g)
C	0.364 (± 0.074) ^{**b}	0.907 (± 0.235) ^{**b}	0.022 (± 0.003) ^{**b}
CDH	0.195 (± 0.062) ^{**a,c}	0.498 (± 0.126) ^{**a,c}	0.013 (± 0.003) ^{**a,c}
CDHTO	0.335 (± 0.162) ^{**b}	0.999 (± 0.431) ^{**b}	0.028 (± 0.011) ^{**b}

a: comparing to C group. b: comparing to CDH group. c: comparing to CDHTO group. g: grams.
* $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

FIGURE 1 – Biometrical graphics

3.2. Echocardiographical evaluation

Of all echocardiographical analyzed parameters seven presented difference between the groups. MVA was smaller in CDHTO group compared with C group. AV PEAK VEL was reduced in CDHTO group compared with CDH group. LA/BW ratio was reduced in CDH group compared with C group, on other hand LA/BW ratio was increased in CDHTO group compared with C group. LVPW d/BW and LVPW s/BW were reduced in CDH group compared with C group. LV/BW ratio was smaller in CDHTO group compared with C group. TAPSE/BW ratio was reduced in CDH group in comparison with C group. (Table 3, Figure 2).

Table 3. Echocardiographical evaluation. Data are reported as mean $\pm$ standard deviation.

	C	CDH	CDHTO
MVA (mm²)	190.965 (± 75.567) ^{*c}	179.175 (± 33.202)	133.110 (± 29.247) ^{*a}
AV PEAK VEL (mm/s)	157.725 (± 57.346)	171.664 (± 63.227) ^{*c}	114.879 (± 51.186) ^{*b}
LA/BW (mms/g)	0.087 (± 0.020) ^{**b,c}	0.055 (± 0.012) ^{**a}	0.066 (± 0.018) ^{**a}

LV/BW (mg/g)	2.730 (± 1.076) ^{*c}	2.448 (± 1.008)	1.877 (± 0.821) ^{*a}
LVPW d/BW (mms/g)	0.029 (± 0.006) ^{*b}	0.024 (± 0.002) ^{*a}	0.028 (± 0.006)
LVPW s/BW (mms/g)	0.041 (± 0.009) ^{*b}	0.034 (± 0.005) ^{*a}	0.038 (± 0.010)
TAPSE (mm/g)	0.027 (± 0.009) ^{*b}	0.020 (± 0.005) ^{*a}	0.026 (± 0.004)

MVA: mitral valve area. **AV PEAK VEL:** aortic valve peak velocity. **LA/BW:** Left atrium/Body weight ratio. **LV/BW:** left ventricle/body weight ratio. **LVPW d/BW:** left ventricular posterior wall diastole end/body weight ratio. **LVPW s/BW:** left ventricular posterior wall systole end/body weight ratio. **TAPSE:** Tricuspid annular plane systolic excursion. mm: millimeter. mms: milimeter *per* second. g: grams. a: comparing to C group. b: comparing to CDH group. c: comparing to CDHTO group. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

FIGURE 2 – ECHO graphics

3.3. Histometric analysis

Four slides *per* group were used to performe the histometric analysis resulting in a total of 12 fields evaluated. The EP was decreased in CDHTO group compared with all the other groups (** $p < 0.005$). The SD was decreased in CDHTO groups compared with CDH and C groups (** $p < 0.005$). There was no difference in AP and IS between groups (NS). The LVWT and RVWT were decreased in CDH group compared to C group (* $p < 0.005$). The LVIP was decreasead in CDH and CDHTO groups compared with C group (* $p < 0.005$ and ** $p < 0.005$, respectively). The RVIP was increased in CDH group and decreased in CDHTO group both compared with C group (* $p < 0.005$ and ** $p < 0.005$, respectively). The LVA was decreased in CDH and CDHTO groups compared with C group (** $p < 0.005$ and * $p < 0.005$, respectively). The RVA was increased in CDH group compared with C and CDHTO groups (* $p < 0,005$). (Table 4, Figure 3 and Figure 4).

Table 4. Histometric analysis. Mean $\pm$ standard deviation of all histometric parameter according to the groups (μm).

	C	CDH	CDHTO
EP (μm)	19337.4 (± 911.2) ^{**c}	19071.7 (± 1141.6) ^{**c}	15999.8 (± 1310.6) ^{**a,b}
SD (μm)	6416.1 (± 327.0) ^{**c}	6726.1 (± 506.4) ^{**c}	5239.2 (± 523.7) ^{**a,b}
AP (μm)	5325.8 (± 400.2)	4732.1 (± 538.2)	4796.5 (± 292.4)
LVWT (μm)	1251.2 (± 151.1) ^{*b}	1078.3 (± 91.0) ^{*a}	1113.5 (± 158.1)
RVWT (μm)	1021.7 (± 164.8) ^{*b}	814.7 (± 148.3) ^{*a}	815.6 (± 229.6)
IS (μm)	1109.7 (± 250.2)	1162.3 (± 165.4)	996.7 (± 73.3)

LVIP (μm)	10011.3 (±1976.1) ^{*b**c}	7774.4 (±1643.8) ^{*a}	6184.4 (±1655.1) ^{**a}
RVIP (μm)	11688.0 (±2472.3) ^{*b**c}	14700.5 (±1313.1) ^{*a**c}	7614.6 (±1816.4) ^{**a,b}
LVA (μm²)	2860.0 x 10 ³ (±643.2) ^{**b*c}	1208.9 x 10 ³ (±437.2) ^{**a}	1505.2 x 10 ³ (±797.4) ^{*a}
RVA(μm²)	2277.3 x 10 ³ (±1081.6) ^{*b}	4320.0 x 10 ³ (±1062.9) ^{*a,c}	2120.0 x 10 ³ (±642.7) ^{*b}

EP: external perimeter. **SD:** side to side diamter. **AP:** anteroposterior diameter. **LVWT:** left ventricular wall thickness. **RVWT:** right ventricular wall thickness. **IS:** internal septum. **LVIP:** left ventricular internal perimeter. **RVIP:** right ventricular internal perimeter. **LVA:** left ventricular area. **RVA:** right ventricular area. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$. a: comparing to C group. b: comparing to CDH group. c: comparing to CDHTO group.

FIGURE 3 – Histology graphics

FIGURE 4 - Histology

3.4. cTnI and cTnT evaluation by immunofluorescence

Four slides *per* group were used to performe and analyse the immunofluorescence (IF). The results showed higher expression of cTnI in the RV of CDH and CDHTO groups compared with C group. There was no difference between the groups in the LV. The same as in WB analysis cTnT expression was higher expressed in CDHTO group compared to C group in the RV, also there was no difference of cTnT expression in the LV (Figure 5).

FIGURE 5 - Immunofluorescence

3.5. cTnI and cTnT evaluation by Western Blotting

Six samples of LV and RV *per* group were used to perform the molecular biology. In the LV western blotting analysis showed no difference of cTnI expression between the groups, and in the RV cTnI expression was higher in CDH and CDHTO groups compared with C group (** $p < 0.005$ and * $p < 0.005$, respectively). cTnT expression was higher in the RV of CDHTO group compared with C and CDH groups (* $p < 0.005$); in the LV there was no difference of cTnT expression levels between the groups (Table 5, Figure 6).

Table 5. Western Blotting results. Mean ± standard deviation of the proteins expression in the left and right ventricles.

	Left Ventricle		Right Ventricle	
	cTnI	cTnT	cTnI	cTnT
C	1.024 (±0.518)	1.012 (±0.050)	0.639 (±0.292) ^{**b*c}	0.721 (±0.222) ^{**c}
CDH	0.708 (±0.172)	0.951 (±0.210)	1.088 (±0.452) ^{**a}	0.834 (±0.564)

CDHTO 0.871 (± 0.216) 0.898 (± 0.187) 0.809 (± 0.266)^{*a} 1.033 (± 0.144)^{**a}

a: comparing to C group. **b:** comparing to CDH group. **c:** comparing to CDHTO group. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

3.6. TNNI3 and TNN2T gene expression by RT-qPCR

Six samples of the LV and RV *per* group were used to perform the RT-qPCR. There was no difference in the expression levels of TNNI3 sequence in the left ventricle between the groups; in the RV TNNI3 expression was increased in CDH and CDHTO groups compared with C group (** $p < 0.005$). TNN2T expression was no difference in the LV between the groups; in the RV TNN2T expression was increased in CDHTO group compared with C and CDH groups (Table 6, Figure 6). Table 7 represents a summary of the main findings in this study.

Table 6. RT-qPCR. Relative quantification of transcript expression ($^{\Delta\Delta C}$) $\pm$ the progression of the error of TNNI3 and TNN2T sequences in the left and right ventricles.

	Left Ventricle		Right Ventricle	
	TNNI3	TNN2T	TNNI3	TNN2T
C	1.000 (± 0.157)	1.000 (± 0.153)	1.000 (± 0.087) ^{**b,c}	1.000 (± 0.027)
CDH	1.120 (± 0.148)	0.797 (± 0.113)	1.567 (± 0.185) ^{**a}	0.861 (± 0.076) ^{**c}
CDHTO	0.677 (± 0.158)	0.972 (± 0.101)	1.407 (± 0.158) ^{**a}	1.204 (± 0.090) ^{**b}

a: comparing to C group. **b:** comparing to CDH group. **c:** comparing to CDHTO group. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

FIGURE 6 – WB and Rt-qPCR graphics

Table 7. Summary of the main results in the groups CDH and CDHTO.

	CDH	CDHTO
Echocardiography	↓LV ↓TAPSE	↓LV
Histometry	↓LV ↑RV	↓LV ↓RV
WB (cTnI)	↑RV	↓RV
WB (cTnT)	-	↑RV
RT-qPCR (cTnI)	↑RV	↑RV
RT-qPCR (cTnT)	-	↑RV

LV: left ventricle. **TAPSE:** tricuspid annular plane systolic excursion. **RV:** right ventricle.

4. DISCUSSION

In our study, we assessed immediately after birth the functional and anatomic cardiac changes correlated to the expression of cardiac and I cardiac troponins in CDH and CDHTO models induced in rabbit fetuses.

Our results demonstrated lower lung weight in neonates with HRC, indirectly proving pulmonary hypoplasia. On the other hand, cardiac weight did not change between groups. These results had already been found by our team in the same HRC model in rabbit fetuses, the CDH group had no lower cardiac weight compared to the C 56 group. Similarly, Vuckovic A. et. al. 57 reported no change in heart weight between groups. Tannuri U. 58, on the other hand, found decreased cardiac weight in rabbit neonates with CDH, but did not demonstrate the ratio of cardiac weight to body weight, which would avoid the influence of the body size of the neonate on the cardiac weight.

Although we found no difference in the cardiac biometric analysis, the echocardiographic and histometric changes were significant in the CDH and CDHTO groups, both in the VE and in the RV. In the echocardiographic evaluation, both groups presented functional and anatomical alterations. The parameters EPVE s / PN ↓ and EPVE d / PN ↓ were decreased in the CDH group ($p < 0.05$), corroborating to the confirmation of decreased LV structure. In the CDHTO group we observed a decrease in AVM ↓, VE / PN ↓, compared to group C ($p < 0.05$).

These data indicate, each with its particularity, the decrease in LV size in both groups, and in the CDHTO group there is a reduction in the area of the mitral valve (CDHTOxC) ($p < 0.05$), associated with the functional alteration of the valve (VPAO ↓), which presented a decrease compared to HRC ($p < 0.05$).

The RV, in the CDH and CDHTO groups, showed a functional alteration with decreased TAPSE / PN ↓, indicating impairment of right ventricular function, probably due to PAH⁵⁹.

S. Aggarwal et. al. 60, in a retrospective analysis, found, by means of echocardiographic evaluation, the reduction of LV size and myocardial function index (MPI) in neonates with HRC, as well as lower LV ejection, global ventricular dysfunction and PAH, compared to neonates control. Another similar retrospective analysis, presented previously by K. Suda et. al. 34 showed ECHO to correlate the size of hilar pulmonary arteries with the prognosis of the neonate with HRC, unlike left ventricular hypoplasia, which, although also present in the study, was not considered a possible primary indicator of mortality.

