

Traqueo-oclusão intra-útero: técnica cirúrgica associada à corticoterapia promove aumento nos receptores de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) em pulmões de fetos de ratas*

In utero tracheal occlusion: surgical approach associated to steroid treatment increase VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) receptors in lungs of fetal rats

Alexandre Iscaife¹, Anderson Gonçalves¹, Mariana Ribeiro Marcondes Silveira¹, Hernandes Faustino de Carvalho⁴, Luís A. V. Pereira⁵, Lourenço Sbragia Neto⁶

Iscaife A, Gonçalves A, Silveira MRM, Carvalho HF, Pereira LAV, Sbragia Neto L. Traqueo-oclusão intra-útero: técnica cirúrgica associada à corticoterapia promove aumento nos receptores de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) em pulmões de fetos de ratas. Rev Med (São Paulo). 2007 jan.-mar.;86(1):20-7.

RESUMO: Introdução: A hérnia diafragmática congênita (HDC) causa hipoplasia e hipertensão pulmonar e em geral leva a alta morbidade e mortalidade neonatal. Traqueo-oclusão fetal (TO) e corticoterapia pré-natal são alternativas para acelerar o crescimento pulmonar fetal e diminuir a hipoplasia na HDC. A produção de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) está relacionada com a maturidade pulmonar e sofre alterações na HDC ainda não elucidadas. **Materiais e métodos:** Seis grupos de 12 fetos de ratos Sprague-Dawley foram comparados: TO, Sham, Controle, TO+Dex, Sham+Dex e Controle+Dex. No dia 18,5^o foi realizada TO com e sem corticoterapia utilizando dexametasona. No 21,5^o dia gestacional os pesos corporal e pulmonar foram mensurados. Realizou-se imunohistoquímica para VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1), seguida de morfometria. **Resultados:** O VEGFR-1 estava aumentado no TO ($p < 0.05$) e na TO+Dex ($p < 0.05$). O VEGFR-2 teve aumento significativo quando comparamos TO e TO+Dex com o controle ($p < 0,05$). **Conclusão:** A TO associada ao uso de corticoesteróide aumentou o número de VEGFR-1 e VEGFR-2 em pulmões de fetos de ratas.

DESCRITORES: Hérnia diafragmática/terapia. Hérnia diafragmática/congênito. Hérnia diafragmática/cirurgia. Hérnia diafragmática/complicações. Hipertensão pulmonar/prevenção e controle. Hipertensão pulmonar/mortalidade. Mortalidade neonatal. Modelos animais. Imunohistoquímica. Corticosteróides/uso terapêutico.

* Prêmio Oswaldo Cruz na área cirúrgica em 2006.

¹ Alunos do 6^o ano de medicina FCM/UNICAMP.

² Prof. Titular de Biologia Celular

³ Prof. Doutor de Embriologia e Histologia

⁴ Prof. Livre Docente de Cirurgia Pediátrica

Endereço para correspondência: iscaifeboni@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A HDC é um defeito anatômico que ocorre aproximadamente em 1:2500 nascidos vivos e está associada a alta mortalidade no período neonatal decorrente da hipoplasia e da hipertensão pulmonar¹. A traqueo-occlusão (TO) e a corticoterapia (CT) *in utero* são alternativas para acelerar o crescimento pulmonar fetal e reduzir os efeitos adversos da hipoplasia pulmonar².

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e seus receptores VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1) participam da angiogênese, proliferando novos vasos e oferecendo base para a ramificação brônquica^{3,4}. Alterações dos vasos pulmonares e dos níveis séricos de VEGF foram descritas na HDC e contribuem para o desenvolvimento da hipoplasia e hipertensão pulmonares⁵. Além disso, o desenvolvimento dos pneumócitos II, células precursoras pulmonares produtoras de surfactante e responsável pela maturidade pulmonar também está prejudicado na doença.

A TO pode atuar reduzindo alterações na produção de VEGF ou de seus receptores, na medida em que reverte mecanicamente o desarranjo da arquitetura pulmonar⁶ bem como, pode aumentar a diferenciação dos pneumócitos II em tipo I e melhorar a hipoplasia pulmonar, especialmente quando associado ao aumento da produção de surfactante estimulada pelo corticóide^{7,8}.

A participação do VEGF no desenvolvimento pulmonar e na produção de surfactante tem sido correlacionada, o VEGF parece induzir a conversão de glicogênio em surfactante nos pneumócitos II⁶, no entanto, poucos estudos abordam os receptores de VEGF.

