



**Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O PERICÁRDIO BOVINO E O GORE-TEX NA INTERAÇÃO TECIDUAL COM O DIAFRAGMA DE RATOS WISTAR.

AUTORES: Artur Fracassi Guerra ¹ e Mauro Razuk Filho ¹

ORIENTADOR: Prof. Dr. Willy Marcus França ²

1. Alunos do curso de graduação da FCMS, PUC/SP; 2. Professor da Faculdade Ciências Médicas e da Saúde, PUC/SP e Coordenador do Laboratório Técnica Cirúrgica & Cirurgia Experimental.

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde, PUC/SP, *campus Sorocaba/SP.*

Setembro de 2013

Artur Fracassi Guerra e Mauro Razuk Filho

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O PERICÁRDIO BOVINO
E O GORE-TEX NA INTERAÇÃO TECIDUAL COM O
DIAFRAGMA DE RATOS WISTAR.**

Relatório final de Iniciação Científica apresentado à Faculdade Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, sob a orientação do Prof. Dr. Willy Marcus França.

Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde, PUC/SP, *campus* Sorocaba/SP.

Setembro de 2013

NOTA PRÉVIA

Relatório científico de Pesquisa de Iniciação Científica aprovada pelo Conselho de Ensino e Pesquisa da PUC-SP, subsidiado pelo PIBIC-CEPE e desenvolvido no período de agosto de 2012 a julho de 2013.

ÍNDICE

RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	06
INTRODUÇÃO	07
OBJETIVOS.....	10
JUSTIFICATIVA.....	10
CRONOGRAMA.....	10
MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	14
DISCUSSÃO.....	17
CONCLUSÃO.....	18
INTERESSES.....	19
AGRADECIMENTOS.....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

RESUMO

A agenesia total do hemidiafragma (AD) é observada em 1-35% de todos os casos de hérnia diafragmática congênita (HDC), que é observada em 1:5.000-7.000 nascidos vivos. As anomalias associadas descritas são: cardiovasculares, genitourinárias e esqueléticas. O diagnóstico pré-natal é feito pela ultrassonografia entre a 18^o-22^o semanas de gestação. Os tratamentos clínicos pós-natais descritos na literatura, como o uso do Surfactant[®], Óxido nítrico, HFOV (*high frequency oscillatory ventilator*), ECMO (oxigenação de membrana extracorpórea) e Perfluorocarbono, têm o objetivo de melhorar os parâmetros funcionais pulmonares do recém-nascido e dar condições de enfrentar o tratamento cirúrgico e pós-operatório. A correção preferencia é o fechamento primário do defeito diafragmático. Quando este não é possível, como na AD, retalhos de materiais sintéticos ou biológicos (Silistic[®], Politetrafluoroetileno - PTFE, Gore-Tex[®], Teflon[®] ou retalhos musculares) são utilizados, apesar das complicações descritas. O uso do pericárdio bovino (PB) na correção desses defeitos se mostrou eficaz na separação definitiva do tórax e abdome com algumas vantagens que outros materiais não oferecem. Nosso objetivo com o presente estudo é analisar as características físicas de fixação do PB e as interações teciduais (histológicas) desse material biológico em contato com o diafragma de ratos Wistar e compará-las com a utilização da tela de Gore-Tex[®].

Palavras chave: hérnia diafragmática, pericárdio bovino, GoreTex.

ABSTRACT

The total hemidiaphragm agenesis (AD) is observed in 1-35% of all cases of congenital diaphragmatic hernia (CDH), which is observed in 1:5.000-7.000 live births. The associated anomalies described are: cardiovascular, genitourinary and skeletal. The prenatal diagnosis is made by ultrasound between 18^o-22^o weeks gestation. The postnatal clinical treatments described in the literature, such as the use of Surfactant ®, Nitric Oxide, HFOV (high-frequency oscillatory ventilator), ECMO (extracorporeal membrane oxygenation) and Perfluorocarbon, aim to improve pulmonary function parameters of the newborn and conditions to face surgery and post-operation. The correct choice is the primary closure of the diaphragmatic defect. When this is not possible, as in AD synthetic or biological materials (Silistic ®, polytetrafluoroethylene - PTFE Gore-Tex ®, Teflon ® or muscle flaps) are used, despite of the complications described. The use of bovine pericardium (BP) to correct these defects is effective in the final separation of the chest and abdomen with some advantages that other materials do not offer. Our goal with this study is to analyze the physical attachment of the BP and the interactions tissue (histology) of this biological material in contact with the diaphragm of rats and compare them with the use of patch of Gore-Tex ®.