Several other studies point to the decrease in LV in HRC as a factor indicative of a poor prognosis, which would explain the high mortality, although, contrary to the evolution of pulmonary management in these neonates 30, 51, 28. LV reduction may be associated with mechanical compression exerted by the abdominal organs and concomitant intra-uterine arterial and venous hypoplasia, which would explain the rapid development of PAH and immediate dilation of the RV after birth. 28 Even today, functional and anatomic intrauterine echocardiographic evaluation is difficult to access, but it is

already known that fetuses with CDH show signs of diastolic dysfunction in the perinatal period 61,62. Numerous studies have shown similar results regarding cardiac changes in CDH 63,64,65.

However, controversies in the literature regarding the beneficial or non-beneficial aspects of fetal intervention due to OT remain 52,66,67. The ECHO findings in our study did not show improvement in the functional and anatomic aspects of the heart in the neonates of the CDHTO group. The concern in the literature is that unexplained cases of immediate deaths or 24 hours after OT are possibly caused by the rapid increase in intrathoracic pressure and increased intra-pulmonary volume that would result in cardiac output impairment, making intervention questionable 68,69.

A study by Mieghem V. et al. 53 evaluated the cardiac effects of OT in neonates with HRC and demonstrated an improvement in myocardial function index, suggesting that increased blood flow after OT reduced the ductus arteriosus and post-LV bypass, resulting in an improvement in the VE preload. Rocha A. et al. 52 showed results similar to those of Mieghem V., showing increased aortic valve diameter (AoV), LV length, LV ratio: RV and LV volume at the end of the diastole, indicating improvement of left ventricular function.

These results are not similar to ours, as well as some studies in the literature that, among other aspects, found greater morbidity and morphological changes in neonates submitted to OT 70,67

In the histological evaluation we verified the increase of DLL ↑, PIVD ↑ and AVD ↑, and decrease of EPE ↓, EPD ↓, PIVE ↓ and AVE ↓ in the CDH group ($p < 0.05$), corroborating with the echocardiographic findings, besides demonstrating right ventricular dilation, which associated with the TAPSE ↓ result confirms the probable HAP in these infants.

In the CDHTO group there was a decrease in the DLL ↓, PIVD ↓ and PIVE ↓ parameters ($p < 0.05$), that is, a decrease in both ventricles (LV and RV), demonstrating the possible consequence of cardiac compression caused by an increase in the size of lungs, in addition to compression by abdominal organs. Similarly, Zambaiti E. et al. 67, verified histological changes in neonates of CDH and CDHTO sheep, such as increase in myocyte size and decrease in nucleus / cytoplasm ratio.

With regard to changes at the molecular level, Steurer S. et. al. 71 demonstrated, in a prospective study, the efficacy of plasma levels of B-type natriuretic peptide (BNP) as a sensitive prognostic marker of neonates with CDH, especially during the first 24 hours of life. Similarly, Partridge et. al. 72 concluded that increased plasma levels of BNP in neonates with HRC were an indicator indicative of PAH and a requirement for indication of ECMO (extracorporeal membrane oxygenation). An experimental study of CDH in rabbits, Pelizzo et. al. 36 verified the non-homogenous distribution of the endothelial marker ET-1 (endothelin-1) and the TGF- β cell growth and differentiation marker indicating probable cardiac remodeling as a response to disease adaptation. In another study of the same group, the expression of ET-1 and TGF- β in the OT group was demonstrated in the sheep CDH model, supporting the hypothesis that OT increases the amount of contractile fibers (↑ ET-1), and that there is a cardiac protection effort in the attempt to restore normal myocardial function (TGF- β ↑) 67.

Our findings of IF, WB and RT-qPCR demonstrated, congruently to the other analyzes, the increase of cTnI in the RV of the CDH group ($p < 0.05$), without alterations in cTnT expression, once again the proof of suffering cardiac arrest by HAP immediately after birth. In the CDHTO group, we observed an increase in cTnI and cTnT in the RV, without LV changes, indicating right ventricular decompensation.

The differentiated expression between cTnI and cTnT are not specific to one type of lesion, both are part of the same complex and are used as a standard to identify cardiac lesion, especially cTnI, therefore, the explanation for the individual alteration of each one, can only be by the understanding of its functions.

cTnI is found throughout fetal development in the predominant ssTnI isoform (slow skeletal troponin I), present in the striated skeletal muscles of an adult, which differs transiently and gradually in cardiac troponin up to 9 months of age⁷³.

The troponin complex consists of three subunits: troponin C (cTnC), the calcium-binding subunit; troponin I (cTnI), actomyosin inhibitor; and troponin T (cTnT), tropomyosin binding subunit. During diastole, cTnI interacts strongly with actin and tropomyosin and, as a result, cTnI-tropomyosin prevents the interaction of actomyosin by blocking myosin binding sites in actin; the opposite occurs during systole, when cTnI interacts with cTnC, releasing the blocked sites and inducing movement of tropomyosin, which results in muscle contraction. The inhibitory region of cTnI is responsible for not allowing muscle contraction through actin binding during diastole⁷⁴. The increase in troponin expression indicates cardiac injury and may be correlated to several factors. We believe that in our study, the increase in both indicates cardiac suffering due to metabolic alterations resulting from PAH, and by mechanical compression of the abdominal organs against the heart, these aspects demonstrate cardiac adaptation of the fetus with HRC, so it is possible to hypothesize that the growth in the expression of these markers is exclusively due to cardiac cellular adaptation^{75,76}. For clinical use, troponins are quantified at the plasma level, we have pointed out some studies that evaluated the expression of cTnI and cTnT in adults and neonates under these conditions.

Jia et. al.⁴² verified in the animal and human heart with diagnosis of acute myocardial infarction (AMI), the increase of the tissue levels of cTnI from 0.5h and the depletion after 1h. Although plasma levels have not been studied in this study, it is known that 1h is enough time for troponin I to be released to serum levels in adult humans with AMI. In this case, the evaluation of serum cTnI levels in adult patients is standardized by collecting after 3h after the signs are presented, according to the European Society of Cardiology (ESC) standardization, which requires 99% accuracy^{6,43,77}.

Trevisanuto D. et. al.⁷⁸ verified high serum levels of cTnI in 13 neonates with more than 28 weeks' gestation diagnosed with perinatal asphyxia. In addition to perinatal asphyxia, other neonatal diseases such as hypoxic ischemic encephalopathy, congenital heart defects and intrauterine growth restriction showed high serum levels of cTnI^{79,80,81}.

To date, there is only one study evaluating cTnI plasma expression in neonates with CDH. Astoria M.A. et al.⁸² verified the prognostic correlation of cTnI levels in 48 infants undergoing ECMO therapy and demonstrated the correlation of peak cTnI > 2.8 ng / ml with high mortality rate and poor prognosis. In this study neonates with CDH were included, however, along with other variables, such as birth weight and time of use of ECMO, the peak of cTnI was considered an independent variable associated with mortality in CDH.

cTnT is marked by its change in disease and development, pointing to the potential of the myocardium to express multiple isoforms of TnT⁸³. Regarding the expression of cTnT in CDH, there are as yet no reports in the literature. However, some studies demonstrate the increase of cTnT in neonates with cardiac dysfunction in various diseases⁸⁴. Perugu S. et al.⁸⁴ found, in a prospective study, an increase in cTnT expression in very low birth weight infants (MBP) in proportion to the severity of the disease. Sadoh W. et al. found high plasma levels of cTnT in neonates with severe perinatal asphyxia and correlated with cardiomyocyte injuries.

There are several studies correlating high levels of cTnT in plasma with neonatal cardiac insufficiency or injury^{85,86,87}, although this is only correlated with neonatal hemodynamics. Tarkowska A et. al.⁸⁰ reported an increase in plasma cTnT in neonates with congenital heart defects (CHD) only when there was a hemodynamic change and this was independent of the type of defect, clinical symptoms of heart failure or echocardiographic markers of LV function.

The plasma cTnI assessment in our study did not differ between groups, except for three individuals in the CDH group, who did not present a correlation with lung weight, HRH severity or liver up (amount of liver within the thorax).

Finally, in our study, it was possible to verify the immediate access of the cardiac alterations of the LV and RV after birth in the experimental model of rabbit CDH, and also to verify the correlation of the echocardiographic findings with the histometric and biochemical findings (cTnI and cTnT). Furthermore, in this model, fetal intervention did not restore cardiac distress in the CDHTO group, since there was no improvement in the TAPSE echocardiographic parameter and in the cTnI / cTnT tissue expression, as occurred in the CDH group.

From the limitations of the study, we highlight the short lifespan of the studied animals, a probable factor for the non-alteration of plasma levels of cTnI, which could be achieved by the induction of mechanical ventilation and then prolongation of life span.

Future studies will be needed to evaluate the correlation of anatomical and functional changes with biochemical changes in CDH and CDHTO in animals submitted to mechanical ventilation.

5. REFERENCES

1. Schmidt AF, Gonçalves FL, Figueira RL, Scorletti F, Peiró JL, Sbragia L. Combined antenatal therapy with retinoic acid and tracheal occlusion in a rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int*. 2016 Jun;32(6):591-8. doi: 10.1007/s00383-016-3886-1.
-

2. Gonçalves FL, Figueira RL, Gallindo RM, Simões AL, Coleman A, Peiró JL, Sbragia L. Tracheal occlusion and ventilation changes the nitric oxide pathway in congenital diaphragmatic hernia model. *J Surg Res*. 2016 Jun 15;203(2):466-75. doi: 10.1016/j.jss.2016.04.037.
 3. Varisco BM, Sbragia L, Chen J, Scorletti F, Joshi R, Wong HR, Lopes-Figueira R, Oria M, Peiro J. Excessive Reversal of Epidermal Growth Factor Receptor and Ephrin Signaling Following Tracheal Occlusion in Rabbit Model of Congenital Diaphragmatic Hernia. *Mol Med*. 2016 Jul 19;22. doi: 10.2119/molmed.2016.00121.
 4. Fox C, Stewart M, King SK, Patel N. Acute gastrointestinal compromise in neonates with congenital diaphragmatic hernia prior to repair. *J Pediatr Surg*. 2016 Dec;51(12):1917-1920. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.012.
 5. Coughlin MA, Werner NL, Gajarski R, Gadepalli S, Hirschl R, Barks J, Treadwell MC, Ladino-Torres M, Kreutzman J, Mychaliska GB. Prenatally diagnosed severe CDH: mortality and morbidity remain high. *J Pediatr Surg*. 2016 Jul;51(7):1091-5. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.082.
 - Keller RL, Tacy TA, Hendricks-Munoz K, Xu J, Moon-Grady AJ, Neuhaus J, Moore P, Nobuhara KK, Hawgood S, Fineman JR. Congenital diaphragmatic hernia: endothelin-1, pulmonary hypertension, and disease severity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Aug 15;182(4):555-61. doi: 10.1164/rccm.200907-1126OC.
 7. Mohseni-Bod H, Bohn D. Pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg*. 2007 May;16(2):126-33. Review.
 8. Acker SN, Seedorf GJ, Abman SH, Nozik-Grayck E, Kuhn K, Partrick DA, Gien J. Altered pulmonary artery endothelial-smooth muscle cell interactions in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res*. 2015 Apr;77(4):511-9. doi: 10.1038/pr.2015.13.
 9. Mous DS, Kool HM, Buscop-van Kempen MJ, Koning AH, Dzyubachyk O, Wijnen RM, Tibboel D, Rottier RJ. Clinically relevant timing of antenatal sildenafil treatment reduces pulmonary vascular remodeling in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Oct 1;311(4):L734-L742. doi: 10.1152/ajplung.00180.2016.
 10. Patel N. Use of milrinone to treat cardiac dysfunction in infants with pulmonary hypertension secondary to congenital diaphragmatic hernia: a review of six patients. *Neonatology*. 2012;102(2):130-6. doi: 10.1159/000339108.
 11. Manso PH, Figueira RL, Prado CM, Gonçalves FL, Simões AL, Ramos SG, Sbragia L. Early neonatal echocardiographic findings in an experimental rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Braz J Med Biol Res*. 2015 Mar;48(3):234-9. doi: 10.1590/1414-431X20144184.
 12. Siebert JR, Haas JE, Beckwith JB. Left ventricular hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 1984 Oct;19(5):567-71.
 13. Vuckovic A, Herber-Jonat S, Flemmer AW, Strizek B, Engels AC, Jani JC. Antenatal BAY 41-2272 reduces pulmonary hypertension in the rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Apr 1;310(7):L658-69. doi: 10.1152/ajplung.00178.2015.
 14. Correia-Pinto J, Baptista MJ, Estêvão-Costa J, Carvalho JL, Ferreira A, Areias JC, Leite-Moreira AF. Heart-related indices in experimental diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2000 Oct;35(10):1449-52.
 15. Egan MJ, Husain N, Stines JR, Moiduddin N, Stein MA, Nelin LD, Cua CL. Mid-term differences in right ventricular function in patients with congenital diaphragmatic hernia compared with controls. *World J Pediatr*. 2012 Nov;8(4):350-4. doi: 10.1007/s12519-012-0380-2.
 16. Rocha LA, Byrne FA, Keller RL, Miniati D, Brook MM, Silverman NH, Moon-Grady AJ. Left heart structures in human neonates with congenital diaphragmatic hernia and the effect of fetal endoscopic tracheal occlusion. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35(1):36-43. doi: 10.1159/000356437.
 17. Mah VK, Chiu P, Kim PC. Are we making a real difference? Update on 'hidden mortality' in the management of congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther*. 2011;29(1):40-5. doi: 10.1159/000315889.
 18. Tovar JA. Congenital diaphragmatic hernia. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 Jan 3;7:1. doi: 10.1186/1750-1172-7-1. Review.
 19. Hillman NH, Kallapur SG, Jobe AH. Physiology of transition from intrauterine to extrauterine life. *Clin Perinatol*. 2012 Dec;39(4):769-83. doi:10.1016/j.clp.2012.09.009. Review.
 20. Teitel DF, Iwamoto HS, Rudolph AM. Changes in the pulmonary circulation during birth-related events. *Pediatr Res*. 1990 Apr;27(4 Pt 1):372-8.
-

