

Hernia Diafragmática Congénita: Frontera entre Ciencia Básica y Clínica

Javier Kattan S.¹

Resumen

El recién nacido con hernia diafragmática congénita (HDC) representa hoy un gran reto. La herniación precoz de vísceras como el hígado, antes de las 24 semanas de gestación provoca hipoplasia pulmonar severa, incompatible con la vida. Esto ha motivado a investigar las señales moleculares que modulan la hipoplasia pulmonar y a desarrollar nuevas terapias *in utero*. El modelo más usado en investigación es el modelo de HDC inducido por nitrofen en ratas. Este modelo ha permitido el estudio de factores de crecimiento, mediadores de óxido nítrico y endotelina, surfactante, cofactores y el estudio de los efectos de la oclusión traqueal *in utero*, tanto en el parénquima como en la vasculatura pulmonar. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) aparece como factor de crecimiento destacado para el desarrollo del parénquima pulmonar, mientras que el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), endotelina-1 y sus receptores son importantes para el desarrollo vascular en HDC. Para recién nacidos con HDC de alta mortalidad se han ideado protocolos de intervención *in utero*. Los intentos de corrección completa *in utero* fracasaron, pero la investigación básica respaldó el uso de técnicas de oclusión traqueal en fetos humanos. Tanto en animales como en fetos humanos se ha demostrado que la oclusión traqueal produce un dramático crecimiento pulmonar y que su vasculatura pulmonar regresa a lo normal. Actualmente se están evaluando estas técnicas de oclusión traqueal *in utero* por vía endoscópica mediante estudios clínicos controlados en fetos con un riesgo de morir cercano al 100%. Factores de crecimiento como VEGF y FGF serían buenos candidatos para terapia génica *in utero*. Quizás en el futuro, la combinación de oclusión traqueal y terapia génica *in utero* puedan dar un nuevo enfoque al manejo de esta devastadora enfermedad.

(**Palabras clave:** hernia diafragmática congénita, hipoplasia pulmonar, hipertensión pulmonar, nitrofen, oclusión traqueal, factores de crecimiento).

Congenital Diafragmatic hernia: the frontier between basic and clinical science

A newborn with a congenital diaphragmatic hernia (CDH) represents one of the challenges of modern medicine. The early herniation of viscera such as the liver before 24 weeks of gestation produces severe pulmonary hypoplasia which is incompatible with life. For this reason we investigated the molecular signals responsible for pulmonary hypoplasia and to develop new intrauterine therapies. The model most used in research is the nitrofen induced CDH rat. This model allows the study of growth factors, nitric oxide

1. Médico Cirujano. Unidad de Neonatología, Departamento de Pediatría, Pontificia Universidad Católica de Chile.

mediators, endothelin, surfactant and in utero effects of tracheal occlusion on lung parenchyma and vasculature. FGF is an important growth factor for lung development and VEGF, endothelin-1 and its receptors are important for vascular development in CDH. There are in utero surgery protocols for newborns with a high mortality from CDH. Attempts for a complete in utero correction have failed, but basic research has supported the use of tracheal occlusion techniques in human foetus. In animal and human foetus it has been demonstrated that tracheal occlusion produces a dramatic growth of the lung and that the lung vasculature returns to normal. Currently under investigation are in utero tracheal occlusion techniques using endoscopy in controlled clinical trials, with a mortality risk close to 100% for the foetus. Growth factors like VEGF and FGF could be possible candidates for in utero gene therapy. It is possible in the future that the combination of tracheal occlusion and in utero gene therapy could provide a new approach for treating this devastating disease.

(Key words: congenital diaphragmatic hernia, pulmonary hypoplasia, pulmonary hypertension, nitrofen, tracheal occlusion, growth factors.)

ABREVIACIONES MÁS USADAS

HDC	: hernia diafragmática congénita	BFGF	: basic fibroblast growth factor
HDC-N	: hernia diafragmática congénita inducida por nitrofen	TGF-β1	: transforming growth factor beta 1
ECMO	: oxigenación con membrana extracorpórea	EGFR	: epidermal growth factor receptor
ETA y ETB	: receptores de endotelina A y B	PTHrP	: parathyroid hormone-related peptide
FGFs	: fibroblast growth factors	TTF-1	: thyroid transcription factor 1
VEGFs	: vascular endothelial growth factors	SP-A	: proteína de surfactante A
PDGF-B	: platelet derived growth factor B	NO	: óxido nítrico
IGF I y II	: insulin growth factor I y II	ENOS	: endothelial nitric oxide synthase
		LHR	: relación pulmón-cabeza (lung-to-head-ratio)

INTRODUCCIÓN

La hernia diafragmática congénita (HDC) constituye una de las patologías más complejas que el neonatólogo debe tratar. Su incidencia es aproximadamente de 1 por 2 400 nacidos vivos, con una alta mortalidad que va desde un 80% a un 40%, dependiendo si se estudian los casos desde el periodo prenatal o posnatal, respectivamente¹. Se trata en general de un recién nacido de término, que en más de un 60% no presenta otras malformaciones². Su problema original es un simple defecto embrionario ocurrido entre las semanas octava y décima de gestación, debido a la falta de cierre de los canales pleuroperitoneales³. Sin embargo, si por este simple defecto se produce una herniación de vísceras abdominales, en especial hígado, lo suficientemente temprano en la gestación (< 24 semanas), esta herniación provoca hipoplasia pulmonar severa, incompatible con la vida. Harrison et al estimaron que su mortalidad *in utero* o "mortalidad oculta" es de un 34%⁴. Una vez fuera del útero, la

hipoplasia pulmonar y la hipertensión pulmonar persistente son la principal causa de morbi-mortalidad.