Key words: diaphragm hernia, bovine pericardium, Gore-Tex

INTRODUÇÃO

Desde que Neville *et al.* (1954) publicou a correção de grandes defeitos diafragmáticos com uso de lobo hepático suturado na fáscia endotorácica outras tentativas foram propostas para a correção destes defeitos, por meio da utilização de materiais sintéticos, como o Silistic[®], Politetrafluoretilene (PTFE), Gore-Tex[®] e Teflon[®] ^{1,2,3}. Porém, nem sempre a utilização desses materiais levou aos resultados esperados devido às frequentes re-herniações, não crescimento do material sintético e necessidade de outra cirurgia definitiva futura ^{2,3}.

Estudos continuados concluíram que a utilização de materiais sintéticos não comprovaram ser de grande eficácia como uma solução a longo prazo para crianças com grandes defeitos congênitos no diafragma, uma vez que metade delas demonstrou evidências de herniações recidivantes e necessidade de reavaliação do material em um período de três anos ⁴.

Tecido autólogo, como os músculos, incluindo os da parede abdominal e o músculo grande dorsal foram usados com bons resultados, entretanto vários recém-nascidos com HDC precisam de suporte do ECMO, o que envolve o uso de anticoagulantes sistêmicos. O que diante da necessidade de extensa dissecação tornaria o procedimento de alto risco para essas crianças ³. Bedini *et al.* (1997) e Samarakkody *et al.* (2001), em duas publicações diferentes, descreveram alguns poucos casos em que o músculo grande dorsal foi usado, no entanto, não foi mencionado se a ECMO foi utilizada nessas crianças ^{5,6,7,8}. Recentemente, Scaife *et al.* (2003) apresentou 158 casos de defeitos diafragmáticos que foram operados em um período de 10 anos, e argumentou que nenhuma das crianças necessitou do suporte da ECMO, o que talvez facilitou a utilização de retalho autólogo ^{9,10}.

Materiais biológicos como a duramater liofilizada foram descritos como forma de corrigir defeitos diafragmáticos, mas com quase 20% de recorrência da hérnia, sendo concluído que esse material não é ideal para o fechamento desses defeitos ¹¹.

Outros materiais biológicos foram testados em estudos experimentais, a fim de investigar sua eficiência na correção de grandes defeitos diafragmáticos como: submucosa do intestino delgado, derme acelular, ambos em ratos Sprague-Dowley ¹², e também na fáscia lata de cães ¹³.

Gallo *et al.* (1982) publicaram um estudo experimental usando pericárdio bovino (PB) preservado em glutaraldeído (GABP – *glutaraldehyde-preserved bovine pericardium*) para corrigir os defeitos diafragmáticos de 15 cães. Segundo estes autores, não houve formação de aderências entre o PB e as estruturas adjacentes em nenhum cão, salvo uma exceção, em que o omento aderiu ao PB ^{14,15}.

Outro estudo experimental em coelhos concluiu que o GAPB é reabsorvido e substituído por um tecido fibroso resistente do hospedeiro, além de ser considerado um material biológico mais apropriado para o reparo de hérnia, demonstrando melhor incorporação tecidual, menor grau de aderências e ausências de rugas decorrente do transplante do material, quando comparado com Marlex[®] ¹⁶.

Outra vantagem do PB é sua longevidade. Basseto *et al.* (2011) e Kim *et al.* (2012), publicaram estudos com pacientes tratados com esse material há mais de 24 anos e 10 anos, respectivamente ^{17,18}. Um relato de caso publicado em 2007 mostra um paciente tratado com o PB para correção de hérnia diafragmática congênita (HDC) gigante já está com 12 anos de idade (figura 1) ¹⁹.

O pericárdio bovino, tratado com glutaraldeído a 4%, já é amplamente usado em cirurgias cardiovasculares devido a sua ampla elasticidade, alta resistência à tração, fácil colocação e de não necessitar de imunossupressores.