21. Degenhardt J, Enzensberger C, Tenzer A, Kawecki A, Kohl T, Widriani E, Axt-Fliedner R. Myocardial Function Pre- and Post-Fetal Endoscopic Tracheal Occlusion (FETO) in Fetuses with Left-Sided Moderate to Severe Congenital Diaphragmatic Hernia. *Ultraschall Med.* 2016 Sep 14.
 22. Dekoninck P, Gratacos E, Van Mieghem T, Richter J, Lewi P, Ancel AM, Allegaert K, Nicolaides K, Deprest J. Results of fetal endoscopic tracheal occlusion for congenital diaphragmatic hernia and the set up of the randomized controlled TOTAL trial. *Early Hum Dev.* 2011 Sep;87(9):619-24. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2011.08.001.
 23. Van Mieghem T, Gucciardo L, Doné E, Van Schoubroeck D, Graatsma EM, Visser GH, Verhaeghe J, Deprest J. Left ventricular cardiac function in fetuses with congenital diaphragmatic hernia and the effect of fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Oct;34(4):424-9. doi: 10.1002/uog.7340.
 24. Jani JC, Nicolaides KH, Gratacós E, Valencia CM, Doné E, Martinez JM, Gucciardo L, Cruz R, Deprest JA. Severe diaphragmatic hernia treated by fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Sep;34(3):304-10. doi: 10.1002/uog.6450.
 25. Zambaiti E, Bussani R, Calcaterra V, Zandonà L, Silvestri F, Peiró JL, Marotta M, Andreatta E, Pelizzo G. Myocardial effects of fetal endoscopic tracheal occlusion in lambs with CDH. *Prenat Diagn.* 2016 Apr;36(4):362-7. doi: 10.1002/pd.4789.
 26. Debeer, A., et al. Antenatal fetal VEGF therapy to promote pulmonary maturation in a preterm rabbit model. *Early Hum Dev.* 2010. 86(2). 99-105.
 27. Fauza DO, Tannuri U, Ayoub AA, Capelozzi VL, Saldiva PH, Maksoud JG. Surgically produced congenital diaphragmatic hernia in fetal rabbits. *J Pediatr Surg.* 1994 Jul;29(7):882-6.
 28. Tannuri U. Heart hypoplasia in an animal model of congenital diaphragmatic hernia. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2001 Nov-Dec;56(6):173-8.
 29. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K, Solomon SD, Louie EK, Schiller NB. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2010 Jul;23(7):685-713; quiz 786-8. doi: 10.1016/j.echo.2010.05.010.
 30. Aggarwal S, Stockmann P, Klein MD, Natarajan G. Echocardiographic measures of ventricular function and pulmonary artery size: prognostic markers of congenital diaphragmatic hernia? *J Perinatol.* 2011 Aug;31(8):561-6. doi: 10.1038/jp.2011.3.
 31. Suda K, Bigras JL, Bohn D, Hornberger LK, McCrindle BW. Echocardiographic predictors of outcome in newborns with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics.* 2000 May;105(5):1106-9.
 32. Baumgart S, Paul JJ, Huhta JC, Katz AL, Paul KE, Spettell C, Spitzer AR. Cardiac malposition, redistribution of fetal cardiac output, and left heart hypoplasia reduce survival in neonates with congenital diaphragmatic hernia requiring extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr.* 1998 Jul;133(1):57-62.
 33. Schwartz SM, Vermilion RP, Hirschl RB. Evaluation of left ventricular mass in children with left-sided congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr.* 1994 Sep;125(3):447-51.
 34. Baptista MJ, Nogueira-Silva C, Areias JC, Correia-Pinto J. Perinatal profile of ventricular overload markers in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2008 Apr;43(4):627-33. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2007.08.044.
 35. Ali K, Bendapudi P, Polubothu S, Andradi G, Ofuya M, Peacock J, Hickey A, Davenport M, Nicolaides K, Greenough A. Congenital diaphragmatic hernia-influence of fetoscopic tracheal occlusion on outcomes and predictors of survival. *Eur J Pediatr.* 2016 Aug;175(8):1071-6. doi: 10.1007/s00431-016-2742-6.
 36. Gallot D, Boda C, Ughetto S, Perthuis I, Robert-Gnansia E, Francannet C, Laurichesse-Delmas H, Jani J, Coste K, Deprest J, Labbe A, Sapin V, Lemery D. Prenatal detection and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a French registry-based study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007 Mar;29(3):276-83.
 37. Astoria MT, Karam SE, Moores RR Jr, Rozycki HJ. Cardiac Troponin Levels in Neonates Who Require ECMO for Noncardiac Indications Are Elevated in Nonsurvivors. *Am J Perinatol.* 2015 Jul;32(9):859-64. doi: 10.1055/s-0034-1543983. Epub 2015 Jan 21.
-

- 38.** Steurer MA, Moon-Grady AJ, Fineman JR, Sun CE, Lusk LA, Wai KC, Keller RL. B-type natriuretic peptide: prognostic marker in congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res.* 2014 Dec;76(6):549-54. doi: 10.1038/pr.2014.136.
- 39.** Partridge EA, Peranteau WH, Herkert L, Rendon N, Smith H, Rintoul NE, Flake AW, Adzick NS, Hedrick HL. Right- versus left-sided congenital diaphragmatic hernia: a comparative outcomes analysis. *J Pediatr Surg.* 2016 Jun;51(6):900-2. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.02.049.
- 40.** Pelizzo G, Bussani R, Zandonà L, Custrin A, Bellieni CV, De Silvestri A, Calcaterra V. Cardiac Adaptation to Severe Congenital Diaphragmatic Hernia. *Fetal Pediatr Pathol.* 2016;35(1):10-20. doi: 10.3109/15513815.2015.1122125.
- 41.** Feng J, Schaus BJ, Fallavollita JA, Lee TC, Canty JM Jr. Preload induces troponin I degradation independently of myocardial ischemia. *Circulation.* 2001 Apr 24;103(16):2035-7.
- 42.** Hessel MH, Atsma DE, van der Valk EJ, Bax WH, Schaliij MJ, van der Laarse A. Release of cardiac troponin I from viable cardiomyocytes is mediated by integrin stimulation. *Pflugers Arch.* 2008 Mar;455(6):979-86.
- 43.** Jia JZ, Shen YW, Xue AM, Zhao ZQ. Immunohistochemical analysis of cardiac troponin inhibitor in an experimental model of acute myocardial infarction experimental model and in human tissues. *Pathol Res Pract.* 2015 Jun;211(6):456-61. doi: 10.1016/j.prp.2015.01.010.
-

10.2. ARTIGO 2

Different cardiac response in left and right sided CDH in rabbit model

Rebeca Lopes Figueira¹, Lourenço Sbragia¹, Federico Scorletti², Marc Oria², Arslam M. ², Jeanne M. James³, José Luis Peiró^{2*}

1- Laboratory of Experimental Fetal Surgery, Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

2- The Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy. Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA.

3- The Center of Cardiology Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA.

*²Corresponding author:

Prof. Dr. José Luís Peiró
Associate Professor of Surgery - University of Cincinnati
Fetal Care Center Director
Translational Research and Innovation in Endoscopic Fetal Surgery.
Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy.
Cincinnati Children's Hospital Medical Center (CCHMC)
3333 Burnet Avenue, MLC 11025
Cincinnati, Ohio -USA - 45229-3039
Phone: +1 513 803-4563 - Fax: +1 513 636-2735
E-mail: bcnpeiro@yahoo.es
jose.peiroibanez@cchmc.org

Abstract

Aim: Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is the posterolateral malformation of the diaphragm that allows abdominal organs herniation into the thorax resulting in pulmonary hypertension and hypoplasia. Left-sided CDH (LCDH) occurs in 80% of the cases, and right-sided CDH (RCDH) in 20% of it. Cardiac adaptation has been described as one of the most important causes of cardiorespiratory failure and poor prognosis in CDH. However, the knowledge about cardiac responses and its differences between LCDH and RCDH is limited. Our aim was to evaluate histological, echocardiographical and biochemical (cTnI and cTnT) responses of the left (LV) and right (RV) ventricles in RCDH and LCDH immediately after birth in CDH experimental rabbit model. **Material and Methods:** IACUC#2013-0294. 24 pregnant rabbits were divided into three groups: a) Control (C) b) Left - Diaphragmatic Hernia (LCDH) c) Right - Diaphragmatic Hernia (RCDH). At E30 we performed echocardiography and then harvested heart and lungs. Body weight (BW), heart weight (HW), HW/BW ratio, total lung weight (TLW), left lung weight (LLW), TLW/BW ratio; cardiac histometry, and cTnI and cTnT evaluation in left and right ventricles by immunofluorescence (IF), western blotting (WB) and RT-qPCR were performed. **Results:** mortality was 20% in LCDH group and in 7% RCDH. Biometrical results showed no difference in heart weight and decreased lung weight in LCDH and RCDH groups ($p < 0.005$). Echocardiography showed smaller LV and dilated RV in both LCDH and RCDH groups. RCDH presented valvar dysfunction in both ventricles. Cardiac histometry presented more altered parameters in LCDH, but in both LCDH and RCDH the results showed decreased LV and dilated RV. Western Blotting and RT-qPCR presented increased cTnI levels in the RV of LCDH ($p < 0.05$), but not in LV. RCDH presented increased gene expression of cTnI in the RV ($p < 0.005$) with no correlation in protein expression. There was no difference of cTnI and cTnT levels in LV. **Conclusion:** In the rabbit model, functional and molecular response were different between LCDH and RCDH, showing that the defect side changes the pathophysiology of the disease. RCDH had an impaired cardiac functional response than LCDH, suggesting that LCDH and RCDH have different cardiac responses.

Key words: congenital diaphragmatic hernia, right-sided CDH, cardiac adaptation, cTnI.