O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos da traqueo-occlusão intra-útero no desenvolvimento pulmonar por meio da quantificação dos receptores de VEGF.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente experimento foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-UNICAMP) e foi aprovado como projeto de pesquisa, sob protocolo número 291-1. Fêmeas de ratos *Spreague-Dawley*, com peso entre 200 e 300g, foram submetidas ao acasalamento com machos da mesma espécie durante uma noite. Na manhã seguinte ao coito, a genitália da fêmea foi examinada quanto à presença de mancha vaginal de esperma (*vaginal*

smear). A presença da mancha vaginal de esperma confirmou o acasalamento e foi considerado dia zero da gestação (termo com 22 dias). Um total de 36 ratas grávidas foram estudadas e cada rata teve de 1 a 3 fetos submetidos a traqueo-occlusão (Figura 1).

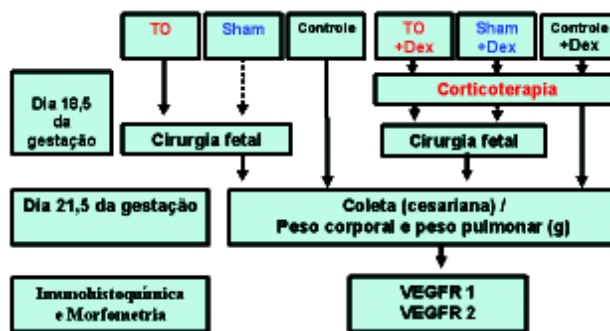


Figura 1. Fluxograma dos grupos experimentais.

Técnica e grupos experimentais

Foram formados seis grupos de 12 fetos de ratas *Spreague-Dawley* (gestação de 22 dias): TO, Sham (S), Controle (C), TO+ Dex, Sham+ Dex e Controle+ Dex.

No dia 18,5 da gestação, após aclimação de 24 horas no laboratório, ratas *Spreague-Dawley* grávidas foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de Ketamina base - 50mg/ml (175mg/Kg) (Ketamina® - Pfizer do Brasil Ltda.) associada com xylazina 10mg/ml (2.5 mg/kg) (Rompum®- Bayer do Brasil Ltda.) via intramuscular aplicada na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha 20G. Esta composição anestésica mantém o animal sob anestesia profunda durante um período de três horas e garante um período pós-operatório indolor de 6 a 12 horas. A temperatura das ratas foi mantida em 34° C com a utilização de mesa térmica. O abdome das ratas foi submetido à raspagem dos pêlos com tosquideira elétrica com cuidado para não lesar os mamilos. Após antissepsia com solução aquosa de clorexidina e colocação de campos estéreis, a rata foi submetida à laparotomia mediana em dois planos (pele e aponeurose/peritônio). A cirurgia foi realizada sob microscopia com magnificação de 2,5X.

Antes dos procedimentos fetais, uma a cada duas ratas, recebeu uma injeção intraperitoneal de Dexametosona 0,4 mg/kg diluída em 2ml de água para injeção (Grupos TO+Dex, C+Dex e S+Dex), as outras recebiam 2ml de água para injeção apenas (TO, C e Sham).

Em todas as ratas, após a incisão peritoneal, um corno uterino foi delicadamente exposto e os procedimentos fetais foram realizados. Concluídos os procedimentos nesse corno, ele foi restituído à cavidade abdominal e o outro corno foi exposto. A traqueo oclusão foi realizada como descrita por Kitano et al.⁹. Uma sutura em bolsa com fio de Prolene® 6-0 foi realizada na parede uterina, em seguida procedeu-se uma incisão de 5mm, quanto mais longe possível da inserção da placenta, seccionando-se a parede uterina e as membranas coriônica e amniótica subjacentes em direção a cabeça do feto. Para imobilização fetal a sutura em bolsa permitia que apenas a cabeça do feto fosse exposta mantendo o restante

do corpo dentro do útero. Sob aumento 2.5X o pescoço era dissecado e então visualizava-se a traqueia. Sob a traquéia foi passado um fio 7.0 prolene e então feito um nó para ocluir a traqueia (Figura 2). O feto era então delicadamente colocado de volta ao útero e o líquido amniótico reposto com 0,5ml de solução salina (NaCl 0,9%). O grupo controle não era mobilizado. Fetos do grupo *Sham* foram somente submetidos a uma incisão cervical na pele usando a mesma técnica descrita para expor a cabeça fetal. Finalmente, a laparotomia materna foi suturada com fio Mononylon 4-0. No segmento pós-operatório imediato foi oferecido oxigênio suplementar às ratas a uma taxa de 2 litros/minuto para recuperação anestésica.