Entre as malhas sintéticas que são mais frequentemente utilizadas para o reparo de defeitos em humanos é a malha de Gore-Tex[®]. Ela é responsável por um maior acúmulo de neutrófilos ²⁰. Apesar de fácil manuseio, flexibilidade, fácil obtenção, boa aderência, serve de suporte para o crescimento de tecido fibroso e não desencadeia sinais de infecção ²¹, mas em organismos em crescimento pode não crescer com as crianças e conseqüentemente, levar à deformidades principalmente torácicas, com problemas respiratórios ^{22,23,24}.

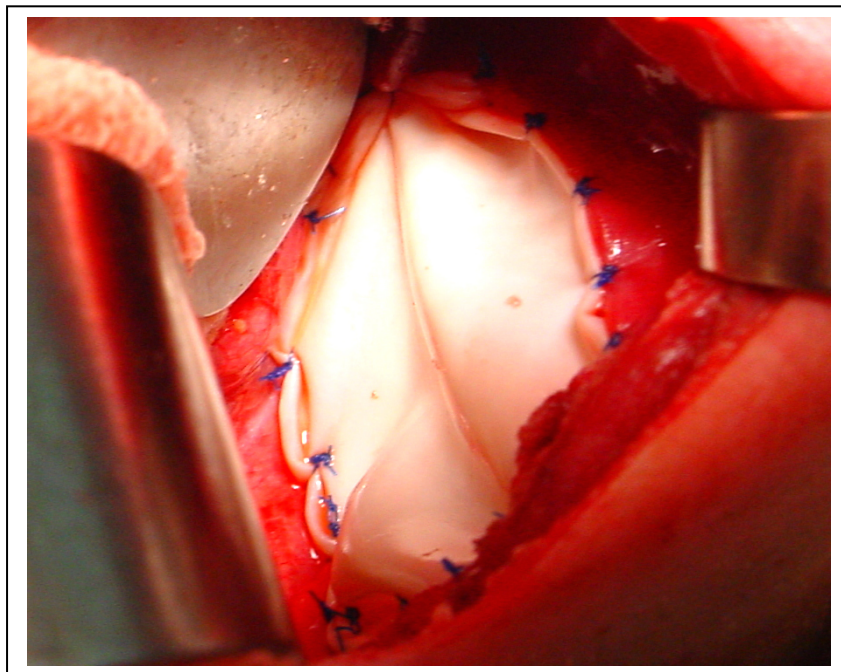


Figura 1. Fotografia de ato operatório mostra o PB suturado ao redor de pequena dobra de diafragma de recém-nascido com grande defeito diafragmático (*imagem cedida pelo orientador em trabalho publicado em 2007*). Este modelo de fixação será utilizado em nosso estudo.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é analisar as características de interação tecidual (histológicas) do PB em contato com o diafragma de ratos Wistar e compará-las com as do Gore-Tex®.

JUSTIFICATIVA

O presente experimento propõe um modelo experimental de interação tecidual entre o PB e o diafragma de ratos Wistar que será comparado com o Gore-Tex em dois grupos diferentes. Serão analisadas as características físicas destes materiais e seu comportamento na zona de transição do tecido animal, ou seja, biológico versus o sintético, descrevendo as características da interação tecidual desses materiais com o diafragma de rato.

A análise da interação tecidual de cada material trará grande contribuição na prática cirúrgica diária, sugerindo novas possibilidades de correção dos grandes defeitos diafragmáticos com o material biológico animal.

CRONOGRAMA

Mês						
Atividades	04/2012	04/2012	05/2012 a 07/2012	08/2012 a 11/2012	12/2012 a 04/2013	06/2013 a 09/2013
Pesquisa na literatura e redação do projeto para entrega à Comissão de Ética em Pesquisa Animal.	X	X				

Atividades no laboratório (cirurgias e acompanhamento do pós-operatório), realizadas duas vezes por semana, durando 2 horas cada de acordo com o proposto no Projeto.		x	x			
Reavaliação da literatura durante a elaboração e redação do texto do trabalho.	x	x	x	x	x	
Primeiro Relatório Parcial de Desenvolvimento			x	x		
Início do Estudo em histologia (microscopia)			x	x		
Finalização da parte prática em laboratório e Microscopia e início da tabulação e análise dos resultados.				x	x	
Análise estatística dos dados e conclusões finais.					x	
Entrega do Relatório Final e confecção do Artigo para publicação em revista de referência internacional !						x