1. INTRODUCTION

Right-sided congenital diaphragmatic hernia (RCDH) is still a challenge to pediatric surgery, while the left-sided CDH (LCDH) is largely studied and presents most management and treatment globally standardized, the RCDH has many contentious questions yet. Multiples comparison studies between LCDH and RCDH are controversial about the severity degree and survival rate in this malformation (1,2). The prevalence of CDH is about 1-4 per 10.000 births (3), RCDH represents approximately 20% of all CDHs, and it is defined by the postero-lateral malformation of the diaphragm in the right side, leading to liver and bowel intrathoracic herniation, while the LCDH is the malformation of the diaphragm in the left side (80%), allowing bowel, stomach and, when severe, liver intrathoracic herniation. The lungs and heart compression results in severe lung hypoplasia and pulmonary hypertension to the CDH fetus (2,3). Still, in fetal life, the cardiopulmonary interaction performs an important role in the hemodynamic maintenance, once a pathological factor impairs this equilibrium the consequences could be drastic, especially in the transition from fetal to neonatal life (4-6).

The shift to neonatal circulation follows a sequence of events, as the falling of pulmonary vascular resistance (PVR), the increase of right ventricular blood flow to the lungs and the pulmonary oxygen exchange. When the PVR does not falls, pulmonary hypertension (PH) and right-to-left shunting occurs, the afterload on the right ventricle (RV) is increased and the ventricular performance is hampered (7-9). In CDH the displacement of the thoracic organs, the distortion of the ductus venous, the external compression of the heart, and the reduced pulmonary blood flow results in PH and cardiac failure, leading these neonates to a poor prognosis and high mortality rate (7,9).

It has been suggested that cardiac adaptation may occur since fetal life in CDH, as demonstrated in few studies which the embryogenic expression of endothelin-1 (ET-1), transforming grow factors - B (TGF-B), desmin, α -smooth muscle actin (α -SMA) and muscle actin (HHF35) were altered in comparison with the normal embryogenic development. Besides that, cardiac morphological and echocardiography analysis have been showing anatomical and functional changes in CDH. (7, 10-13)

The hypoplastic left ventricle (LV) and the overload right ventricle (RV) are widely described and mostly associated with poor prognosis in the LCDH. Also, molecular cardiac alterations have been associated with poor outcome in CDH, as increased B-type natriuretic peptide (BNP), angiotensinogen and cardiac troponin inhibitor (cTnI), showing heart dysfunction since perinatal period (8,14).

cTnI and cTnT are proteins from the three-troponin complex (troponins I, T and C) located on the actin filament, responsible for cardiac muscle contraction. Both cTnI and cTnT are currently used as markers for myocardial infarction in adult hearts and have been showed as useful markers of heart distress in neonate's hearts (15).

There is only one study that demonstrated the correlation of high levels of cTnI with poor prognosis in LCDH, and few studies are found about cardiac adaptation in LCDH and RCDH, especially regarding the different cardiac responses between LCDH and RCDH (10,15).

In this study, we performed a histological, echocardiographical and biochemical comparative study of both ventricles in RCDH and LCDH immediately after birth in experimental rabbit model.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Ethical in animal experimentation

The experiment was approved by the Committee on Animal Research from *Children's Hospital of Cincinnati Medical Center* IACUC#2013-0294.

2.2. Animals

Pregnant rabbits were maintained in housing at 24 degrees Celsius under barrier conditions with standard chow and water *ad libitum* at Children's Hospital of Cincinnati Medical Center Animal.

2.3. Experimental groups

24 pregnant rabbits were divided into three groups: **a)** Control (C): non manipulated rabbit fetuses, sacrificed at day E30 (n=12). **b)** Left - Diaphragmatic Hernia (LCDH): rabbit fetuses underwent to left sided CDH surgery on day E25 and sacrificed on day E30 (n=12). **c)** Right - Diaphragmatic Hernia (RCDH): rabbit fetuses underwent to right sided CDH surgery on day E25 and sacrificed on day E30 (n=12).

2.4. CDH surgery

The pregnant rabbits were weighed and anesthetized with ketamine (35 mg/kg) (Parke-Davis, Morris Plains, NJ-USA) and xylazine (5 mg/kg) (Butler, Columbus, OH-USA) and endotracheally intubated titrating isoflurane (Piramal Critical Care Inc., Bethlehem, PA - USA) to maintain anesthesia. If the pregnant rabbit was spontaneously breathing, then it was provided 1 liter per minute humidified oxygen and 2-2.5% isoflurane through a T-piece. If the rabbit was not spontaneously breathing, it was placed on a ventilator with the same gas mixture. After shaving the surgical site was cleaned with 2% chlorhexidine alternating with 70% isopropyl alcohol 70% iodine three times. Body temperature was maintained at 37°C with a heated water blanket and warmed normal saline solution with 5% dextrose was administered at a rate of 4 mL/kg/hr. Oxygen saturation, heart rate, transcutaneous CO₂, and core body temperature were monitored.

Surgical creation of CDH was performed as described by Fauza, *et al.* at E25 (term = 31 days) (16). An incision on the uterine wall was made and the fetus was exposed. A left for LCDH or right for RCDH posterior thoracotomy was performed, and the diaphragm muscle was identified and gently cut with micro-scissors until abdominal contents were observed coming up to the thorax. Then the thorax and hysterotomy sites were closed and 2 mL of warm normal saline solution was infused into the amniotic

cavity. Fetuses in the other uterine horn were similarly operated upon. The abdominal wall was closed in two planes.

2.5. Harvest

At day E30, pregnant rabbits and fetuses were anesthetized with visual confirmation of CDH. Each fetus was removed from the uterus and leaded to echocardiography, weighed, then the heart and lung were collected immediately according to the experimental needs. After fetal harvest, the pregnant rabbit was euthanized using thioembutal and potassium chloride intravenously.

2.6. Echocardiographical evaluation.

2.6.1. Parameters that presented difference:

TV E/A - Tricuspid valve E/A ratio

TVLW E/A - tricuspid ventricular left wall e/a ratio

MVA - mitral valve (

MV E/A - mitral valve E/A ratio.

LA/BW - Left atrium/Body weight ratio

LVPW d/BW - Left ventricular posterior wall diastole end/Body weight ratio

LVPW s/BW - Left ventricular posterior wall diastole end/Body weight ratio

TAPSE - Tricuspid annular plane systolic excursion.

At day E30, after birth, neonatal echocardiography was performed using a Visualsonics Series 2100 high-resolution imaging system with a 38 MHz Microscan transducer probe as described previously. The imaging was optimized for mouse cardiovascular imaging with frame rates >300 frames/s. Measurements included LV end-diastolic diameter (in parasternal long-axis, M-mode, and short-axis view), left atrial (LA) and RV diameter (in the short-axis view), and fractional shortening (FS). LV and RV measurements were done at end diastole and systole, and LA measurements were done at just before the opening of the mitral valve. During analysis, if the endocardial borders were not well visualized or there was artifact, the images were discarded. Each echocardiogram was analyzed by two readers (Jain and James) after acquisition of the images.

2.6.2. Functional assessment with echocardiography

Cardiac function and anatomical parameters were assessed by echocardiography. Mice were anesthetized with 1.5–2.5% isoflurane. Echocardiograms were obtained with a Vevo 770 High-Resolution In Vivo Micro-Imaging System and RMV 707B Scanhead (VisualSonics Inc). Left ventricle (LV) dimensions, including end-diastolic and end-systolic dimensions (LVED and LVES, respectively), interventricular septal thickness in diastole and systole (IVSd and IVSs, respectively) and LV posterior wall thickness in diastole and systole (LVPWd and LVPWs, respectively) were measured directly.

Fractional shortening (FS), EF and the LVPW to wall thickness ratios in systole and diastole were then calculated.

2.7. Biometrical assessment

To evaluate the effect of CDH on heart growth, we measured the body (BW), heart (HW), and the HW/BW ratio weights of rabbit fetuses. The left lung (LLW), total lung (TLW) and TLW/BW ratio were measured to confirm the CDH severity (n=12).

2.8. Sample processing

Left and right ventricles were collected for biometrical, histological, immunofluorescence and molecular biology analysis. Lungs were collected for biometrical analysis. The samples for histology and immunofluorescence were fixed for 24h in paraformaldehyde 4%, then dehydrated in alcohol and posterior embedded in paraffin blocks. Heart samples for protein and RNA extraction were dissected and quickly submerged in liquid nitrogen and freeze at -80°C.

2.9. Histometric analysis

Six samples per group were used to perform the histometric analysis. Histological sections in the short-axis cross section (4µm) from the left and right ventricles were stained with hematoxylin-eosin and pictures were taken with photomicroscope Leica (Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Heerbrugg, Switzerland). The histometric measured parameters were: external perimeter (EP), side to side diameter (SD), anteroposterior diameter (AP), interventricular septum (IS), left ventricular wall thickness (LVWT), right ventricular wall thickness (RVWT), left ventricular internal perimeter (LVIP), right ventricular internal perimeter (RVIP), left ventricular area (LVA), right ventricular area (RVA). Five samples by group were measured by using imaging software NIS Elements 3.2 (Nikon Inc., Melville, NY, USA).

2.10. cTnI and cTnT evaluation by immunofluorescence

Six samples per group were used to perform IF analysis. Left and right ventricle slides were dried permeabilized with 0.1 % Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in phosphate buffered saline (PBS). 3% BSA/PBS was used to block for 1 hour and followed by incubation with primary cTnI (1:100) (ab10231 - Abcam Cambridge, MA 02139-1517 USA) and cTnT (1:500) (ab10214, Abcam Cambridge, MA 02139-1517, USA) overnight at 4°C in a humid chamber. Then slides were washed and incubated in secondary antibody anti-mouse (1:1000) (ab150117, goat Anti-Mouse IgG H&L - Alexa Fluor® 488, Abcam Cambridge, MA 02139-1517 USA) in PBS+BSA (5%) for 1 hour. After that washed and mounted in with DAPI (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) mounting media. Fluorescence signal was qualitatively analyzed by three subjects according to the intensity of 6 fields using the imaging software NIS Elements 3.2 (Nikon Inc., Melville, NY, USA).

2.11. Protein extraction

Each 20-40mg of left and right ventricle were homogenated by sonication (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) using T-PER (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) + Proteinase K + PhosphoSTOP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in 1.5 tubes by sonication and the homogenate were centrifuge at 10000 rpm for 5 minutes. Protein concentration was assessed by the BCA-mini method (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

2.12. cTnI and cTnT evaluation by western blotting

Six samples *per* group were used to perform WB analysis. Proteins (20 ug) were electrophoresed in 4 to 12% acrylamide gels for 50 minutes at 200V and transferred to PVDF membranes (Life Technologies, CA, USA) for 1.5h at 20V. After blocking with BSA (5%) for 1 hour, membranes were hybridized with antibodies cTnI (1:100) (ab10231 - Abcam Cambridge, MA 02139-1517 USA), cTnT (1:500) (ab10214, Abcam Cambridge, MA 02139-1517, USA) and β -actin (1:10000) (ab8226, Abcam, Cambridge, MA, USA) overnight at 4° C. Membranes were washed and hybridized to secondary antibody anti-mouse (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody) for 1 h and developed using a SuperSignal WestPico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Rockford, USA). Bands were quantified by the Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) and normalized by the β -Actin.

2.13. RNA extraction and gene expression by RT-qPCR

Six samples of left and right ventricles *per* group were homogenated (IkaT10 basic Ultra-Turrax homogenizer, USA) with RLT buffer and RNA was extracted using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Science, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Nucleic acids were quantitatively analyzed by spectrophotometry (Epoch Biotek, Biotek Instruments, Winooski, Vermont). 1ug of RNA/sample was retrotranscribed using RT² First strand Kit (Qiagen Sciences, Maryland, USA) and then run on a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR) for the specific TaqMan[®] Gene Expression Assay probes: TNNI3 (cTnI - Hs00165957_m1), TNNT2 (cTnT - Oc03396241_m1) and HPRT1 as the housekeeping (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The relative quantification of transcript expression was performed based on the 2-^{- $\Delta\Delta$ C} and the progression of the error was calculated.