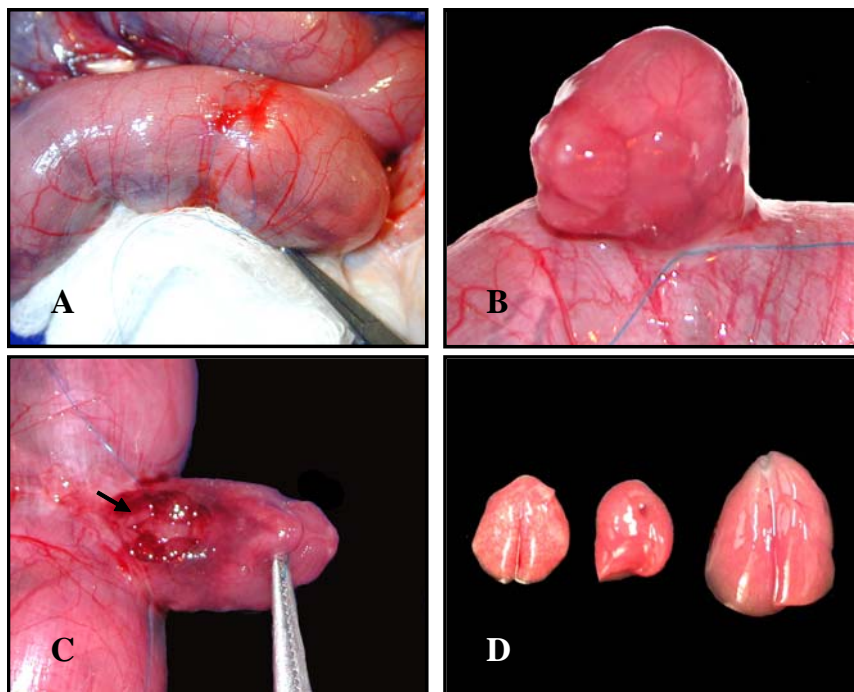


Figura 2. Realização da TO. A: Sutura em bolsa no corno uterino antes da abertura. B: Exposição da cabeça fetal através da sutura em bolsa previamente realizada (seta). C: Ligação da traquéia com prolene® 7.0 (seta) após dissecação cervical sob microscopia. D: Pulmões controle, sham e TO. Após extração, os mesmos foram colocados lado a lado para comparação macroscópica, onde se observa grande aumento de volume no TO (à direita).

No dia 21,5 da gestação, os fetos foram coletados por cesariana, sacrificados, pesados e dissecados para análise macroscópica. A TO foi considerada efetiva nos fetos que apresentaram distensão pulmonar confirmada pelo encobrimento do coração pelos pulmões, rebaixamento diafragmático e impressões das costelas na superfície pulmonar. Após dissecação, os pulmões fetais foram gentilmente extraídos, pesados e fixados em formol 10%.

Após inclusão em parafina, foram realizados cortes histológicos de 5 µm dos pulmões fetais e submetidos à coloração de H&E para análise

microscópica e reação de imunohistoquímica (IHQ) com anticorpo primário anti-VEGFR-1 e anti-VEGFR-2 (sc-316 e sc-6251, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA-USA) para quantificação dos receptores de VEGF e com anti-SP-A (sc-7700, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA-USA).

A contagem de células imunomarcadas foi realizada com auxílio do software Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics Inc, Silver Spring, MD-USA), em 50 campos com objetiva de 100x aleatoriamente escaneados de cada grupo. Como os pulmões não foram distendidos artificialmente antes da fixação, estes

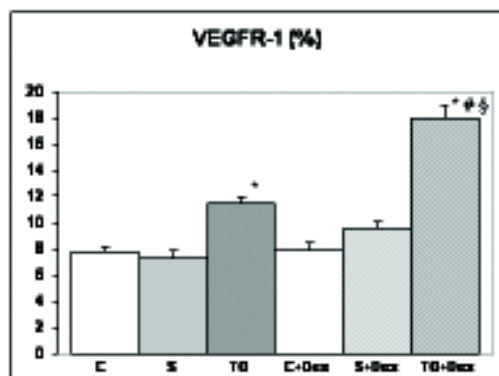
apresentavam diferentes densidades quanto à celularidade. Para minimizar o efeito da densidade pulmonar, além da contagem absoluta de células imunomarcadas no campo microscópico analisado, foi também quantificado o número total de células por campo. Assim foi possível considerar a contagem relativa de células imunomarcadas, através da fórmula: Contagem relativa de células imunomarcadas = Número total de células imunomarcadas no campo microscópico / Número total de células presentes no campo microscópico.

A análise estatística dos pesos e das contagens celulares foi realizada pelo método de comparações não-paramétrico teste de Kruskal-Wallis, utilizando-se o Sistema de Análises Estatísticas para Windows (SAS 8.01, SAS Institute Corporation 1999-2000, Cary, NC, USA) considerando diferença significativa para valores de $P = 0.05$.