En la última década han habido grandes avances en el cuidado neonatal intensivo. En centros terciarios se utiliza de rutina ventilación de alta frecuencia, óxido nítrico y ECMO (oxigenación con membrana extracorpórea) en recién nacidos graves con HDC. Estas nuevas terapias no han sido suficientes para cambiar el curso devastador de HDC con hipoplasia pulmonar severa, lo que ha motivado tanto a científicos como a clínicos alrededor del mundo a investigar las señales moleculares que modulan la hipoplasia pulmonar y a desarrollar nuevas terapias *in utero* para frenar su progresión durante el desarrollo fetal.

Desde fines de los años 70, los pacientes con HDC han sido diagnosticados por ultrasonografía en el periodo prenatal. Esto ha permitido el tratamiento *in utero* de los casos de HDC con peor pronóstico. El tratamiento *in utero* ha gatillado un intenso esfuerzo experimental y de investigación clíni-

ca, pero a pesar de tres décadas de experimentación en animales y dos décadas de experiencia en fetos humanos aún quedan obstáculos por resolver.

Modelos experimentales de HDC en animales

El primer modelo de hernia diafrágica congénita (HDC) fue descrito en 1967⁵. Este fue un modelo creado quirúrgicamente en corderos. Desde entonces los modelos animales se han hecho más sofisticados. Hoy existen tres tipos de modelos: 1) un modelo quirúrgico creado en corderos y conejos, 2) un modelo inducido por teratógenos, descrito en ratas y ratones, 3) un modelo congénito en una clase especial de cerdo⁶. El modelo más usado hoy en investigación de HDC es el modelo inducido con nitrofen en fetos de ratas (en adelante llamado HDC-N).

El nitrofen (2,4-dichloro-phenyl-p-nitrophenyl ether) fue un herbicida producido comercialmente, con el que se encontraron efectos teratogénicos⁷. El nitrofen afecta especialmente al pulmón y al diafragma y ha sido exitosamente usado en ratas para producir HDC (figura 1)⁷. Cuando se da vía oral 115-300 mg/k a la rata embarazada entre el día 9 y 11 de gestación, cerca del 60% de los fetos desarrolla HDC muy similar a la presentada en seres humanos. Este modelo de HDC-N ha permitido el detallado estudio de la hipoplasia pulmonar a nivel molecular. Por ejemplo, se ha evidenciado disminución de surfactante y aumento de endotelina-1, se ha estudiado el efecto de corticoides prenatales, de factores de crecimiento como FGFs y VEGFs, de vitaminas como la A y E y, de gran importancia, se ha logrado estudiar a nivel molecular los efectos de la oclusión traqueal *in utero* sobre el pulmón hipoplásico y su vasculatura^{8-11,5,9,12-22}.

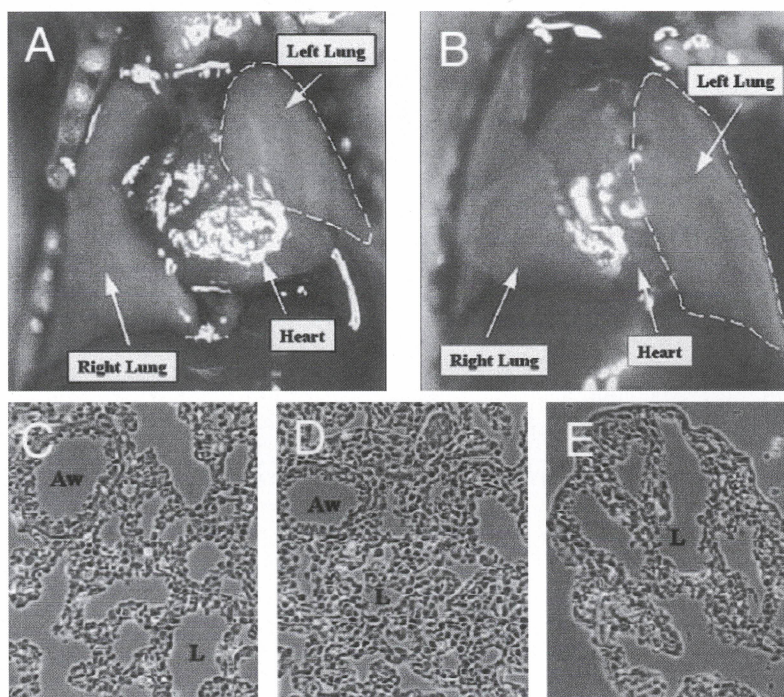


Figura 1. Oclusión traqueal *in utero* de ratas con hernia diafrágica inducida por nitrofen (HDC-N). A, rata con HDC-N e hipoplasia pulmonar. B, marcado crecimiento pulmonar posterior a oclusión traqueal *in utero* en HDC-N. C, microscopía de pulmón normal de rata control. D, microscopía de pulmón hipoplásico de rata con HDC-N. E, microscopía de pulmón de rata con HDC-N posterior a oclusión traqueal. Notar aumento de alveolarización similar a control. L = lumen, Aw = vía aérea. Fotos cortesía del Dr. Joseph Kitterman y Cheri Chapin, Universidad de California, San Francisco.