Gene sequence:

TNNI3 *sequence*: 5'-ACCGAGAAGGAAAACCGGGAGGTGG-3'

TNNT2 *sequence*: 5'-GAGTGGACTTCGACGACATCCACCG-3'

2.14. cTnI plasmatic levels

cTnI plasmatic levels were measured by ELISA kit - ULTRA-SENSITIVE MOUSE CARDIAC TROPONIN-I (Life Diagnostics, Inc., Cat. No. CTNI-1-US) according to the company instructions. It was utilized 200ul of plasma per sample in a total of eight samples per group, the concentration of plasma cTnI was calculated by absorbance at 450 nm derived from a standard curve.

2.15. Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation. Inter-group comparisons of biometric and echocardiography analysis were performed with the ANOVA one-way test followed by non-parametric Tukey's test. Histometric, immunofluorescence, western blotting and RT-qPCR statistical analysis was performed using ANOVA one-way test followed by non-parametric Tukey's test and the unpaired Student's T-test. The Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) package was used for statistical calculations.

3. RESULTS

A total of twelve rabbit neonates *per* group were used to perform this study, six for histology and six for molecular biology. The mortality was 20% in the LCDH group and 7% in the RCDH group.

3.1. Echocardiographical evaluation

From the ECHO evaluated parameters, TV E/A and MV E/A presented higher values in RCDH *vs.* C and LCDH ($p < 0.05$). TVLW A'/E' and MVA were lower in RCDH, the first in comparison with LCDH group ($p < 0.05$), and the second in comparison with C and LCDH groups ($p < 0.05$). The LVPW d/BW, LVPW s/BW and TAPSE were lower in LCDH and RCDH groups compared with C group ($p < 0.005$). LA/BW was lower in LCDH group in comparison with the other groups ($p < 0.05$). TAPSE was lower in LCDH and RCDH groups compared with C group ($p < 0.05$). (Table 1, Figure 1)

Table 1. Echocardiographical results. Mean $\pm$ standard deviation.

	C	LCDH	RCDH
TV E/A	0.858 (± 0.375) ^{*c}	0.807 (± 0.393) ^{*c}	1.254 (± 0.393) ^{*a*b}
TVLW A'/E'	1.832 (0.490)	2.142 (0.444) ^{*c}	1.593 (0.494) ^{*b}
MVA	197.76 (± 74.36) ^{**c}	172.03 (± 40.96) ^{*c}	143.20 (± 36.89) ^{**a*b}
MV E/A	0.776 (± 0.247) ^{*c}	0.762 (± 0.226) ^{*c}	1.200 (± 0.525) ^{*a,b}
LA/BW	0.086 (± 0.021) ^{**b}	0.058 (± 0.014) ^{**a*c}	0.076 (± 0.015) ^{*b}
LVPW d/BW	0.033 (± 0.007) ^{**b,c}	0.025 (± 0.003) ^{**a}	0.024 (± 0.004) ^{**a}
LVPW s/BW	0.043 (± 0.009) ^{**b,c}	0.033 (± 0.005) ^{**a}	0.034 (± 0.005) ^{**a}
TAPSE	0.029 (± 0.009) ^{**b,*c}	0.020 (± 0.007) ^{*a}	0.021 (± 0.005) ^{**a}

TV E/A: Tricuspid valve E/A ratio. TVLW E/A: tricuspid ventricular left wall e/a ratio. MVA: mitral valve area. MV E/A: mitral valve E/A ratio. LA/BW: Left atrium/Body weight ratio. LVPW d/BW: Left ventricular posterior wall diastole end/Body weight ratio. LVPW s/BW: left ventricular posterior wall systole end/body weight ratio TAPSE: Tricuspid annular plane systolic excursion. * $p < 0.05$.

** $p < 0.005$. a: comparing to control group. b: comparing to LCDH group. c: comparing to RCDH group.

FIGURE 1

3.2. Biometrical assessment

Table 2 shows the biometrical results from all the groups (media and standard deviation). There was no difference in BW, HW and HW/BW ratio among groups (NS). LLW, TLW and TLW/BW ratio were lower in LCDH and RCDH groups in comparison with C group ($p < 0.005$). (Figure 2).

Table 2. Biometrical parameters results. Mean $\pm$ standard deviation.

	BW	HW	HW/BW	LLW	TLW	TLW/BW
C	40.03 (± 5.50)	0.246 (0.067)	0.0061 (0.0015)	0.357 (± 0.074) ^{**b,c}	0.885 (± 0.232) ^{**b,c}	0.022 (± 0.003) ^{**b,c}
LCDH	39.89 (± 4.23)	0.229 (0.054)	0.0058 (0.0014)	0.200 (± 0.069) ^{**a}	0.518 (± 0.135) ^{**a}	0.013 (± 0.003) ^{**a}
RCDH	39.17 (± 4.35)	0.242 (0.048)	0.0063 (0.0009)	0.213 (± 0.072) ^{**a}	0.484 (± 0.103) ^{**a}	0.012 (± 0.003) ^{**a}

BW: body weight. HW: heart weight. HW/BW: heart weight/ body weight ratio. LLW: left lung weight. TLW: total lung weight. TLW/BW: total lung weight/body weight ratio. a: comparing to control group. b: comparing to LCDH group. c: comparing to RCDH group. *= $p < 0.05$. **= $p < 0.005$.

FIGURE 2

3.3. Histometric analysis

There was no difference in EP, SD and IS among the groups (NS). The AP, LWT, RWT and LVA were decreased in LCDH group compared with C and RCDH groups ($p < 0.05$). The LVIP was decreased in LCDH and RCDH groups in comparison with C group ($p < 0.05$). The RVIP was increased in LCDH compared with C and RCDH groups ($p < 0.05$), and RVA was increased in LCDH and RCDH groups compared with C group ($p < 0.05$). (Table 3, Figure 3, Figure 4).

Table 3. Histometric analysis results. Mean $\pm$ standard deviation.

	C	LCDH	RCDH
EP	19631.2 ($\pm$ 1138.6)	18565.1 ($\pm$ 1780.5)	18565.1 ($\pm$ 1780.5)
SD	6462.4 ($\pm$ 322.6)	6726.1 ($\pm$ 506.3)	6726.1 ($\pm$ 506.4)
AP	5379.3 ($\pm$ 391.8) ^{*b}	4584.1 ($\pm$ 650.8) ^{*a,c}	5505,1 ($\pm$ 761,3) ^{*b}
LWT	1251.2 ($\pm$ 151.1) ^{**b}	1058.1 ($\pm$ 98.7) ^{**a,c}	1301.4 ($\pm$ 225.4) ^{*b}
RWT	1020.4 ($\pm$ 147.5) ^{*b}	840.1 ($\pm$ 154.8) ^{*a,c}	1031.8 ($\pm$ 180.5) ^{*b}
IS	1121.5 ($\pm$ 230.5)	1173.4 ($\pm$ 156.3)	1173.4 ($\pm$ 156.3)
LVIP	10373.2 ($\pm$ 2042.4) ^{*b}	7629.4 ($\pm$ 1576.1) ^{*a}	8404.71 ($\pm$ 812.65)
RVIP	11688 ($\pm$ 1033.9) ^{*b}	14700.5 ($\pm$ 1313.1) ^{*a**c}	11162.9 ($\pm$ 1750.9) ^{**b}
LVA (μm^2)	2601.5 x 10 ³ ($\pm$ 85.5) ^{**b}	1214.4 x 10 ³ ($\pm$ 39.9) ^{**a,c}	2480.4 x 10 ³ ($\pm$ 31.4) ^{**b}
RVA(μm^2)	2277.3 x 10 ³ ($\pm$ 108.2) ^{**b}	4319.9 x 10 ³ ($\pm$ 106.3) ^{**a}	3515,4 x 10 ³ ($\pm$ 499,7) ^{*a}

EP: external perimeter. SD: side to side diameter. AP: anteroposterior diameter. LWT: left ventricular wall thickness. RWT: right ventricular wall thickness. IS: internal septum. LVIP: left ventricular internal perimeter. RVIP: right ventricular internal perimeter. LVA: left ventricular area. RVA: right ventricular area. a: comparing to control group. b: comparing to LCDH group. c: comparing to RCDH group. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

FIGURE 3- graphics

FIGURE 4 – histology

3.4. cTnI and cTnT evaluation by immunofluorescence

The IF presented higher intensity of cTnI in the RV in the LCDH group and less intensity in the RCDH group (Figure 5). There was no difference in cTnT intensity among groups. Also in the LV there was no difference in cTnI and cTnT intensity in both ventricles.

FIGURE 5

3.5. cTnI and cTnT evaluation by western blotting

In the WB analysis the RV presented increased cTnI expression in LCDH group compared with C group ($p < 0.05$), there was no difference in cTnT expression among the groups (NS). In the LV there was no difference in both cTnI and cTnT expression among the groups (NS) (Table 4, Figure 6).

Table 4. Western blotting results of cTnI and cTnT. Mean± standard deviation.

	Left Ventricle		Right Ventricle	
	cTnI	cTnT	cTnI	cTnT
C	1.000 (±0.553)	0.999 (±0.054)	0.694 (±0.322) ^{*b}	0.721 (±0.222)
LCDH	0.708 (±0.172)	0.887 (±0.244)	1.139 (±0.652) ^{*a}	0.919 (±0.741)
RCDH	0.889 (±0.404)	0.911 (±0.132)	0.828 (±0.402)	0.754 (±0.280)

a: comparing to control group. b: comparing to LCDH group. c: comparing to RCDH group. ^{*} $p < 0.05$.

FIGURE 6

3.6. Gene expression by RT-qPCR

RT-qPCR results showed increased TNNI3 expression in the RV of LCDH group compared with C and RCDH groups ($p < 0.05$) and decreased TNNI3 expression in RCDH group compared with C and LCDH groups ($p < 0.005$). There was no difference in TNN2T expression (NS). In the LV, there was decreased TNNI3 expression in the RCDH group compared with the other groups ($p < 0.005$), in this same ventricle there was no difference in TNN2T expression (NS). (Table 5, Figure 7).

Table 5. RT-qPCR results of TNNI3 and TNN2T expression. Mean±standard deviation.

	Left Ventricle		Right Ventricle	
	TNNI3	TNN2T	TNNI3	TNN2T
C	1.000 (±0.157) ^{**c}	1.000 (±0.153)	1.000 (±0.087) ^{**b,c}	1.000 (±0.027)
LCDH	0.925 (±0.122) ^{**c}	0.879 (±0.116)	1.554 (±0.183) ^{**a,c}	0.896 (±0.079)
RCDH	0.143 (±0.029) ^{**a,b}	0.842 (±0.109)	0.182 (±0.019) ^{**a,b}	0.883 (±0.059)

TNNI3: cTnI. TNN2T: cTnT. a: comparing to control group. b: comparing to LCDH group. c: comparing to RCDH group. ^{*} $p < 0.05$. ^{**} $p < 0.005$.

FIGURE 7

3.7. cTnI plasmatic levels

There was no significant difference in cTnI plasmatic levels among groups (NS). However, from the LCDH group three out of eight subjects presented high levels of plasmatic cTnI (high standard

deviation), with no correlation in lung weight, tissue cTnI levels and the size of diaphragm hole. (Table 6, Figure 8).

Table 6. cTnI plasma levels. Mean $\pm$ standard deviation.

	Plasma cTnI
C	0,026 ($\pm$ 0,054)
LCDH	0,316 ($\pm$ 0,575)
RCDH	0,052 ($\pm$ 0,062)

FIGURE 8

4. DISCUSSION

Cardiac adaptation has been described as one of the most important causes of cardiorespiratory failure and poor prognosis in CDH (17). The heart development is a complex and important process during embryogenesis, that involves transcriptional gene regulation, molecular establishment, and maintenance of functional cardiac output (10, 18). Over the past years, the left ventricular hypoplasia and pulmonary hypertension (PH) have been largely studied in CDH, however many questions are still open, suggesting that there is still a "missing-link" in the pathophysiology of CDH, the cardiac adaptation could be the answer for better understand this disease (17,19,20).