RESULTADOS

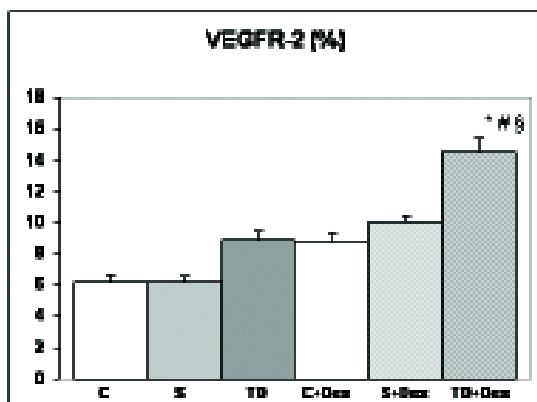
Duas de 36 ratas grávidas morreram devido a complicações anestésicas no início do estudo. Um total de 34 ratas grávidas foram estudadas, totalizando 46 tríades sem corticoide (C, S e TO) e 44 com dexametasona (C + Dex, S + Dex e TO + Dex). A mortalidade fetal nos grupos S, S + Dex, TO e TO + Dex foi respectivamente 11, 13, 73 and 73 %. Os valores médios e desvios-padrões referentes aos pesos pulmonar e corporal, bem como a relação pulmonar/corporal e demonstração macroscópica estão expressos na Tabela 1 e Figura 2. Os valores médios e desvios-padrão referentes às contagens celulares, medidas microscópicas e suas relações estão expressos na Tabela 2. As diferenças teciduais e das imunomarcações estão documentadas nos gráficos 1 e 2 e figura 3.

Gráfico 1. Porcentagem de células com reação imunohistoquímica positiva para VEGFR-1.



* $p < 0,05$ comparando com o subgrupo C,
 # $p < 0,05$ comparando com o subgrupo C + Dex,
 § $p < 0,05$ comparando com o subgrupo TO

Gráfico 2. Porcentagem de células com reação imunohistoquímica positiva para VEGFR-2.



* $p < 0,05$ comparando com o subgrupo C
 # $p < 0,05$ comparando com o subgrupo C + Dex
 § $p < 0,05$ comparando com o subgrupo TO