Parénquima pulmonar en HDC

La experiencia clínica y los estudios en animales han demostrado que el crecimiento del pulmón fetal es controlado primariamente por fuerzas mecánicas. Si dichas fuerzas se alteran, provocan un crecimiento pulmonar anormal. La fuerza más importante es la distensión o estiramiento. Esta ocurre como estiramiento tónico, en los periodos sin movimientos respiratorios fetales, o como estiramiento repetitivo intermitente durante los movimientos respiratorios fetales^{23,24}. Además, como factores físicos, son de especial importancia el volumen de líquido pulmonar, el tamaño del espacio intratorácico y el volumen de líquido amniótico²⁵. Esta fuerza de distensión o estiramiento estaría alterada en HDC, traduciéndose en cambios en la expresión de señales moleculares, las que disminuirían el crecimiento pulmonar. Gracias a estudios *in vitro* y en animales con HDC-N, se han demostrado algunos cambios en la expresión de señales moleculares en el pulmón, dentro de las que destacan: a) factores de crecimiento, como PDGF-B, IGF-I, IGF-II, bFGF, VEGF y TGF- β 1; b) receptores, como EGFR, receptores de glucocorticoides, de hormona tiroidea y de ácido retinoico; c) factores humorales, como PTHRP; d) factores de transcripción, como TTF-1; y e) señales intracelulares, como proteína quinasa C^{24,26-29}. Dentro de todas estas señales moleculares, se ha demostrado que la familia de factores de crecimiento FGF juega un rol destacado en el desarrollo del parénquima pulmonar, factores que están alterados en ratas con hipoplasia pulmonar inducida por nitrofen¹⁵. Acosta et al demostraron recientemente *in vitro* que al aportar FGF-10 se pudo rescatar la hipoplasia pulmonar de HDC-N¹⁶.

A través de variaciones en estas señales se produce hipoplasia global con ambos pulmones afectados, pero de mayor severidad en el pulmón ipsilateral a la herniación. Esto produce una disminución en el número de divisiones bronquiales y en el número y madurez de los alvéolos. Los neumocitos son disfuncionales provocando una disminución cualitativa y cuantitativa de surfactante³⁰. En HDC-N se ha evidenciado una distribución anormal de surfactante y una disminución de la proteína de surfactante A (SP-A) y esfingomielina^{8,10}.

En este mismo modelo animal de HDC-N,

se ha comprobado en los últimos años que el uso de dexametasona prenatal incrementa el crecimiento pulmonar fetal, evidenciado por una mayor síntesis de ADN, surfactante y proteínas de surfactante, mayor contenido de ARN y proteína, y mayor expresión génica de factores de crecimiento como bFGF, TGF- β 1 y PDGF en el pulmón hipoplásico^{9,14,29}. También en este modelo experimental, el uso de cofactores prenatales como vitamina A y E ha demostrado una disminución en la incidencia y severidad de HDC, y un mayor crecimiento y madurez pulmonar^{17,18,31}.

Vasculatura pulmonar en HDC

En 1963, Areechon y Reid describieron hipoplasia pulmonar en HDC y la postularon como causa de muerte de los recién nacidos³². No se prestó mayor atención a la vasculatura pulmonar de HDC hasta 1971, en que Murdock et al sugieren que la hipertensión pulmonar podría afectar la sobrevivencia de estos recién nacidos³³. Este hallazgo hizo poner mayor atención en la vasculatura pulmonar. En 1971 Kitagawa et al demostraron que el número de ramificaciones arteriales estaba dramáticamente disminuido y que las paredes de los vasos estaban engrosadas, sugiriendo una hiperplasia de sus células musculares lisas³⁴. Levin et al confirmó más tarde que el área vascular total de pulmones con HDC estaba disminuida³⁵. Luego, Coleman et al describen en HDC un menor número de arteriolas, arterias engrosadas, menos capilares periféricos, aumento del grosor de la adventicia y una mayor interfase alvéolo/capilar³⁶. Contrariamente a lo esperado, se ha demostrado que pese al mayor grosor de las arterias pulmonares en HDC, éstas no presentan vasoconstricción exagerada e incluso presentan vasoconstricción disminuida^{37,38}. Hasta ahora, no se ha estudiado en detalle cómo se desarrollan los vasos pulmonares en HDC, ni tampoco las señales moleculares que regulan su desarrollo.

En los últimos años se ha comenzado a investigar el rol de algunas señales vasculogénicas y angiogénicas en la vasculatura pulmonar de HDC. Shehata et al describió un aumento de VEGF en la capa muscular media de arterias pulmonares pequeñas de recién nacidos que fallecen de HDC³⁹. Recientemente, Muratore et al demostró *in vitro* que el estiramiento de células pulmonares

fetales, provenientes de animales sometidos a oclusión traqueal, aumenta la expresión de VEGF²⁷. Oue et al demostró que los niveles de ARN mensajero de bFGF, TGF- β 1 y PDGF están disminuidos en pulmones de ratas con HDC-N, pero que estos factores de crecimiento aumentan con el uso de corticoides prenatales²⁹.

Recientemente, Chinoy et al reportaron que el receptor EGFR está disminuido en HDC-N, sugiriendo que están comprometidos los mecanismos de transformación mesénquimo-epitelial, mecanismo importante en el reclutamiento de células para la pared de la vasculatura²⁸.