The left-sided CDH (LCDH) is the most common and studied CDH in literature, while the right-sided CDH (RCDH) is rare and less found (3). Most of the studies comparing both LCDH and RCDH are controversial. DeKoninck et al. suggested that RCDH might be a totally different entity, with different response, treatment, and outcome (21). In our study, we verified, immediately after birth, different cardiac responses between isolated severe LCDH and RCDH in the rabbit model.

Our echocardiographical and histological results showed decreased left ventricle (LV) in LCDH, which in this study did not affect LV function, plus decreased right ventricular wall thickness associated with increased right ventricular area, evidencing dilatation of the right ventricle (RV) correlated with low TAPSE, an indicator of pulmonary hypertension and RV dysfunction. The results from RCDH showed decreased LV, as in LCDH, but with additional mitral valve dysfunction (MV E/A); increased RV area (dilatation) and low TAPSE (RV dysfunction), presenting tricuspid valve dysfunction (TV E/A and TVLW A/E'). These results appointed a functional compromise in left and right ventricle valves in RCDH, the same did not occur to LCDH, which despite presenting LV hypoplasia and RV dilatation did not present valvar dysfunction. There are some studies showing cardiac anatomic and functional alterations in CDH since fetal life. In a prospective study performed by Mieghen et. al. the LV end-diastolic and end-systolic dimensions were approximately 32-37% smaller in LCDH fetus compared with control fetus, and the LV in LCDH fetus were also decreased compared with controls, however,

these changes did not impair the LV function (22). By the other side, in a study of fetal echocardiography at medial gestational age (24-27 weeks), DeKoninck et al. verified smaller RV size and outflow in RCDH compared with controls, however, cardiac contractility was normal; in the same study no significant differences was observed in LV size and function (4). Similarly, Stressig et al. showed the association of "liver up" with predominant left heart hypoplasia in LCDH, but not RCDH fetuses, which presented a similar size in both left and right ventricles (23), in contrast to our study, that showed an LV internal perimeter (LVIP), LV posterior wall systolic/diastolic, MV area smaller and, MV dysfunction in RCDH compared with C group. It is known that LV hypoplasia in fetal life is considered a factor of poor prognosis in CDH (24). A study performed by Kailin et al. showed the association between the level of hypoplastic left heart and the severity of CDH, verifying the decreased LV end-diastolic dimension z-scores postnatally, plus a negative correlation between mitral valve size and percent of the intrathoracic liver (25). Our group verified in an experimental study in rabbits the immediate RV dilation and increased myocytes in term LCDH hearts (26).

The cardiac molecular adaptation is one of the most important indicators to determine the postnatal outcome in CDH, in literature few studies have been shown the alterations of cardiac growth factors in this disease (8, 10). Pelizzo et al. verified dishomogenous ventricular distribution of transforming growth factor-B (TGF-B), endothelin-1 (ET-1), desmin and muscle actin (HHF35) in CDH term hearts (10). Baptista et al. verified increased gene expression of angiotensinogen, endothelin-1 (ET-1) and B-type natriuretic peptide (BNP) in the RV of experimental CDH in rats (8).

Increased levels of cTnI and cTnT in neonates with cardiorespiratory distress have been demonstrated in many studies, high levels of cardiac troponins (cTns) in plasma is associated with poor outcome (27-29). The releasing mechanism of cTns to the plasma is known often for cardiomyocyte injury caused by sarcolemmal disruption, however high levels of cTns have been also related to reversible cardiac distress. Hessel et al. showed in isolated neonatal cardiomyocytes the release of cTnI by stimulation of stretch-responsive integrins with the absence of necrosis (30). In our study, increased levels of cTnI were verified by WB and RT-qPCR in the RV of LCDH, but not RCDH, which despite that, presented decreased gene expression of TNNI3 (cTnI) in both ventricles.

In LCDH the high levels of cTnI in the RV associated with decreased TAPSE, could translate a right ventricular overload and distress caused by PH since fetal life. The unique study evaluating cTnI in CDH was published by Astoria et al. that verified the association of high cTnI plasma levels with poor outcome in LCDH newborns who received extracorporeal membrane oxygenation therapy (ECMO), suggesting cTnI as a good marker to cardiac distress in neonates with LCDH (14). One hypothesis is that increasing the time living of rabbit neonates in our study would elevate levels of cTnI in plasma, which is one of our limitations. Although in our study we did not encounter the same result in RCDH, the low gene expression of TNNI3 plus the nonassociation of gene and protein expression could strongly represent the adaptation and molecular remodeling of cardiac cells. Ru Su et al. performed a right ventricular protein profile comparing protein and gene expressions levels in end-stage of heart failure,

and the findings showed seven different proteomes expressed between ischemic and not ischemic hearts with no consistent correlation of messenger RNA (mRNA) and protein expression, suggesting a major role for RV post-transcriptional protein expression regulation (31). Previously, Schwanhaussner et al. verified that mRNA expression represents around 40% of the variability in protein levels (32).

In conclusion, despite LCDH and RCDH presented equally LV hypoplasia and RV dilatation by anatomical measurements, the functional and molecular response was mainly different between both, showing that the defect side changes the pathophysiology of the disease. Also, it seems that for presenting valve dysfunction and a no specific changing in gene and protein expression, RCDH had an impaired cardiac functional response than LCDH, suggesting that LCDH and RCDH have different cardiac responses and should be treated as different entities. Clinical and molecular studies are needed to explore the differences in cardiac adaptation between LCDH and RCDH.

Our study has limitations, as the short time living of rabbit neonates, the evaluation of only one biomarker, the non-calculation of the left and right ventricle weight ratio (mass) and the missing of fetal cardiac evaluation.

5. REFERENCES

1. Schaible T, Kohl T, Reinshagen K, Brade J, Neff KW, Stressig R, Büsing KA. Right-versus left-sided congenital diaphragmatic hernia: postnatal outcome at a specialized tertiary care center. *Pediatr Crit Care Med*. 2012 Jan;13(1):66-71. doi: 10.1097/PCC.0b013e3182192aa9.
 2. Hedrick HL, Crombleholme TM, Flake AW, Nance ML, von Allmen D, Howell LJ, Johnson MP, Wilson RD, Adzick NS. Right congenital diaphragmatic hernia: Prenatal assessment and outcome. *J Pediatr Surg*. 2004 Mar;39(3):319-23; discussion 319-23.
 3. Victoria T, Danzer E, Oliver ER, Edgar JC, Iyooob S, Partridge EA, Johnson AM, Peranteau WH, Coleman BG, Flake AW, Johnson MP, Hedrick HH, Adzick NS. Right Congenital Diaphragmatic Hernias: Is There a Correlation between Prenatal Lung Volume and Postnatal Survival, as in Isolated Left Diaphragmatic Hernias? *Fetal Diagn Ther*. 2017 Mar 21. doi: 10.1159/000464246.
 4. DeKoninck P, Richter J, Van Mieghem T, Van Schoubroeck D, Allegaert K, De Catte L, Deprest JA. Cardiac assessment in fetuses with right-sided congenital diaphragmatic hernia: case-control study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014 Apr;43(4):432-6. doi: 10.1002/uog.12561.
 5. Byrne FA, Keller RL, Meadows J, Miniati D, Brook MM, Silverman NH, Moon-Grady AJ. Severe left diaphragmatic hernia limits size of fetal left heart more than does right diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Dec;46(6):688-94. doi: 10.1002/uog.14790.
 6. Skari H, Bjørnland K, Haugen G, Egeland T, Emblem R. Congenital diaphragmatic hernia: a meta-analysis of mortality factors. *J Pediatr Surg*. 2000 Aug;35(8):1187-97.
 7. Patel N. Use of milrinone to treat cardiac dysfunction in infants with pulmonary hypertension secondary to congenital diaphragmatic hernia: a review of six patients. *Neonatology*. 2012;102(2):130-6. doi: 10.1159/000339108.
 8. aptista MJ, Nogueira-Silva C, Areias JC, Correia-Pinto J. Perinatal profile of ventricular overload markers in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 2008 Apr;43(4):627-33. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2007.08.044.
 9. Teitel DF, Iwamoto HS, Rudolph AM. Changes in the pulmonary circulation during birth-related events. *Pediatr Res*. 1990 Apr;27(4 Pt 1):372-8.
 10. Pelizzo G, Bussani R, Zandonà L, Custrin A, Bellieni CV, De Silvestri A, Calcaterra V. Cardiac Adaptation to Severe Congenital Diaphragmatic Hernia. *Fetal Pediatr Pathol*. 2016;35(1):10-20. doi: 10.3109/15513815.2015.1122125.
-

11. Zambaiti E, Bussani R, Calcaterra V, Zandonà L, Silvestri F, Peiró JL, Marotta M, Andreatta E, Pelizzo G. Myocardial effects of fetal endoscopic tracheal occlusion in lambs with CDH. *Prenat Diagn*. 2016 Apr;36(4):362-7. doi: 10.1002/pd.4789.
 12. Rocha LA, Byrne FA, Keller RL, Miniati D, Brook MM, Silverman NH, Moon-Grady AJ. Left heart structures in human neonates with congenital diaphragmatic hernia and the effect of fetal endoscopic tracheal occlusion. *Fetal Diagn Ther*. 2014;35(1):36-43. doi: 10.1159/000356437.
 13. Siebert JR, Haas JE, Beckwith JB. Left ventricular hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg*. 1984 Oct;19(5):567-71.
 14. Astoria MT, Karam SE, Moores RR Jr, Rozycki HJ. Cardiac Troponin Levels in Neonates Who Require ECMO for Noncardiac Indications Are Elevated in Nonsurvivors. *Am J Perinatol*. 2015 Jul;32(9):859-64. doi: 10.1055/s-0034-1543983.
 15. Shastri AT, Samarasekara S, Muniraman H, Clarke P. Cardiac troponin I concentrations in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatr*. 2012 Jan;101(1):26-9. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02432.x.
 16. Fauza DO, Tannuri U, Ayoub AA, Capelozzi VL, Saldiva PH, Maksoud JG. Surgically produced congenital diaphragmatic hernia in fetal rabbits. *J Pediatr Surg*. 1994 Jul;29(7):882-6.
 17. Sharland GK, Lockhart SM, Heward AJ, Allan LD. Prognosis in fetal diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol*. 1992 Jan;166(1 Pt 1):9-13.
 18. Franco D, Kelly RG. Contemporary cardiogenesis: new insights into heart development. *Cardiovasc Res*. 2011 Jul 15;91(2):183-4. doi: 10.1093/cvr/cvr160.
 19. Karamanoukian HL, Glick PL, Wilcox DT, O'Toole SJ, Rossman JE, Azizkhan RG. Pathophysiology of congenital diaphragmatic hernia. XI: Anatomic and biochemical characterization of the heart in the fetal lamb CDH model. *J Pediatr Surg*. 1995 Jul;30(7):925-8; discussion 929.
 20. Karamanoukian HL, Glick PL, Wilcox DT, O'Toole SJ, Rossman JE, Azizkhan RG. Pathophysiology of congenital diaphragmatic hernia. XI: Anatomic and biochemical characterization of the heart in the fetal lamb CDH model. *J Pediatr Surg*. 1995 Jul;30(7):925-8; discussion 929.
 21. DeKoninck P, Gomez O, Sandaite I, Richter J, Nawapun K, Eerdekens A, Ramirez JC, Claus F, Gratacos E, Deprest J. Right-sided congenital diaphragmatic hernia in a decade of fetal surgery. *BJOG*. 2015 Jun;122(7):940-6. doi: 10.1111/1471-0528.13065.
 22. Van Mieghem T, Gucciardo L, Doné E, Van Schoubroeck D, Graatsma EM, Visser GH, Verhaeghe J, Deprest J. Left ventricular cardiac function in fetuses with congenital diaphragmatic hernia and the effect of fetal endoscopic tracheal occlusion. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009 Oct;34(4):424-9. doi: 10.1002/uog.7340.
 23. Stressig R, Fimmers R, Axt-Flidner R, Gembruch U, Kohl T. Association of intrathoracic herniation of the liver with left heart hypoplasia in fetuses with a left diaphragmatic hernia but not in fetuses with a right diaphragmatic hernia. *Ultraschall Med*. 2011 Dec;32 Suppl 2:E151-6. doi: 10.1055/s-0031-1281651.
 24. Byrne FA, Keller RL, Meadows J, Miniati D, Brook MM, Silverman NH, Moon-Grady AJ. Severe left diaphragmatic hernia limits size of fetal left heart more than does right diaphragmatic hernia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Dec;46(6):688-94. doi: 10.1002/uog.14790.
 25. Kailin J, Dhillon G, Maskatia S, Cass D, Shamshirsaz A, Mehollin-Ray A, Cassady C, Ayres N, Wang Y, Belfort M, Olutoye O, Ruano R. Fetal left-sided cardiac structural dimensions in left-sided congenital diaphragmatic hernia - association with severity and impact on postnatal outcomes. *Prenat Diagn*. 2017 Mar 31. doi: 10.1002/pd.5045.
 26. Manso PH, Figueira RL, Prado CM, Gonçalves FL, Simões AL, Ramos SG, Sbragia L. Early neonatal echocardiographic findings in an experimental rabbit model of congenital diaphragmatic hernia. *Braz J Med Biol Res*. 2015 Mar;48(3):234-9. doi: 10.1590/1414-431X20144184.
 27. Clark SJ, Newland P, Yoxall CW, Subhedar NV. Concentrations of cardiac troponin T in neonates with and without respiratory distress. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004 Jul;89(4):F348-52.
 28. Liu X, Chakkarapani E, Stone J, Thoresen M. Effect of cardiac compressions and hypothermia treatment on cardiac troponin I in newborns with perinatal asphyxia. *Resuscitation*. 2013 Nov;84(11):1562-7. doi: 10.1016/j.resuscitation.2013.07.003.
-