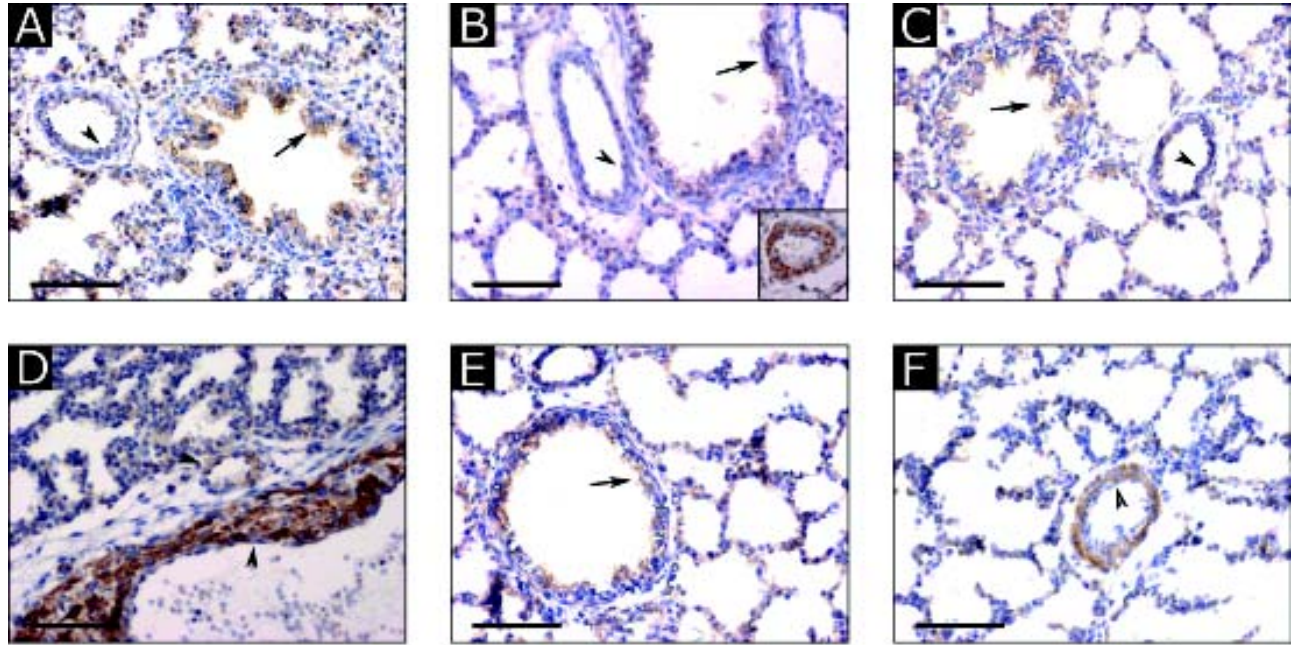


Figura 3. Análise microscópica. **A, B e C – Imunohistoquímica para VEGFR-1(Fit-1), aumento original 200x.** **A – Control:** marcações no epitélio brônquico e fracas marcações no vaso; **B – TO:** imunomarcações em toda a espessura do vaso e epitélio brônquico, detalhe de vaso totalmente marcado, principalmente subendotélio; **C – TO+Dex:** imunomarcações em parede de vaso, epitélio brônquico e alveolar. *Flechas: imunomarcações em epitélio brônquico; cabeça de flechas: imunomarcações em vasos.* **D, E e F – Imunohistoquímica para VEGFR-2 (Fik-1) aumento original 200x.** **D – Control:** imunomarcação em vaso pulmonar e vasa vasorum; **E – TO:** imunomarcação em epitélio brônquico e vaso; **F – TO+Dex:** intensas imunomarcações em vaso. *Flechas: imunomarcações em epitélio brônquico; cabeça de flechas: imunomarcações em vasos.*

Scale bar = 200 µm

Tabela 1. Variações nos pesos corpóreo e pulmonar nas diferentes situações experimentais (média e desvio-padrão).

Pesos	C	Sham	TO	C + Dex	Sham + Dex	TO + Dex
Corporal (g)	5,53 (± 0,39)	4,85 (± 0,66) *	5,35 (± 0,83)	5,42 (± 0,57)	5,31 ± 0,46 §	5,59 (± 0,72)
Pulmonar (g)	0,13 (± 0,01)	0,11 (± 0,03) *	0,39 (± 0,10) *	0,14 (± 0,03)	0,13 ± 0,02 §	0,42 (± 0,11) *
Pulmonar/Corporal (x10 ⁻²)	2,44 (± 0,20)	2,26 (± 0,42)	7,26 (± 1,45) *	2,56 (± 0,31)	2,47 ± 0,33	7,43 (± 1,54) *

* p < 0,05 comparando com o subgrupo Controle

§ p < 0,05 comparando com o subgrupo correspondente sem Dex

Tabela 2. Morfometrias, porcentagem de células positivas para VEGFR-1 e VEGFR-2 nos diferentes grupos experimentais e controle (media e desvio-padrão).

Medidas	C	Sham	TO	C + Dex	Sham + Dex	TO + Dex
Total de células (x10 ³ cels/mm ²)	3,11 (± 0,12)	3,52 (± 0,93)	1,37 (± 0,70) *#	3,18 (± 0,32)	3,49 (± 0,42)	1,42 (± 0,88) *#
VEGFR-1 – imunomarcações (%)	7,79 (± 0,38)	7,31 (± 0,55)	11,43 (± 0,50) *	7,92 (± 0,52)	9,65 (± 0,48)	18,03 (± 0,97) *#§
VEGFR-2 – imunomarcações (%)	6,22 (± 0,44)	6,27 (± 0,33)	8,92 (± 0,52) *	8,74 (± 0,59)	10,07 (± 0,43)	14,56 (± 0,94) *#§

* p<0,05 comparando com o subgrupo Controle

p<0,05 comparando com o subgrupo Controle + Dex

§ p<0,05 comparando com o subgrupo correspondente sem Dex

DISCUSSÃO

Atualmente, a intervenção cirúrgica fetal para HDC possui indicações clínicas restritas e configura área de fronteira médico-científica e um desafio para

aqueles que nela atuam^{10,11}. Resultados promissores de intervenção fetal para HDC com a colocação transitória de um balão intra-traqueal percutâneo,

ocorrem quando associadas às medidas pulmonares e a posição hepática¹².

O efeito maturador da TO parece residir, sobretudo, na ação mecânica que exerce no parênquima pulmonar, consoante ao demonstrado que a aceleração do crescimento celular está diretamente relacionada ao aumento da pressão intratraqueal^{13,14,15}. Esse estímulo físico, além de recuperar o espaço pulmonar perdido pela herniação na HDC e restabelecer a arquitetura pulmonar, estimula processos moleculares, culminando com maior transcrição gênica, maior produção protéica e conseqüentemente desenvolvimento e diferenciação celular confluindo para acelerar a maturação pulmonar^{7,16}.