El importante rol que tienen los factores de crecimiento, sus receptores y algunos factores de transcripción en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis, junto con la evidencia inicial que algunos de ellos están alterados en la vasculatura pulmonar de HDC, hace imprescindible una mayor, más profunda y detallada investigación de estas señales en el desarrollo vascular pulmonar de esta patología.

Por la fuerte asociación entre hipertensión pulmonar y HDC se ha estudiado el rol del óxido nítrico (NO) y sus mediadores. En HDC-N se ha descrito una disminución de eNOS, aumento de endotelina-1 y de su receptor ETA, pero sin cambios en su receptor ETB^{11,40}. Debido a que endotelina-1 es un mitógeno de células musculares lisas vasculares, endotelina-1 y su receptor ETA pueden contribuir a la muscularización de arterias pulmonares en HDC^{11,41}. En consecuencia, estos podrían ser bloqueados y utilizados para remodelar la hiperplasia vascular pulmonar en HDC y así revertir la hipertensión pulmonar¹¹. Recientemente, Thebaud et al demostraron en corderos con HDC, que la vía de señales para NO está intacta, sin embargo, existe un desbalance de los receptores para endotelina-1 (ETA y ETB), lo que condicionaría hipertensión pulmonar persistente⁴². El uso de corticoides prenatales, en HDC-N, favorecería la expresión del receptor ETB y del péptido natriurético, lo que beneficiaría a la vasculatura pulmonar^{12,43}.

Probablemente, la vasculatura pulmonar en HDC está poco desarrollada porque la expresión de señales moleculares como factores de crecimiento, receptores y factores de transcripción está alterada respecto al pulmón normal. Como consecuencia, se produce una vasculatura poco desarrollada, pero

hiperplásica en su capa muscular media y adventicia. La activación o supresión de estas señales son las responsables del mal desarrollo vascular, y por ende, éste es un punto susceptible de ser modificado mediante agonistas y antagonistas del desarrollo vascular pulmonar en HDC, incluyendo el uso de terapia génica. Como evidencia de que es posible modificar la vasculatura pulmonar mediante terapia génica, tenemos el estudio de Partovian et al en hipertensión pulmonar. Ellos lograron sobreexpresar exitosamente VEGF en el pulmón de ratas con hipertensión pulmonar inducida por hipoxia. Mediante instilación intratraqueal de un vector deficiente en replicación, Ad. VEGF (adenovirus-vascular endothelial growth factor), obtuvieron aumento de eNOS y NO, prevención y disminución de la muscularización de las arterias pulmonares distales respecto a controles y protección de la función endotelial⁵.

Oclusión traqueal in utero y HDC

El espectro clínico en HDC varía desde recién nacidos mínimamente afectados que evolucionan bien con el manejo neonatal moderno hasta recién nacidos severamente afectados que mueren a pesar de toda intervención. Los fetos con HDC pueden ser hoy estratificados en grupos de bajo y alto riesgo, basados en la edad gestacional al minuto del diagnóstico, presencia o ausencia de herniación del hígado y estimación del tamaño pulmonar mediante la relación pulmón-cabeza (LHR o lung-to-head ratio)⁴⁴. Así, los fetos de alto riesgo, con diagnóstico antes de las 24 semanas de gestación, herniación hepática y LHR < 1,0, tienen extremadamente mal pronóstico (90% mortalidad) pese a conocer su condición meses antes del parto. Estos largos meses de espera y frustración, observando como se producía hipoplasia pulmonar, llevó a un intenso esfuerzo de experimentación *in utero* en corderos y luego a la reparación completa de fetos humanos con HDC severa. La primera cirugía fetal para corregir una HDC *in utero* fue realizada en el año 1989, por el Dr. Michael Harrison y equipo, en la Universidad de California San Francisco⁴⁵. Su reparación completa *in utero* fracasaba cuando el hígado estaba herniado en el tórax, dado que al reducir el hígado de vuelta hacia el abdomen se producía una obstrucción aguda del retorno venoso umbilical⁴⁶. Esto produjo el

abandono de técnicas que intentaran reparar en forma completa una HDC *in utero*, pero la investigación en esta área continuó.

Como se mencionó previamente, estudios en animales habían demostrado que el crecimiento del pulmón fetal es controlado primariamente por fuerzas mecánicas, en especial distensión o estiramiento²³. Un caso descrito varias décadas atrás dio la clave para el siguiente paso y así iniciar la investigación en oclusión traqueal. Potter et al en 1941 notaron en la autopsia de un recién nacido con HDC, que uno de sus lóbulos pulmonares estaba desconectado del resto de su vía aérea y que este lóbulo estaba sobredistendido y lleno de líquido, a diferencia del resto del pulmón que estaba hipoplásico⁴⁷. Otros casos de atresia laríngea confirmaron esta observación y dieron luz para plantear que el mantener el líquido pulmonar fetal y por consiguiente la expansión pulmonar, podría prevenir o revertir la hipoplasia pulmonar asociada a HDC²⁵. Más tarde, experimentos en corderos mostraron que la oclusión traqueal *in utero* podía corregir la hipoplasia pulmonar asociada a HDC, empujando las vísceras de vuelta a la cavidad abdominal y desarrollando pulmones que al nacer son de mayor tamaño y mejor función²⁵.