29. Trevisanuto D, Doglioni N, Altinier S, Zaninotto M, Plebani M, Zanardo V. Cardiac troponin I at birth is of fetal-neonatal origin. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009 Nov;94(6):F464-6. doi: 10.1136/adc.2008.145987.
 30. Hessel MH, Atsma DE, van der Valk EJ, Bax WH, SchaliJ MJ, van der Laarse A. Release of cardiac troponin I from viable cardiomyocytes is mediated by integrin stimulation. *Pflugers Arch.* 2008 Mar;455(6):979-86.
 31. Su YR, Chiusa M, Brittain E, Hemnes AR, Absi TS, Lim CC, Di Salvo TG. Right ventricular protein expression profile in end-stage heart failure. *Pulm Circ.* 2015 Sep;5(3):481-97. doi: 10.1086/682219.
 32. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):337-42. doi: 10.1038/nature10098.
-

11. ANEXOS

11.1. Anexo Ecocardiografia

Resultado da análise ecocardiográfica por indivíduo.

	AVM			VPAO			VE/PN		
	C	CDH	CDHTO	C	CDH	CDHTO	C	CDH	CDHTO
N1	218,3	202,6	143,0	203,5	186	85,2	2,09	2,1	0,9578
N2	226	233,2	169,1	187	147,1	85	3,73	1,5	2,2533
N3	177,9	152	192,7	170,6	149,1	94,8	3,18	2,35	3,0031
N4	201,9	173,5	121,6	126,9	209,2	115,6	1,88	3,58	0,2835
N5	210,3	114,6	125,1	80,2	207,8	273,9	2,43	2,95	2,252
N6	161,3	202,6	114,5	99,7	171	59,5	3,7	4,36	1,6744
N7	230,6	203,2	112,9	183,8	182,4	127	1,87	1,47	2,1413
N8	194,5	142,3	140,6	152,3	111,6	82,3	3,27	2,09	1,5287
N9	116,6	207,7	94,5	235,7	230,3	101,2	3,3	3,38	1,9326
N10	188,8	169,8	117,1	139,5	129,5	96,9	1,87	0,99	2,3334
MÉDIA	192,62	180,15	133,11	157,92	172,40	112,14	2,73	2,48	1,84
DP	34,33	36,19	29,25	47,80	37,96	59,79	0,78	1,07	0,77

N: Neonato. **DP:** Desvio padrão. **AMV:** área da valva mitral. **VPAO:** velocidade de pico da valva aórtica. **PN:** peso corporal ao nascer. **VE/PN:** razão espessura ventrículo esquerdo/PN.

Resultado da análise ecocardiográfica por indivíduo.

EPVE d/PN				EPVE s/PN			TAPSE/PN		
	CDH	CDHTO	C	CDH	CDHTO	C	CDH	CDHTO	C
N1	0,038	0,023	0,0219	0,045	0,03	0,0287	0,0361	0,015	0,0239
N2	0,037	0,027	0,0256	0,07	0,038	0,0388	0,0505	0,0171	0,023
N3	0,027	0,027	0,0342	0,031	0,033	0,049	0,0327	0,0167	0,0257
N4	0,025	0,022	0,0162	0,031	0,0348	0,0207	0,0274	0,0267	0,0111
N5	0,043	0,024	0,0284	0,05	0,035	0,0444	0,0315	0,0141	0,0213
N6	0,0183	0,024	0,0349	0,0206	0,03	0,0551	0,0265	0,012	0,0266
N7	0,031	0,021	0,0323	0,041	0,027	0,0455	0,0273	0,0208	0,0177
N8	0,029	0,025	0,0304	0,038	0,035	0,0325	0,0253	0,0159	0,0205
N9	0,027	0,021	0,0323	0,039	0,035	0,0436	0,0203	0,0189	0,0279
N10	0,029	0,022	0,0276	0,04	0,035	0,0262	0,0276	0,025	0,0223
MÉDIA	0,03	0,02	0,03	0,04	0,03	0,04	0,03	0,02	0,02
DP	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00

N: Neonato. **DP:** Desvio padrão. **EPVE d/PN:** razão parede posterior ventricular esquerda final da diástole/PN. **EPVE s/PN:** razão parede posterior ventricular esquerda final da diástole/PN. **TAPSE/PN:** razão da função sistólica do ventrículo direito/PN; a seta preta indica o gráfico com os grupos C e CDH apenas para demonstração visual da diferença encontrada. **PN:** peso ao nascer

11.2. Anexo Análise Biométrica

Resultado da análise biométrica por indivíduo.

	CONTROLE					
	PN(g)	PC (g)	PC/PN	PPE (g)	PPT (g)	PPT/PN (g)
N1	36,100	0,285	0,008	0,296	0,716	0,020
N2	44,514	0,285	0,006	0,434	1,084	0,024
N3	39,610	0,270	0,007	0,352	0,933	0,024
N4	36,400	0,198	0,005	0,318	0,769	0,021
N5	39,700	0,217	0,005	0,318	0,753	0,019
N6	47,970	0,185	0,004	0,455	1,122	0,023
N7	29,820	0,123	0,004	0,239	0,450	0,015
N8	47,610	0,384	0,008	0,460	1,220	0,026
N9	42,890	0,335	0,008	0,413	1,087	0,025
N10	39,610	0,270	0,007	0,352	0,933	0,024
MÉDIA	40,422	0,255	0,006	0,364	0,907	0,022
DP	5,583	0,076	0,002	0,074	0,235	0,003

N: neonato. **DP:** Desvio padrão. **PN:** Peso corporal ao nascer. **PC:** Peso coração. **PPE:** Peso pulmão esquerdo. **PPT:** Peso pulmão total.

Resultado da análise biométrica por indivíduo.

	CDH					
	PN(g)	PC (g)	PC/PN	PPE (g)	PPT (g)	PPT/PN (g)
N1	39,260	0,303	0,008	0,223	0,557	0,014
N2	42,350	0,258	0,006	0,163	0,377	0,009
N3	37,400	0,215	0,006	0,119	0,441	0,012
N4	43,434	0,275	0,006	0,177	0,445	0,010
N5	35,850	0,241	0,007	0,154	0,392	0,011
N6	42,077	0,243	0,006	0,136	0,418	0,010
N7	47,370	0,246	0,005	0,313	0,767	0,016
N8	40,820	0,114	0,003	0,218	0,601	0,015
N9	33,300	0,292	0,009	0,169	0,393	0,012
N10	34,010	0,214	0,006	0,277	0,587	0,017
MÉDIA	39,587	0,240	0,006	0,195	0,498	0,013
DP	4,475	0,053	0,002	0,062	0,126	0,003

N: neonato. **DP:** Desvio padrão. **PN:** Peso corporal ao nascer. **PC:** Peso coração. **PPE:** Peso pulmão esquerdo. **PPT:** Peso pulmão total.

Resultado da análise biométrica por indivíduo.

	CDHTO					
	PN (g)	PC (g)	PC/PN (g)	PPE (g)	PPT (g)	PPT/PN (g)
N1	35,076	0,216	0,006	0,190	0,574	0,016
N2	33,789	0,253	0,007	0,160	0,476	0,014
N3	30,726	0,220	0,007	0,412	1,400	0,046
N4	33,013	0,219	0,007	0,405	1,145	0,035
N5	33,496	0,332	0,010	0,231	0,690	0,021
N6	42,788	0,248	0,006	0,389	1,231	0,029
N7	41,895	0,288	0,007	0,686	1,791	0,043
N8	35,917	0,317	0,009	0,365	1,132	0,032
N9	32,210	0,238	0,007	0,369	1,039	0,032
N10	35,543	0,272	0,008	0,147	0,513	0,014
MÉDIA	35,445	0,260	0,007	0,335	0,999	0,028
DP	3,959	0,041	0,001	0,162	0,431	0,011

N: neonato. **DP:** Desvio padrão. **PN:** Peso corporal ao nascer. **PC:** Peso coração. **PPE:** Peso pulmão esquerdo. **PPT:** Peso pulmão total.

11.3. Anexo Histol6gia

Resultado da an6lise histol6gica por indiv6duo.

CONTROLE										
	PE (µm)	DLL (µm)	DAP (µm)	EPE (µm)	EPD (µm)	SI (µm)	PIVE (µm)	PIVD (µm)	AVE (µm ²)	AVD (µm ²)
N1	20032,79	6248,63	5052,78	1345,152	1013,8	1000,2625	12019,77	12121,52	2329403,23	2343146,94
N2	19920,44	6391,61	5410,31	1174,968	1029,13	1231,3025	7994,88	10351,03	2120262,65	1426306,3
N3	19233,61	6039,58	5851,53	1474,914	1093,698	1246,2075	11215,47	11114,31	3647872,37	3805444
N4	18333,35	6965,33	4952,18	1032,068	1046,898	953,9225	9839,32	13089,84	3312341,50	1087336,36
MEDIA	19380,0	6411,3	5316,7	1256,8	1045,9	1107,9	10267,4	11669,2	2852469,9	2165558,4
DP	782,1	365,3	407,2	193,7	34,6	152,4	1762,3	1192,8	742489,8	1248188,1

N: neonato. **DP:** Desvio padr6o. **PE:** per6metro externo. **DLL:** di6metro latero-lateral. **DAP:** di6metro antero-posterior. **EPE:** espessura da parede ventricular esquerda. **EPD:** espessura da parede ventricular direita. **SI:** septo interventricular. **PIVE:** per6metro interno do ventr6culo esquerdo. **PIVD:** per6metro interno do ventr6culo direito. **AVE:** 6rea ventricular esquerda. **AVE:** 6rea ventricular direita.

Resultado da análise histológica por indivíduo.

	CDH									
	PE (µm)	DLL (µm)	DAP (µm)	EPE (µm)	EPD (µm)	SI (µm)	PIVE (µm)	PIVD (µm)	AVE (µm ²)	AVD (µm ²)
N1	19526,02	6991,53	4500,89	1012,772	885,976	1165,23	7289,62	14346,68	1325450,5	5370485,34
N2	19382,5	7068,64	5023,5	1000,246	879,944	1257,9025	7757,56	13298,25	1659285,91	5439209,22
N3	18748,54	6596,65	4360,35	1142,968	640,792	843,1525	7707,31	16455,76	1247756,31	3572420,03
N4	18668,56	6379,81	5194,51	1146,94	852,912	1344,98	7670,98	14701,45	805709,97	3064650,42
MEDIA	19081,41	6759,16	4769,81	1075,73	814,91	1152,82	7606,37	14700,54	1259550,67	4361691,25
DP	435,73	326,64	401,96	80,11	116,96	219,10	214,13	1313,07	437154,00	1222562,13

N: neonato. **DP:** Desvio padrão. **PE:** perímetro externo. **DLL:** diâmetro latero-lateral. **DAP:** diâmetro antero-posterior. **EPE:** espessura da parede ventricular esquerda. **EPD:** espessura da parede ventricular direita. **SI:** septo interventricular. **PIVE:** perímetro interno do ventrículo esquerdo. **PIVD:** perímetro interno do ventrículo direito. **AVE:** área ventricular esquerda. **AVE:** área ventricular direita.