O VEGF pode ser localizado nos pulmões, rins e ossos, sendo secretado por células endoteliais e outras como espermatozoides e pneumócitos, sendo considerado um mediador parácrino e autócrino. Sua ação ocorre preponderantemente em vasos, porém atua em outros tecidos como alvéolos, testículo, epidídimo e endométrio, portanto, é considerado um mitógeno não restrito às células endoteliais¹⁷.

As alterações no VEGF e seus receptores causam um distúrbio da angiogênese levando a uma remodelação prejudicial das pequenas artérias. Isto posto, demonstrou-se que o VEGF glicoproteína está aumentado na HDC e na hipertensão pulmonar, entretanto outros estudos demonstraram diminuição do VEGF na HDC induzida pelo nitrofen^{18,19}.

Os glicocorticóides alteram a expressão do VEGF e do receptor Flk-1 no período pós-natal em pulmões de fetos normais sendo que in vivo a Dex estimula a produção de ambos e in vitro há supressão dos mesmos com Dex. Nessa fase de maturação, a proliferação endotelial é baixa sugerindo outras funções do VEGF e seus receptores na cascata do desenvolvimento pulmonar²⁰.

O mecanismo pelo qual a corticoterapia age sobre a produção do VEGF e de seus receptores não está completamente elucidado. Não obstante há aumento do VEGF diante da hipóxia. Embora a diminuição de oxigênio estimule fatores de transcrição controladores da expressão de VEGF, a hipóxia leva ao estresse que estimula liberação de cortisol endógeno. Portanto pode haver uma estimulação do VEGF pela hipóxia diretamente ou mediada por corticóide⁶.

O fator de transcrição do VEGF, HIF-2 α , é estimulado pela hipóxia e quando suprimido causa síndrome da angústia respiratória em ratos devido à deficiência na produção de surfactante pelos pneumócitos II. Anticorpos anti-VEGFR-2 (FLK-1) também causam síndrome da angústia respiratória e

a aplicação intra-traqueal de VEGF no pós-natal estimula a produção de surfactante pelos pneumócitos II indicando a presença de receptores para VEGF nestas células. Esta relação foi confirmada no presente estudo, onde as alterações do VEGFR-2 e dos pneumócitos II ocorriam concomitantemente. O VEGF induz rapidamente a conversão do glicogênio do pneumócito II em surfactante e essa ação parece ser mediada principalmente pelo Flk-1 que também sofre ação do glicocorticóide^{6,20}.

O VEGFR-2(Flk-1) é expresso nas fases iniciais do desenvolvimento pulmonar, enquanto o VEGFR-1(Flt-1) aumenta nas fases tardias desse desenvolvimento. Isto posto, pressupõe-se que o VEGFR-2(Flk-1) atuaria na ativação da angiogênese, enquanto o VEGFR-1(Flt-1) na maturação e na integridade da parede dos vasos. Devido a sua alta afinidade pelo VEGF, o VEGFR-1(Flt-1) tem sido implicado no seqüestro de VEGF para impedir sua ligação com o VEGFR-2(Flk-1) agindo assim na resolução da fase de angiogênese^{21,22}.

No presente estudo observou-se em pulmões normais um aumento significativo do VEGFR-1(Flt-1) no grupo TO e principalmente no grupo TO + Dex, onde foi maior de 50%. Houve também aumento menos significativo do VEGFR-2 (Flk-1) no grupo TO e TO + Dex. Seguindo esse princípio, a TO com 18,5 dias de gestação em fetos de rato onde o pulmão se encontra na fase canalicular parece acelerar a maturação vascular pulmonar, pois há grande elevação do VEGFR-1(Flt-1) (fase tardia da angiogênese) e menor elevação do VEGFR-2 (Flk-1) (fase inicial da angiogênese)²³.

O VEGFR-2 teve aumento significativo com a TO, porém com a TO + Dex o aumento foi maior, sugerindo maior expressão desse receptor no tecido pulmonar, que pode ter favorecido a manutenção dos pneumócitos II.

Ocorre uma distinção entre as funções do VEGF glicoproteína e VEGFR. Na hipertensão pulmonar o VEGF glicoproteína está aumentado, porém esse aumento parece ser devido à hipóxia a que o tecido pulmonar está submetido (devido a hipertensão pulmonar e menor fluxo) e não que a hipertensão seja devida ao aumento do VEGF, pode-se dizer que o aumento do VEGF é conseqüência da hipertensão pulmonar e não a causa. Na situação de hipertensão pulmonar parece haver um desarranjo na angiogênese e o aumento do VEGF seria uma tentativa de compensar esse defeito e produzir mais vasos para chegar mais sangue, mas esse mecanismo acaba por piorar a situação porque os vasos passam a ser formados desorganizadamente.