El dramático crecimiento del parénquima pulmonar posterior a la oclusión traqueal *in utero* se produce por proliferación celular, con aumento del contenido total de proteínas y ADN, manteniendo una relación ADN-proteína normal^{19,20,48}. A pesar de acelerar el crecimiento pulmonar, la oclusión traqueal retarda la madurez pulmonar en corderos, evidenciada por una menor producción de fosfolípidos de surfactante, SP-A, SP-B y menor número de neumocitos tipo II. Efecto reversible con el uso de corticoides prenatales.

Respecto a su vasculatura, se demostró que luego de la oclusión traqueal los pulmones desarrollan una mayor área vascular, con menor muscularización de vasos pequeños, llevándola a niveles normales, y una capa adventicia que se reduce también al grosor normal^{22,49}.

Aún existe escasa información acerca de las señales que son gatilladas como consecuencia de la oclusión traqueal, pero varios laboratorios están abocados actualmente a su estudio. Como ejemplo, existen estudios en corderos que demuestran que la oclusión

traqueal aumenta la expresión pulmonar de factores de crecimiento como TGF- β 2, VEGF y KGF (keratinocyte growth factor)^{27,50,51}.

Gracias a la reciente creación del modelo de oclusión traqueal en ratas con HDC-N, se han comenzado a investigar más a fondo los mecanismos celulares y moleculares responsables del crecimiento pulmonar inducido por oclusión traqueal (figura 1). Chapin et al presentaron en el último congreso de la Sociedad para Investigación Pediátrica de EE.UU., evidencia de que la oclusión traqueal en ratas con HDC-N estimula el crecimiento pulmonar fetal a través de un aumento de ciclina D1, y ciclina A y S, estas últimas precursoras de mitosis⁵².

Para aplicar esta estrategia de oclusión traqueal *in utero* a HDC humanas, se desarrollaron técnicas que permitieran una oclusión temporal, pero que no dañaran la tráquea y que pudiera ser fácilmente retirada al nacer. Previamente experimentado en corderos, se han desarrollado y probado varias técnicas de oclusión como; 1) un dispositivo oclusivo traqueal o "plug" (por el acrónimo "plug the lung until it grows"), hecho de un polímero permeable y expansible que se coloca a través de la laringe, 2) un dispositivo de oclusión externa, clips metálicos, colocado por fuera de la tráquea, 3) y un balón traqueal despegable, que es colocado en la tráquea a través de una broncoscopia fetal (figuras 2 y 3). El primer dispositivo utilizado, ("plug"), se desechó dado que provocaba traqueomalacia^{53,54}. Más tarde, los clips traqueales demostraron ser efectivos en ocluir la tráquea y aumentar el crecimiento pulmonar *in utero*. Harrison et al publicó en 1998 el resultado de los primeros 19 casos de oclusión traqueal *in utero* con clips metálicos en pacientes con herniación hepática y relación pulmón-cabeza baja (LHR < 1,4), comparados con el manejo posnatal habitual en un centro con ECMO⁵⁵. La sobrevida del grupo tratado con oclusión traqueal por vía endoscópica (fetoscopia) fue de un 75%, comparado con un 38% de sobrevida en el grupo con tratamiento posnatal. Contrariamente, cuando se realizó oclusión traqueal con cirugía intrauterina abierta la sobrevida fue de sólo un 15%, aun menor que en el grupo de manejo posnatal, debido a que la oclusión traqueal fue menos efectiva. Este estudio no fue caso-control o aleatorio, pero sentó las bases para el próximo estudio clínico⁵⁵. Sin embargo, a pesar de