MATERIAIS E MÉTODOS

Após aclimação de 24 horas no Biotério, ratos *Wistar* de 30 dias à dois meses de vida, com peso médio de 200g cada, foram submetidos à anestesia geral com Ketamina base - 50mg/ml (Ketalar[®] - Cristália do Brasil), associada à Xilazina 10mg/ml (Coopazine[®] - Coopers Brasil Ltda), no volume de 0,4 ml por animal via intramuscular aplicado na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha 20G. Esta composição anestésica (175 mg/kg de Ketamina e 2,5 mg/kg de Xilazina), mantém o animal sob anestesia profunda durante um período de até três horas e com pós-operatório indolor durante 6 a 12 horas.

Em seguida foi realizado a antissepsia abdominal com álcool 70% e colocação de campos estéreis. Depois de anestesiados, os ratos foram submetidos à laparotomia subcostal esquerda (figura 2). A alças intestinais foram exteriorizadas para visualização do diafragma esquerdo.

Foram suturadas pequenas placas, de aproximadamente 1cm, de PB a 4% e de Gore-Tex[®], de acordo com o grupo, diretamente no diafragma dos animais, sem lesá-los, a fim de evitar o pneumotórax, Foram realizadas suturas com de fio de Prolene 6-0, pontos simples e separados em três ou quatro pontos ao redor da placa para fixá-la no diafragma (figuras 3 e 4).

Os animais foram divididos em três grupos:

- **Grupo 1 (PB):** constituído por 5 animais que foram submetidos à sutura de placa de PB a 4%, com fio de Prolene 6-0, pontos simples e separados;
- **Grupo 2 (GT):** constituído por 5 animais que foram submetidos à sutura de placa de Gore-Tex[®], com fio de Prolene 6-0, pontos simples e separados;
- **Grupo 3 (R):** ou grupo **Controle**, será constituído por 5 animais no qual o diafragma foi lesado por meio de raspagem com pinça anatômica em toda a extensão semelhante à da ocupada pelos placa de PB e Gore-Tex[®] nos ratos dos grupos 1 e 2.

Três semanas após as cirurgias, os animais foram sacrificados e os diagramas, com suas respectivas placas, foram retirados e conservados em formol 10% para a realização da análise histológica.

O material colhido de cada grupo foi seccionado na espessura de 1,0 à 1,5 mm, colocado em cassetes e identificados, sendo mantido em formol 10% por mais 24 horas. Em seguida, à temperatura ambiente, foi realizada, o processo de desidratação em álcool 70° e álcool absoluto, e a diafanização (transparentização) em xilol. O material foi incluído em parafina na estufa (à uma temperaturas entre 60°C e 65°C) para a confecção dos blocos. Esses blocos foram levados ao micrótomo para a realização de cortes de 5µm de espessura em banho histológico. O material foi colocado em lâminas limpas e retornou à estufa, para remoção da parafina restante e reforçar a fixação (figura 5).