O bloqueio da produção do VEGF causa um

distúrbio no desenvolvimento pulmonar normal induzindo apoptose, indicando que o VEGF pode relacionar-se com desenvolvimento epitelial e vascular. Isso explicaria a presença dos receptores em outros tecidos além do epitélio vascular, como epitélio brônquico, alveolar e mesênquima^{17,23}.

Pulmões submetidos a TO são distendidos com diminuição da celularidade quando comparados com os pulmões normais dos controles. A utilização da técnica de distensão pulmonar com infusão traqueal de líquidos após o nascimento é utilizada para minimizar essas diferenças teciduais. No presente estudo, optou-se pela contagem de imunomarcações relativa ao total de células e à superfície celular, considerando que mesmo após distensão com líquidos os pulmões TO diferem dos normais, por apresentarem distensibilidade diferente^{24,25}.

Não há um consenso se o VEGF está aumentado ou diminuído na HDC. Oue et al relata que

houve aumento de VEGF no modelo de CDH induzido pelo nitrofen, mas esse aumento não pode ser excluído da própria ação tóxica do nitrofen, por outro lado, no mesmo modelo, Chang et al relatam diminuição do VEGF^{18,19}.

Os nossos achados mostram que a associação da TO com a corticoterapia induz maior produção dos receptores de VEGF, contribuindo para maturação vascular e maior distensibilidade pulmonar, com melhora funcional ao pulmão^{6,16,26}.

Em conclusão, os receptores de VEGF e os pneumócitos II são determinantes da maturação pulmonar e suas alterações contribuem para fisiopatologia da HDC com graves implicações clínicas. Em pulmões normais de fetos de ratos, a TO e a corticoterapia estimularam a expressão dos receptores de VEGF podendo ter implicações fundamentais no desenvolvimento pulmonar e na fisiopatologia da HDC.

Iscaife A, Gonçalves A, Silveira MRM, Carvalho HF, Pereira LAV, Sbragia Neto L. In utero tracheal occlusion: surgical approach associated to steroid treatment increase VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) receptors in lungs of fetal rats. *Rev Med (São Paulo)*. 2007 jan.-mar.;86(1):20-7.

ABSTRACT: Background/Purpose: Congenital diaphragmatic hernia (CDH) presents with hypoplastic lungs and usually leads to pulmonary hypertension and high neonatal mortality. Fetal tracheal occlusion (TO) and prenatal corticotherapy are alternatives to accelerate fetal pulmonary growth and decrease hypoplasia in CDH. VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) production and surfactant production by type II pneumocytes are related with pulmonary maturity and are altered in CDH, but little has been described about VEGF receptors. Our objective was to quantify the receptors of VEGF (VEGFR) and type II pneumocytes, verifying the effects of TO and corticotherapy on normal lungs of fetal rats.

Methods: Six groups of 12 Sprague-Dawley rat fetuses (gestation=22 days) were compared: TO, S (*sham*), C (*control*), TO+Dex, S+Dex and C+Dex. On the 18.5 gestational day, TO was performed with and without corticotherapy, using dexamethasone. On the 21.5 gestational day body and lung weights were measured. Immunohistochemistry was carried out for VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1), as well as anti-SP-A, microscopic analysis and quantification of immune system marking.

Results: Body weight decreased in Sham and lung weight increased in TO and TO+Dex ($p<0.05$) groups. VEGFR-1 and VEGFR-2 increased in TO and in TO+Dex ($p<0.05$). Type II pneumocytes (SP-A) decreased both in the TO and in TO+Dex groups in comparison with the Control group in absolute value ($p<0.05$), with no differences in relative value to total cell count.

Conclusion: TO in association with the use of corticosteroids increased VEGFR-1 and VEGFR-2, while the quantity of type II pneumocytes (SP-A) decreased in relation to the area considered, but not in relation to the total of pulmonary cells.

KEY WORDS: Hernia diaphragmatic/therapy. Hernia diaphragmatic/congenital. Hernia diaphragmatic/surgery. Hernia diaphragmatic/complications. Hypertension pulmonary/prevention and control. Hypertension pulmonary/mortality. Neonatal mortality (public health). Models, animal. Adrenal cortex hormones/use therapeutic. Immunohistochemistry.