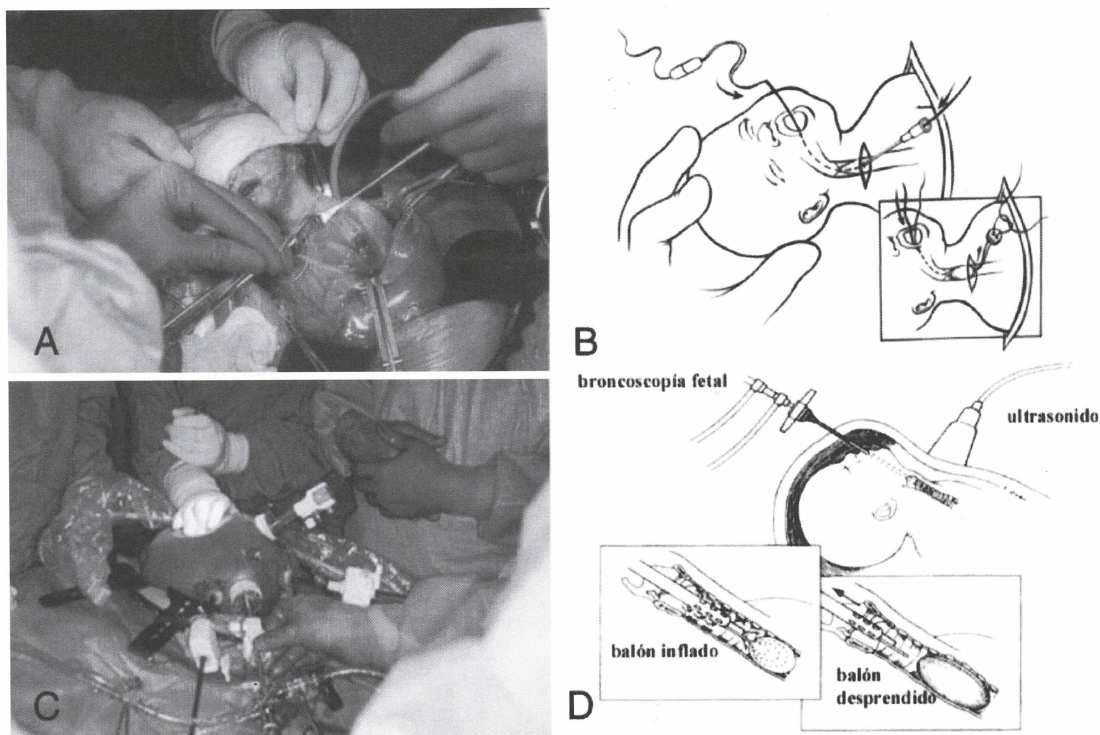


Figura 2. Oclusión traqueal *in utero* en fetos humanos. A y B, oclusión *in utero* mediante histerotomía y dispositivo "plug" colocado a través de la laringe. C y D, oclusión *in utero* utilizando un balón intratraqueal despegable por vía broncoscópica y endoscopia intrauterina (fetoscopia). Fotos y dibujos cortesía de los Dr. Michael Harrison y Craig Albanese, Universidad de California, San Francisco.

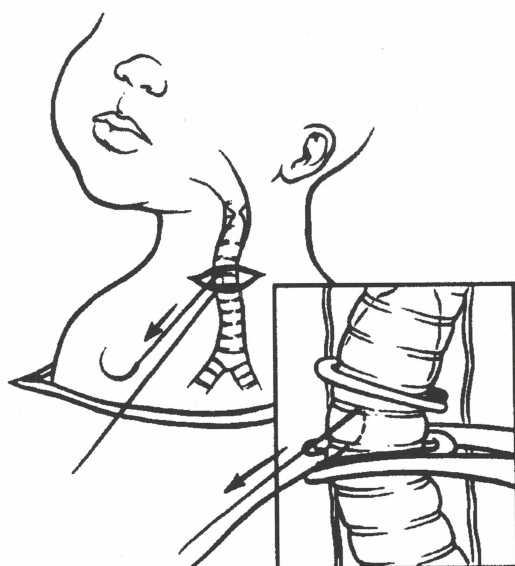


Figura 3. Oclusión traqueal *in utero* mediante clips traqueales. Técnica realizada mediante histerotomía o endoscopia intrauterina (fetoscopia). Dibujo cortesía de los Dr. Michael Harrison y Craig Albanese, Universidad de California, San Francisco.

estos buenos resultados iniciales, se evidenció que los clips traqueales producían alteraciones en la tráquea, como estenosis residual. Debido a esto, se decidió cambiar el dispositivo de oclusión en el siguiente estudio clínico, reemplazando los clips por balones despegables intratraqueales.

El año 1999 se comenzó en la Universidad de California San Francisco, patrocinado por el NIH, un estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorio, que compara el uso del balón traqueal despegable colocado mediante broncoscopia fetal y fetoscopia *versus* el manejo posnatal habitual incluyendo ECMO⁵⁶. Este estudio era para pacientes con HDC severas con herniación hepática y relación pulmón-cabeza baja ($LHR < 1,4$). Luego de reclutar 22 recién nacidos no se encontró diferencia en la sobrevida entre ambos grupos. Debido a esto, actualmente se está replanteando el estudio para recién nacidos con HDC e hipoplasia pulmonar extremadamente severa ($LHR < 0,9$). Hoy sólo se ofrece oclusión traqueal *in utero* a recién nacidos con HDC muy severas, dadas por

herniación hepática y LHR < 0,9 (comunicación personal Dr. Joseph Kitterman, UCSF).

CONCLUSIONES

Se ha avanzado enormemente en el entendimiento de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos que llevan a hipoplasia pulmonar e hipertensión pulmonar en HDC. Además, hoy es posible intervenir al feto *in utero* en varios centros en el mundo con bastante seguridad para su madre. Sin embargo, son aún varios los obstáculos que debe superar la terapia fetal para mejorar la morbilidad de estos recién nacidos, como por ejemplo, la alta incidencia de parto prematuro posterior a la cirugía intrauterina y el daño a la tráquea producido por los dispositivos de oclusión.

La posibilidad actual de acceder a la tráquea fetal de pacientes con HDC a edades tempranas de gestación, abre el camino para investigar el uso de moduladores del parénquima y vasculatura pulmonar mediante terapia génica. Factores de crecimiento como VEGF y FGF, y otras señales como endotelina-1 con sus receptores ETA y ETB, serían buenos candidatos para iniciar estudios de modulación génica en modelos animales con HDC. Quizás en un futuro cercano, la combinación de oclusión traqueal y terapia génica *in utero*, realizados en forma mínimamente invasiva por vía endoscópica, puedan dar un nuevo enfoque al manejo prenatal de esta devastadora enfermedad.