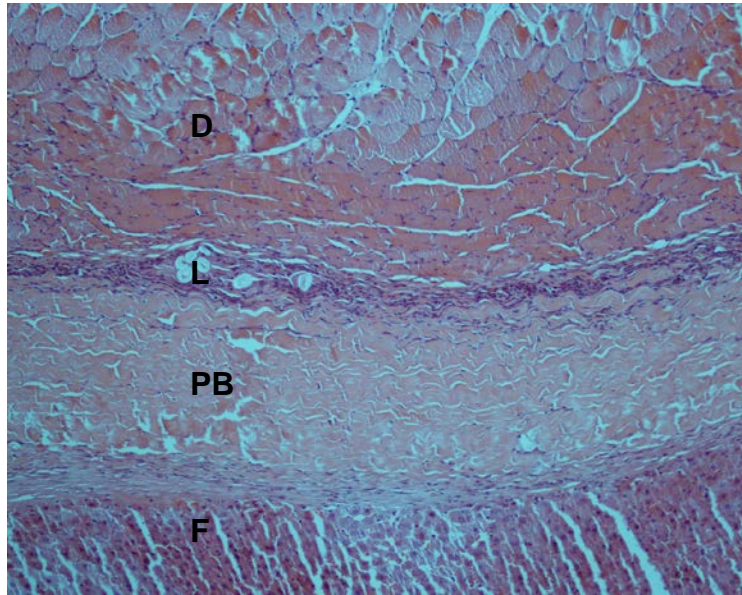


Figura 6: Placa de pericárdio bovino (PB) entre o diafragma (D) e o fígado (F) de rato *Wistar*. Há presença de infiltrado linfocitário (L) entre o diafragma e o pericárdio bovino. Aumento de 100X.

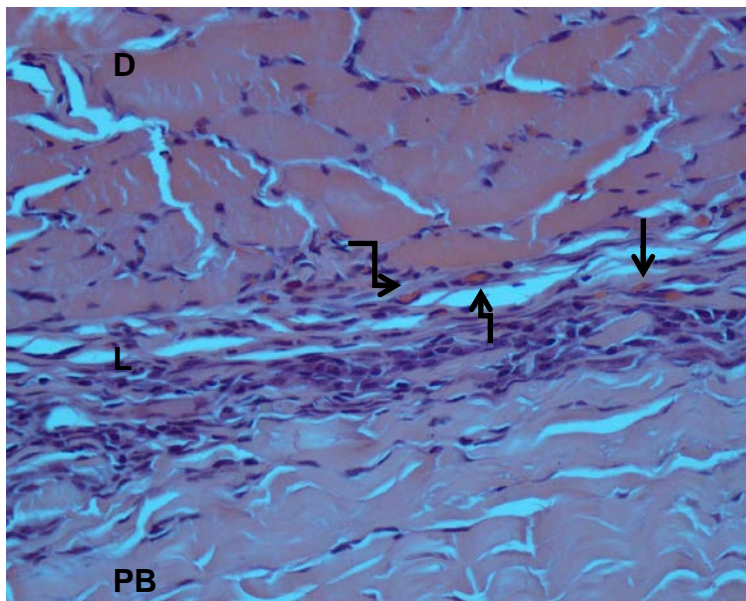


Figura 7: Infiltrado linfocitário (L) entre o diafragma (D) e a placa de pericárdio bovino (PB). É possível visualizar vasos de menor calibre (setas). Aumento de 400X.

Nos cortes em que foi usada a placa de Gore-Tex[®] (figuras 8 e 9), foi possível visualizar a formação de tecido fibrótico sobre esta. Há presença de capsulas fibróticas (bem delimitadas), e formação de vasos.

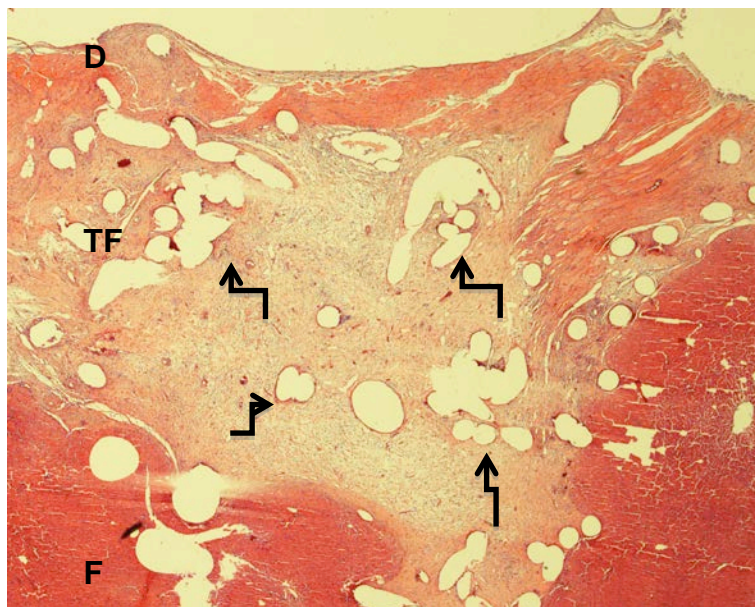


Figura 8: Tecido fibrótico (TF) sobrepondo a placa de Gore-Tex[®], entre o diafragma (D) e o fígado (F), com presença de capsulas fibróticas (setas). Aumento de 20X.