REFERÊNCIAS

1. Golombek SG. The history of congenital diaphragmatic hernia from 1850s to the present. *J Perinatol.* 2002; 22(3):242-6.
2. Lally KP. Congenital diaphragmatic hernia. *Curr Opin Pediatr.* 2002;14(4):486-90.
3. Van Tuyl M, Liu J, Wang J, Kuliszewski M, Tibboel D, Post M. Role of oxygen and vascular development in epithelial branching morphogenesis of the developing mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 288(1):L167-78.
4. Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol.* 2001;2(11):667-73.
5. Okazaki T, Sharma HS, Aikawa M, Yamataka A, Nagai R, Miyano T, et al. Pulmonary expression of vascular endothelial growth factor and myosin isoforms in rats with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 1997;32(3):391-4.
6. Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, Hoet P, Tjwa M, Beck H, et al. Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med.* 2002;8(7):702-10.
7. Rodrigues CJ, Tannuri U, Tannuri ACA, Macksoud-Filho J, Rodrigues Junior AJ. Prenatal tracheal ligation or intra-amniotic administration of surfactant or dexamethasone prevents some structural changes in the pulmonary arteries of surgically created diaphragmatic hernia in rabbits. *Rev Hosp Clin.* 2002;57(1).
8. Schnitzer JJ, Hedrick HL, Pacheco BA, Losty PD, Ryan DP, Doody DP, et al. Prenatal glucocorticoid therapy reverses pulmonary immaturity in congenital diaphragmatic hernia in fetal sheep. *Ann Surg.* 1996;224(4):430-7; discussion 437-9.
9. Kitano Y, Yang EY, von Allmen D, Quinn TM, Adzick NS, Flake AW. Tracheal occlusion in the fetal rat: a new experimental model for the study of accelerated lung growth. *J Pediatr Surg.* 1998;33(12):1741-4.
10. Stege G, Fenton A, Jaffray B. Nihilism in the 1990s: the true mortality of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatrics.* 2003;112(3 Pt 1):532-5.
11. Harrison MR, Keller RL, Hawgood SB, Kitterman JA, Sandberg MD, Farmer DL, et al. A randomized of fetal endoscopic tracheal occlusion for severe fetal congenital diaphragmatic hernia. *N Engl J Med.* 2003;349(20):1916-24.
12. Jani J, Gratacos E, Greenough A, Piero JL, Benachi A, Harrison M. Percutaneous fetal endoscopic tracheal occlusion (FETO) for severe left-sided congenital diaphragmatic hernia. *Clin Obstet Gynecol.* 2005; 48(4):910-22.
13. Kitano Y, Kanai M, Davies P, von Allmen D, Yang EY, Radu A, et al. BAPS prize-1999: lung growth induced by prenatal tracheal occlusion and its modifying factors: a study in the rat model of congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2001;36(2):251-9.
14. Kitano Y, Von Allmen D, Kanai M, Quinn TM, Davies P, Kitano Y, et al. Fetal lung growth after short-term tracheal occlusion is linearly related to intratracheal pressure. *J Appl Physiol* 2001;90(2):493-500.
15. Deprest J, Gratacos E, Nicolaides KH; the FETO Task Group. Fetoscopic Tracheal Occlusion (FETO) for Severe Congenital Diaphragmatic Hernia: evolution of a technique and preliminary results. *Obstet Gynecol Surv.* 2005;60(2):85-86.
16. Yoshizawa J, Chapin CJ, Sbragia L, Ertsey R, Gutierrez JA, Albanese CT, et al. Tracheal occlusion stimulates cell cycle progression and type I cell differentiation in lungs of fetal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 285(2):L344-53.
17. Mata-Greenwood E, Mayerick B, Soifer SJ, Fineman JR, Black SM. Expression of VEGF and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285: L222-L231.
18. Oue T, Shima H, Taira Y, 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.
19. Chang R, Andreoli S, Ng YS, Truong T, Smith SR, Wilson J, et al. VEGF expression is downregulated in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2004;39(6):825-8.
20. Bhatt AJ, Amin SB, Chess PR, Watkins RH, Maniscalco WM. Expression of vascular endothelial growth factor and Flk-1 in developing and glucocorticoid-treated mouse lung. *Pediatr Res.* 2000;47(5):606-13.
21. Robinson CJ and Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci.* 2001;114:853-65.
22. Kearney JB, Ambler CA, Monaco KA, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL. Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. *Blood.* 2002;99: 2397-407.
23. Zhao L, Wang K, Ferrara N, Vu TH. Vascular endothelial growth factor co-ordinates proper development of lung epithelium and vasculature. *Mech Dev.* 2005;122(7-8):877-86.
24. Wu J, Ge X, Verbeken EK, Gratacos E, Yesildagar N, Deprest JA. Pulmonary effects of in útero tracheal occlusion are dependent on gestational age in a rabbit model of diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* 2002;37(1):11-7.
25. Asabe K, Tsuji K, Handa N, Najiwara M, Suita S. Immunohistochemical distribution of surfactant apoprotein-A in congenital diaphragmatic hernia-II. *Asian J Surg.* 2003;26(4):205-9.
26. Keijzer R, van Tuyl M, Tibboel D. Hormonal modulation of fetal pulmonary development: relevance for the fetus with diaphragmatic hernia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;92(1):127-33.