REFERENCIAS

1. Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, Nakayama DK, Manning FA, deLorimier AA: Diaphragmatic hernia in the fetus: prenatal diagnosis and outcome in 94 cases. *J Pediatr Surg* 1985; 20(4): 357-61.
2. Witters I, Legius E, Moerman P, et al: Associated malformations and chromosomal anomalies in 42 cases of prenatally diagnosed diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet* 2001; 103(4): 278-82.
3. Kluth D, Losty PD, Schnitzer JJ, Lambrecht W and Donahoe PK: Toward understanding the developmental anatomy of congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 1996; 23(4): 655-69.
4. Harrison MR, Bjordal RI, Langmark F, Knutrud O: Congenital diaphragmatic hernia: the hidden mortality. *J Pediatr Surg* 1978; 13(3): 227-30.
5. Partovian C, Adnot S, Raffestin B, et al: Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23(6): 762-71.
6. Wilcox DT, Irish MS, Holm BA and Glick PL: Animal models in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 1996; 23(4): 813-22.
7. Manson JM: Mechanism of nitrofen teratogenesis. *Environ Health Perspect* 1986; 70: 137-47.
8. Mysore MR, Margraf LR, Jaramillo MA, et al: Surfactant protein A is decreased in a rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(2): 654-7.
9. Guarino N, Oue T, Shima H and Puri P: Antenatal dexamethasone enhances surfactant protein synthesis in the hypoplastic lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* 2000; 35(10): 1468-73.
10. Utsuki T, Hashizume K and Iwamori M: Impaired spreading of surfactant phospholipids in the lungs of newborn rats with pulmonary hypoplasia as a model of congenital diaphragmatic hernia induced by nitrofen. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1531 (1-2): 90-8.
11. Okazaki T, Sharma HS, McCune SK and Tibboel D: Pulmonary vascular balance in congenital diaphragmatic hernia: enhanced endothelin-1 gene expression as a possible cause of pulmonary vasoconstriction. *J Pediatr Surg* 1998; 33(1): 81-4.
12. Shima H, Oue T, Taira Y, Miyazaki E and Puri P: Antenatal dexamethasone enhances endothelin receptorB expression in hypoplastic lung in nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* 2000; 35(2): 203-7.
13. Migliazza L, Xia HM, Arnaiz A, et al: Prenatal dexamethasone rescues heart hypoplasia in fetal rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2000; 35(12): 1757-61.
14. Oue T, Shima H, Guarino N and Puri P: Antenatal dexamethasone administration increases fetal lung DNA synthesis and RNA and protein content in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatr Res* 2000; 48(6): 789-93.
15. Jesudason, EC, Connell MG, Fernig DG, Lloyd DA, Losty PD: In vitro effects of growth factors on lung hypoplasia in a model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2000; 35(6): 914-22.
16. Acosta JM, Thebaud B, Castillo C, et al: Novel mechanisms in murine nitrofen-induced pulmonary hypoplasia: FGF-10 rescue in culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(1): L250-7.
17. Islam S, Narra V, Cote GM, Manganaro TF, Donahoe PK, Schnitzer JJ: Prenatal vitamin E

- treatment improves lung growth in fetal rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1999; 34(1): 172-6 discussion 176-7.
18. Thebaud B, Tibboel D, Rambaud C, et al: Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Physiol* 1999; 277(2 Pt 1): L423-9.
 19. Kitano Y, Davies P, von Allmen D, Adzick NS, Flake AW: Fetal tracheal occlusion in the rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Appl Physiol* 1999; 87(2): 769-75.
 20. Kitano Y, Kanai M, Davies P, et al: BAPS prize-1999: Lung growth induced by prenatal tracheal occlusion and its modifying factors: a study in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2001; 36(2): 251-9.
 21. Kay S, Laberge JM, Flageole H, Richardson S, Belanger S, Piedboeuf B: Use of antenatal steroids to counteract the negative effects of tracheal occlusion in the fetal lamb model. *Pediatr Res* 2001; 50(4): 495-501.
 22. Kanai M, Kitano Y, von Allmen D, Davies P, Adzick NS, Flake AW: Fetal tracheal occlusion in the rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia: tracheal occlusion reverses the arterial structural abnormality. *J Pediatr Surg* 2001; 36(6): 839-45.
 23. Kitterman JA: The effects of mechanical forces on fetal lung growth. *Clin Perinatol* 1996; 23(4): 727-40.
 24. Liu M, Post M: Invited review: mechanochemical signal transduction in the fetal lung. *J Appl Physiol* 2000; 89(5): 2078-84.
 25. Nobuhara KK, Wilson JM: The effect of mechanical forces on *in utero* lung growth in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 1996; 23(4): 741-52.
 26. Miyazaki, E, Ohshiro K, Taira Y, Puri P: Altered insulin-like growth factor I mRNA expression in human hypoplastic lung in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1998; 33(10): 1476-9.
 27. Muratore CS, Nguyen HT, Ziegler MM, Wilson JM: Stretch-induced upregulation of VEGF gene expression in murine pulmonary culture: a role for angiogenesis in lung development. *J Pediatr Surg* 2000; 35(6): 906-12; discussion 912-3.
 28. Chinoy MR, Chi X, Cilley RE: Down-regulation of regulatory proteins for differentiation and proliferation in murine fetal hypoplastic lungs: altered mesenchymal-epithelial interactions. *Pediatr Pulmonol* 2001; 32(2): 129-41.
 29. Oue T, Shima H, Taira Y and Puri P: Administration of antenatal glucocorticoids upregulates peptide growth factor gene expression in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg* 2000; 35(1): 109-12.
 30. Wilcox DT, Irish MS, Holm BA, Glick PL: Pulmonary parenchymal abnormalities in congenital diaphragmatic hernia. *Clin Perinatol* 1996; 23(4): 771-9.
 31. Thebaud B, Barlier-Mur AM, Chailley-Heu B, et al: Restoring effects of vitamin A on surfactant synthesis in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(6): 1083-9.
 32. Areechon W: Hypoplasia of the lung with congenital diaphragmatic hernia. *Br Med* 1963; 1: 230-3.
 33. Murdock AI, Burrington JB, Swyer PR: Alveolar to arterial oxygen tension difference and venous admixture in newly born infants with congenital diaphragmatic herniation through the foramen of Bochdalek. *Biol Neonate* 1971; 17(3): 161-72.
 34. Kitagawa M, Hislop A, Boyden EA, Reid L: Lung hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. A quantitative study of airway, artery, and alveolar development. *Br J Surg* 1971; 58(5): 342-6.
 35. Levin DL: Morphologic analysis of the pulmonary vascular bed in congenital left-sided diaphragmatic hernia. *J Pediatr* 1978; 92(5): 805-9.
 36. Coleman C, Zhao J, Gupta M, et al: Inhibition of vascular and epithelial differentiation in murine nitrofen-induced diaphragmatic hernia. *Am J Physiol* 1998; 274(4 Pt 1): L636-46.
 37. Newell MA, Au-Fliegner M, Coppola CP, Gosche JR: Hypoxic pulmonary vasoconstriction is impaired in rats with nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1998; 33(9): 1358-62.
 38. Au-Fliegner M, Salami S, Gosche JR: Pulmonary arterioles from rats with congenital diaphragmatic hernias are hypoplastic but not hyperresponsive. *J Pediatr Surg* 1998; 33(9): 1366-70.
 39. Shehata SM, Mooi WJ, Okazaki T, El-Banna I, Sharma HS, Tibboel D: Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in lungs of newborn infants with congenital diaphragmatic hernia and pulmonary hypertension. *Thorax* 1999; 54(5): 427-31.
 40. North AJ, Moya FR, Mysore MR, et al: Pulmonary endothelial nitric oxide synthase gene expression is decreased in a rat model of congenital diaphragmatic hernia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 13(6): 676-82.
 41. Nakaki T, Nakayama M, Yamamoto S, Kato R: Endothelin-mediated stimulation of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158(3): 880-3.
 42. Thebaud B, de Lagausie P, Forgues D, Aigrain Y, Mercier JC, Dinh-Xuan AT: ET(A)-receptor blockade and ET(B)-receptor stimulation in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278(5): L923-32.