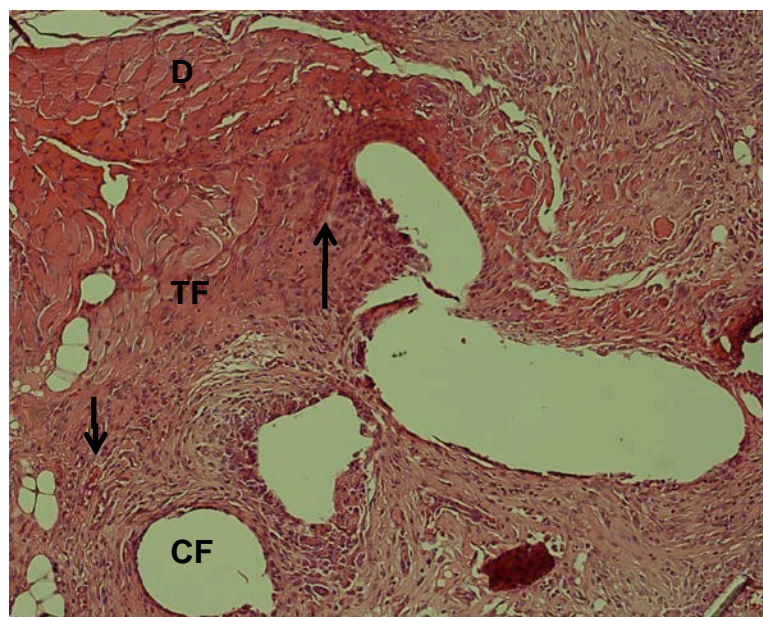


Figura 9: Transição entre o diafragma (D) e o tecido fibrótico (TF) sobreposto a placa de Gore-Tex[®]. Há presença de capsula fibróticas (CF) bem delimitada e vasos sanguíneos de pequeno calibre (setas). Infiltrado linfocitário está ausente. Aumento de 100X.

No estudo histológico dos ratos do grupo 3, é possível visualizar o diafragma íntegro, assim como demonstrado na figura 10.

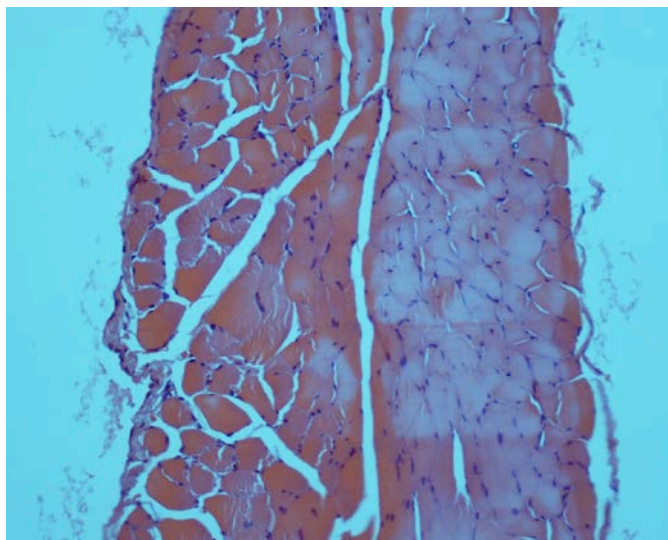


Figure 10: Diafragma de rato íntegro após a raspagem com pinça anatômica. Aumento de 200X

DISCUSSÃO

Desde que Neville *et al.* (1954) publicaram a correção de grandes defeitos diafragmáticos com a sutura do respectivo lobo hepático na fáscia endotorácica, varias outras técnicas foram publicadas ^{1,25}.

Dentre as diferentes técnicas de reconstrução desses defeitos, malhas sintéticas são as mais conhecidas e utilizadas mundialmente ²⁵. A razão para isso decorre do fato de que os materiais sintéticos são relativamente fáceis de serem suturados no local correto, apresentam boa resistência e podem ser modelados na forma de domo, o que, aparentemente, garante uma melhor função diafragmática do que uma malha chata garantiria⁹. Apesar de todas essas vantagens, muitas complicações são descritas na literatura, como: o deslocamento do material, ressurgimento da hérnia e deformações tóraco-abdominais ^{3,4}.