Resultado da análise histológica por indivíduo.

	CDHTO									
	PE (µm)	DLL (µm)	DAP (µm)	EPE (µm)	EPD (µm)	SI (µm)	PIVE (µm)	PIVD (µm)	AVE (µm²)	AVD (µm²)
N1	16916,863	5680,308	4812,935	925,1572	581,8918	896,9706667	8758,876	9365,456	1224328,074	2147281,295
N2	14060,914	4757,283	4320,524	1109,541	709,6254	1101,875667	4670,792	5595,704	870318,991	1422945,471
N3	15210,901	5405,971	4933,155	1209,67	1192,806	995,7766667	5546,736	9333,666	1253824,633	2968806,188
N4	16838,883	4613,024	4808,933	1320,695	829,1408	1009,977667	5094,589	5877,184	2672472,72	1941320,758
MEDIA	15756,9	5114,1	4718,9	1141,3	828,4	1001,2	6017,7	7543,0	1505236,1	2120088,43
DP	1377,3	511,3	271,8	167,9	263,1	83,9	1862,1	2089,2	797428,8	642657,9

N: neonato. **DP:** Desvio padrão. **PE:** perímetro externo. **DLL:** diâmetro latero-lateral. **DAP:** diâmetro antero-posterior. **EPE:** espessura da parede ventricular esquerda. **EPD:** espessura da parede ventricular direita. **SI:** septo interventricular. **PIVE:** perímetro interno do ventrículo esquerdo. **PIVD:** perímetro interno do ventrículo direito. **AVE:** área ventricular esquerda. **AVE:** área ventricular direita.

11.4. Anexo Western Blotting

Expressão de cTnI por indivíduo

cTnI						
VENTRÍCULO DIREITO				VENTRÍCULO ESQUERDO		
	C	CDH	CDHTO	C	CDH	CDHTO
N1	0,6635	1,3239	0,5549	1,4191	0,7975	0,7763
N2	0,4646	1,5603	1,1459	1,5067	0,5297	0,7414
N3	0,5587	0,8358	0,6431	1,7829	0,5970	1,0124
N4	0,8197	0,6737	0,8917	0,7054	0,4673	1,1926
N5	0,7749	1,6381	1,2879	0,3687	0,9607	0,5848
N6	0,5623	0,7239	-	0,4644	0,6557	0,9182
MEDIA	0,6406	1,1260	0,9047	1,0412	0,6680	0,8709
DP	0,1375	0,4337	0,3146	0,6012	0,1828	0,2160

N: neonato. **DP:** Desvio padrão

Expressão de cTnT por indivíduo

cTnT						
VENTRÍCULO DIREITO				VENTRÍCULO ESQUERDO		
	C	CDH	CDHTO	C	CDH	CDHTO
N1	0,8884	0,9718	1,0091	0,9902	0,7486	0,7175
N2	0,6417	0,9611	0,9892	1,0361	0,5690	0,6338
N3	0,7873	0,6978	0,8982	0,9382	0,7517	1,1125
N4	0,5811	0,9527	1,2371	0,9789	0,9243	0,9826
N5	1,1391	0,7161	-	1,0869	1,1168	1,0352
N6	0,4760	0,6523	-	0,9655	1,2112	0,9076
MEDIA	0,7522	0,8253	1,0334	0,9993	0,8869	0,8982
DP	0,2397	0,1512	0,1441	0,0537	0,2441	0,1868

N: neonato. **DP:** Desvio padrão

11.5. Anexo RT-qPCR

TNNI3 no ventrículo esquerdo. Valores da quantificação relativa de DNA (*Ct- cycle threshold*).

TNNI3 - VE							
		Gene Alvo		Gene Referência (Endógeno)		ΔCt	erro padrão
		Ct	DP	Ct	DP		
CONTROLE	N1	32,5026	0,3712	23,1791	0,5017	9,3235	0,6241
	N2	32,9313	0,3008	23,5874	0,2260	9,3438	0,3762
	N3	35,0449	0,0706	24,0255	0,3918	11,0195	0,3982
	N4	38,9776	0,0000	29,6246	0,0953	9,3530	0,0953
	N5	34,0583	0,1146	23,3304	0,1595	10,7278	0,1963
	N6	32,2696	0,2486	23,4751	0,0376	8,7946	0,2514
CDH	N1	33,5284	0,1314	23,6161	0,0572	9,9123	0,1433
	N2	31,2652	0,0782	23,4250	0,0573	7,8401	0,0970
	N3	34,0135	0,2418	22,7606	0,1107	11,2530	0,2660
	N4	33,8430	0,3326	22,5863	0,1436	11,2566	0,3623
	N5	32,9408	0,1076	23,3029	0,0953	9,6379	0,1437
	N6	31,7851	0,3094	22,4454	0,0201	9,3397	0,3100
CDHTO	N1	32,1486	0,0147	23,8285	0,0954	8,3201	0,0965
	N2	33,2571	0,0230	24,8335	0,0508	8,4236	0,0558
	N3	36,4552	0,3192	23,9756	0,0838	12,4796	0,3300
	N4	34,2593	0,1580	22,5984	0,0828	11,6609	0,1784
	N5	33,5235	0,0462	22,7057	0,0086	10,8179	0,0470
	N6	32,7583	1,5044	22,5158	0,3156	10,2425	1,5372

N: neonato. **Ct:** cycle threshold - ciclo limiar. **DP:** desvio padrão. **ΔCt :** valor resultante da quantificação relativa do DNA após correção pelo gene-endógeno.

TNN2T no ventrículo esquerdo. Valores da quantificação relativa de DNA (*Ct- cycle threshold*).

TNN2T - VE							
		Gene Alvo		Gene Referência (Endógeno)			
		Ct	SD	Ct	SD	ΔCt	error
CONTROLE	N1	14,1787	0,3178	23,1791	0,5017	-9,0004	0,5939
	N2	14,6982	0,0522	23,5874	0,2260	-8,8892	0,2320
	N3	15,2573	0,1763	24,0255	0,3918	-8,7681	0,4297
	N4	20,5749	0,1760	29,6246	0,0953	-9,0497	0,2002
	N5	14,1140	0,2843	23,3304	0,1595	-9,2165	0,3260
	N6	14,0799	0,1404	23,4751	0,0376	-9,3952	0,1453
CDH	N1	15,1110	0,3668	23,6161	0,0572	-8,5051	0,3712
	N2	14,4115	0,0025	23,4250	0,0573	-9,0136	0,0574
	N3	14,0858	0,1427	22,7606	0,1107	-8,6748	0,1806
	N4	13,6784	0,0874	22,5863	0,1436	-8,9080	0,1681
	N5	14,3201	0,1488	23,3029	0,0953	-8,9828	0,1767
	N6	13,9925	0,2902	22,4454	0,0201	-8,4530	0,2909
CDHTO	N1	14,9183	0,0925	23,8285	0,0954	-8,9102	0,1329
	N2	15,9347	0,0417	24,8335	0,0508	-8,8988	0,0657
	N3	15,6152	0,0208	23,9756	0,0838	-8,3604	0,0864
	N4	13,7746	0,0941	22,5984	0,0828	-8,8238	0,1253
	N5	13,7931	0,0156	22,7057	0,0086	-8,9126	0,0178
	N6	13,3567	0,1042	22,5158	0,3156	-9,1590	0,3323

N: neonato. **Ct:** cycle threshold - ciclo limiar. **DP:** desvio padrão. **ΔCt :** valor resultante da quantificação relativa do DNA após correção pelo gene-endógeno.

TNNI3 no ventrículo direito. Valores da quantificação relativa de DNA (Ct- cycle threshold).

TNNI3 - VD							
		Gene Alvo		Gene Referência (Endógeno)			
		Ct	DP	Ct	DP	ΔCt	erro padrão
CONTROLE	N1	33,5273	0,0546	23,9182	0,0339	9,6091	0,0643
	N2	32,7182	0,0700	23,2328	0,0764	9,4854	0,1036
	N3	33,6593	0,1395	24,5995	0,0197	9,0599	0,1408
	N4	34,1393	0,0591	24,5641	0,0201	9,5752	0,0624
	N5	33,3559	0,0630	23,4060	0,0217	9,9499	0,0667
	N6	33,7277	0,3728	23,6469	0,0550	10,0809	0,3769
CDH	N1	36,9874	0,0056	26,7879	0,2730	10,1995	0,2731
	N2	29,8567	0,0391	21,2255	0,0295	8,6312	0,0490
	N3	33,6114	0,2251	24,5481	0,1780	9,0633	0,2869
	N4	32,7459	0,3426	23,5433	0,0609	9,2026	0,3480
	N5	33,3610	0,7990	24,4335	0,0237	8,9274	0,7993
	N6	29,3780	0,0782	20,7732	0,1269	8,6049	0,1490
CDHTO	N1	32,8150	0,3227	24,2719	0,4490	8,5430	0,5529
	N2	31,2321	0,0216	23,3628	0,0106	7,8693	0,0240
	N3	32,4527	0,2511	23,5646	0,0650	8,8881	0,2594
	N4	34,0422	0,4662	23,7661	0,1152	10,2761	0,4802
	N5	33,0005	0,1196	22,9630	0,0225	10,0375	0,1217
	N6	33,6083	0,0891	24,5062	0,0952	9,1021	0,1304

N: neonato. **Ct:** cycle threshold - ciclo limiar. **DP:** desvio padrão. **ΔCt:** valor resultante da quantificação relativa do DNA após correção pelo gene-endógeno.

TNN2T no ventrículo direito. Valores da quantificação relativa de DNA (Ct- cycle threshold).

TNN2T - VD							
		Gene Alvo		Gene Referência (Endógeno)			
		Ct	DP	Ct	DP	ΔCt	erro padrão
CONTROLE	N1	15,7468	0,0183	23,9182	0,0339	-8,1714	0,0385
	N2	14,7183	0,0050	23,2328	0,0764	-8,5145	0,0766
	N3	15,7490	0,1179	24,5995	0,0197	-8,8505	0,1195
	N4	15,6054	0,0309	24,5641	0,0201	-8,9587	0,0369
	N5	14,5857	0,0332	23,4060	0,0217	-8,8203	0,0397
	N6	14,6704	0,0451	23,6469	0,0550	-8,9764	0,0712
CDH	N1	16,3778	0,3467	24,4690	0,4351	-8,0912	0,5563
	N2	18,8421	0,4509	26,7879	0,2730	-7,9458	0,5271
	N3	12,6270	0,0331	21,2255	0,0295	-8,5985	0,0443
	N4	15,1765	0,2949	24,5481	0,1780	-9,3716	0,3444
	N5	14,6311	0,0997	23,5433	0,0609	-8,9123	0,1169
	N6	15,9346	0,0659	24,4335	0,0237	-8,4989	0,0700
CDHTO	N1	15,5102	0,0224	24,2719	0,4490	-8,7617	0,4495
	N2	14,4357	0,0358	23,3628	0,0106	-8,9271	0,0374
	N3	14,5044	0,0226	23,5646	0,0650	-9,0602	0,0688
	N4	14,8726	0,1806	23,7661	0,1152	-8,8935	0,2142
	N5	14,2262	0,0008	22,9630	0,0225	-8,7369	0,0226
	N6	15,9376	0,0962	24,5062	0,0952	-8,5686	0,1353

N: neonato. **Ct:** cycle threshold - ciclo limiar. **DP:** desvio padrão. **ΔCt:** valor resultante da quantificação relativa do DNA após correção pelo gene-endógeno.