43. Guarino N, Shima H, Puri P: Cardiac gene expression and synthesis of atrial natriuretic peptide in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia in rats: effect of prenatal dexamethazone treatment. *J Pediatr Surg* 2001; 36(10): 1497-501.
44. Lipshutz GS, Albanese CT, Feldstein VA, et al: Prospective analysis of lung-to-head ratio predicts survival for patients with prenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1997; 32(11): 1634-6.
45. Harrison MR, Adzick NS, Longaker MT, et al: Successful repair in utero of a fetal diaphragmatic hernia after removal of herniated viscera from the left thorax. *N Engl J Med* 1990; 322(22): 1582-4.
46. Harrison MR, Adzick NS, Flake AW, et al: Correction of congenital diaphragmatic hernia *in utero*: VI. Hard-earned lessons. *J Pediatr Surg* 1993; 28(10): 1411-7; discussion 1417-8.
47. Potter EL, GP B: Intrauterine respiration in relation to development of the fetal lung. *Am J Obstet Gynecol* 1941; 42: 14-22.
48. DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Peters CA, Fackler JC, Wilson JM: Experimental fetal tracheal ligation reverses the structural and physiological effects of pulmonary hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1994; 29(2): 248-56; discussion 256-7.
49. DiFiore JW, Fauza DO, Slavin R, Wilson JM: Experimental fetal tracheal ligation and congenital diaphragmatic hernia: a pulmonary vascular morphometric analysis. *J Pediatr Surg* 1995; 30(7): 917-23; discussion 923-4.
50. Quinn TM, Sylvester KG, Kitano Y, et al: TGF-beta2 is increased after fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 1999; 34(5): 701-4; discussion 704-5.
51. McCabe AJ, Carlino U, Holm BA, Glick PL: Upregulation of keratinocyte growth factor in the tracheal ligation lamb model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2001; 36(1): 128-32.
52. Chapin CJ, Yoshizawa J, Kitterman JA: Tracheal Occlusion (TO) Stimulates Cell Cycle Progression in Lungs of Fetal Rats. *Pediatric Research* 2001; 49(4): 31A.
53. Hedrick MH, Estes JM, Sullivan KM, et al: Plug the lung until it grows (PLUG): a new method to treat congenital diaphragmatic hernia *in utero*. *J Pediatr Surg* 1994; 29(5): 612-7.
54. Bealer JF, Skarsgard ED, Hedrick MH, et al: The 'PLUG' odyssey: adventures in experimental fetal tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 1995; 30(2): 361-4; discussion 364-5.
55. Harrison MR, Mychaliska GB, Albanese CT, et al: Correction of congenital diaphragmatic hernia in utero IX: fetuses with poor prognosis (liver herniation and low lung-to-head ratio) can be saved by fetoscopic temporary tracheal occlusion. *J Pediatr Surg* 1998; 33(7): 1017-22; discussion 1022-3.
56. Harrison MR, Albanese CT, Hawgood SB, et al: Fetoscopic temporary tracheal occlusion by means of detachable balloon for congenital diaphragmatic hernia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185(3): 730-3.