Vários autores descreveram as vantagens ou uso de partes autólogas de músculos na correção de grandes HDC ^{7,8}. Músculos, como o latíssimo do dorso distal, foram usados com bons resultados, contudo, muitos recém-nascidos com HDC necessitam de suporte da ECMO, o que envolve o uso de anticoagulantes sistêmicos e necessitam de extensiva dissecação, o que seria arriscado para essas crianças ³. Scaife et al. (2003) apresentou 158 casos de defeitos diafragmáticos que foram operados com partes de músculos, e argumentou que nenhuma das crianças necessitou do suporte da ECMO ^{9,10}.

O PB parece concentrar todas as características dos músculos (autólogos, incorporado como tecido vivo, reabsorvível e é substituído por um tecido fibroso resistente do hospedeiro) ¹⁶, e dos materiais sintéticos (resistência, fácil colocação e fácil manipulação no formato de domo ²⁵. Além disso, o GABP é um material biológico, que pode crescer com a criança, sem deformidades ou mutilações com as rotações de retalhos musculares e ainda, sem que haja necessidade de cirurgias posteriores.

CONCLUSÃO

O pericárdio bovino apresenta maior aderência ao diafragma e ausência de tecido fibrótico, enquanto a placa de Gore-Tex[®] mostrou-se menos aderente ao diafragma e respondeu com produção de tecido fibrótico ao procedimento. Entretanto, é perceptível a aderência de ambas as placas ao fígado.

Dessa forma, ainda cabem maiores estudos acerca das vantagens e desvantagens do uso desses materiais para a correção de grandes defeitos diafragmáticos congênitos. É necessário o acompanhamento dos materiais e das estruturas correlacionadas *in vivo* afim de determinar seus comportamentos em um organismo em crescimento, tal o qual ocorre com a criança.

INTERESSES

Declaro que não há conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Em agradecimento ao PIBIC-CEPE, pela bolsa de iniciação científica concedida ao aluno Artur Fracassi Guerra como forma de estímulo à pesquisa, ao Prof. Dr. Willy Marcus França, pelo precioso ensinamento, à Luciana Canabarro, pela ajuda imensurável nas práticas em laboratório, à Elizabeth de Almeida, pela montagem das lâminas histológicas, à Prof^a. Dr^a. Suzana Guimarães Moraes, pela análise histológica dos materiais, e à toda equipe do laboratório de Biomateriais da FCMS/PUC-SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neville WE, Clowes GH Jr. Congenital absence of hemidiaphragm and use of lobe of liver in its surgical correction. **Arch Surg** 1954; 69: 282-90.
2. Stolar CJH, Dillon PW. Congenital Diaphragmatic Hernia and Eventration, in O'Neill JA Jr, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, CORAN AG. **Pediatric Surgery**. ed. 5, Missouri, USA, Mosby-Year Book, pp 819-37, 1998.
3. Sripathi V, Beasley SW. Familial occurrence of complete agenesis of the diaphragm. **J Paediatr Child Health**, 28(2): 190-1, 1992.
4. Tsang TM, Tam PK, Dudley NE, Stevens J. Diaphragmatic agenesis as a distinct clinical entity. **J Pediatr Surg**, Jan; 30(1): 16-8, 1995.

5. Bedini AV, Valente M, Andreani S, et al: Reverse flap of distal latissimus dorsi for diaphragm reconstruction in the adult: specification of the technical procedure and report on six cases. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 114(5): 846-8, 1997.
6. Samarakkody U, Klaassen M, Nye B: Reconstruction of congenital agenesis of hemidiaphragm by combined reverse latissimus dorsi and serratus anterior muscle flaps. **J Pediatr Surg**, 36(11): 1637-40, 2001.
7. Bollmann R, Kalache K, Mau H, et al.: Associated Malformations and Chromosomal Defects in Congenital Diaphragmatic Hernia. **Fetal Diagn Ther**, 10:52-9, 1995.
8. Howe DT, Kilby MD, Sirry H, et al: Structural chromosome anomalies in congenital diaphragmatic hernia. **Perinatal Diagnosis**, 16: 1003-9, 1996
9. Scaife ER, Johnson DG, Meyers RL, Johnson SM, Matlak ME. The split abdominal muscle-A simple, Mesh-free approach to repair large diaphragmatic hernia. **J Pediatr Surg** 2003; 38(12):1748-1751.
10. Muraskas JR, Husain NA, Myers TF, Anderson CL, Back PR. An association of pulmonary hypoplasia with unilateral agenesis of the diaphragm. **J Pediatr Surg**, 28(8): 999-1002, 1993.
11. Faivre L, Morichon-Delvallez N, Viot G, et. al: Prenatal diagnosis of an 8p23.1 deletion in a fetus with a diaphragmatic hernia and review of the literature. **Prenat Diagn**, 18(10): 1055-60, 1998.
12. Gibbs DL, Rice HE, Farrell JA, et al.: Familial Diaphragmatic Agenesis: an autosomal-recessive syndrome with a poor prognosis. **J Pediatr Surg**, 32(2): 366-8, 1997.
13. Sadler TW. Cavidades do Corpo. In: **Langman**. Embriologia Médica. 7^o ed. Maryland, USA: G. Koogan, pp 108-14, 1995.
14. Gallo JI, Artinano E, Val F, Duran CG. Glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the repair of diaphragmatic defects: experimental study. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1982; 83(6): 905-8.

15. Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, Nakayama DK, Manning FA, de Lorimier AA. Diaphragmatic hernia in the fetus: prenatal diagnosis and outcome in 94 cases. **J Pediatr Surg**, 20(4): 357-61, 1985.
16. Bedini AV, Valente M, Andreani S, et al: Reverse flap of distal latissimus dorsi for diaphragm reconstruction in the adult: specification of the technical procedure and report on six cases. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 114(5): 846-8, 1997.
17. Bassetto S, Menardi AC, Alves Junior L, Rodrigues AJ, Évora PRB. Reflexões sobre a durabilidade de 24 anos de uma bioprótese IMC/Braile de pericárdio bovino em posição tricúspide isolada. **Rev Bras Cir Cardiovasc** 26(4): 653-657, ILUS. 2011 Dec.
18. Kim JH, Cho YP, Kwon TW, Kim H, Kim GE. Ten-year comparative analysis of bovine pericardium and autogenous vein for patch angioplasty in patients undergoing carotid endarterectomy. **Ann Vasc Surg**. 2012 Apr;26(3):353-8. Epub 2012 Feb 8.
19. Daniel F.C. Pinheiro. et al. Bovine pericardium as a lasting option to correct agenesis of the left hemidiaphragm: a five year follow-up. **Brasília Med**, 44(2): 142-145, 2007.
20. Quitzan JG, Rahal SC, Rocha NS, Crocci AJ. Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. **Acta Cir. Bras.** 18(4): 297-301, ILUS, TAB. 2003 Aug.
21. Pezzutti S; Holzchuh N; Alves MR; Holzchuh MP; Holzchuh R. Politetrafluoroetileno e esclera humana no tratamento cirúrgico de perfuração escleral em coelhos. **Arq. Bras. Oftalmol.** 64(6): 563-567, GRA, TAB. 2001 Nov.
22. Lally KP, Cheu HW, Vazquez WD. Prosthetic diaphragm reconstruction in the growing animal. **J Pediatr Surg** 1993; 28(1): 45-7.
23. Iocono JA, Cilley RE, Mauger DT, et al: Postnatal pulmonary hypertension after repair of congenital diaphragmatic hernia: predicting risk and outcome. **J Pediatr Surg**, 34(2): 349-53, 1999.

24. Peetsold MG, Heij HA, Nagelkerke AF, Ijsselstijn H, Tibboel D, Quanjer PH, Gemke RJ. Pulmonary function and exercise capacity in survivors of congenital diaphragmatic hernia. **Eur Respir J**. 2009 Nov;34(5):1140-7. Epub 2009 Mar 12.
25. Harrison, MR, Adzick NS, Estes JM, Howell LJ. A prospective study of the outcome for fetuses with diaphragmatic hernia. **JAMA** , 271(5): 382-4, 1994.