

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CRISTINA T. OKAMOTO

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE
SUBPOPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS E
MOLÉCULAS DE ADESÃO INFLAMATÓRIA NA
DISPLASIA BRONCOPULMONAR**

**CURITIBA
2011**

O41a
2011

Okamoto, Cristina T.
Análise imunoistoquímica de subpopulações de leucócitos e moléculas de adesão inflamatória na displasia broncopulmonar / Cristina T. Okamoto ; orientadora, Lúcia de Noronha. – 2011.
62 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2011.
Inclui bibliografias.

1. Doenças respiratórias nas crianças. 2. Recém-nascidos. 3. Displasia broncopulmonar. 4. Leucócitos. 5. Imunoistoquímica . I. Noronha, Lúcia de. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 618.92241

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

CRISTINA T. OKAMOTO

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE
SUBPOPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS E
MOLÉCULAS DE ADESÃO INFLAMATÓRIA NA
DISPLASIA BRONCOPULMONAR**

**Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade
Católica do Paraná, como requisito para obtenção
do título de Doutor.**

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia de Noronha

Coordenador: Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho

**CURITIBA
2011**

DEDICATÓRIA

À minha filha Heloisa, pela sua compreensão nas minhas ausências, seu carinho e incentivo, e também por ser a razão para me tornar uma pessoa melhor.

Agradecimento especial

À Profª *Dra Lucia Noronha*, pela sua sábia e paciente orientação, pelo seu comprometimento e entusiasmo com a pesquisa e sua amizade.

“O verdadeiro mestre não é aquele que dá toda a sua sabedoria, mas sim leva seus discípulos ao limiar de suas próprias mentes”.

Kalil Gibran Kalil

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Roberto Pecoits Filho**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUC-PR, pelo seu incentivo e empenho para com os discentes e com a Instituição.

As pesquisadoras, colaboradoras e amigas **Ana Paula Camargo Martins e Marina Viola Luine Azevedo** pelo seu alegre e incansável apoio durante toda a pesquisa.

À Profa. **Marcia Olandoski**, por seu inestimável auxílio durante a análise estatística dos resultados da pesquisa.

À minha família, pela compreensão, pelo apoio constante, possibilitando minha busca e crescimento profissional, com uma base sólida: seu amor incondicional.

Aos meus amigos, que de várias e muitas formas me apoiaram, incentivaram e auxiliaram, permitindo chegar ao fim desta e de muitas outras caminhadas.

**Não sei... Se a vida é curta
ou longa demais para nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.**

Cora Coralina

EPIGRAFE

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 09 |
| NOTA EXPLICATIVA | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. OBJETIVO..... | 19 |
| 3. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA NO DIAGNÓSTICO DA “NOVA” DISPLASIA BRONCOPULMONAR E COMPARAÇÃO CLÍNICOPATOLÓGICA COM A FORMA “CLÁSSICA” DA DOENÇA | 20 |
| 4. THE ROLE OF INFLAMMATORY RESPONSE IN BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA: A IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 16 CASES | 29 |
| 5. THE ROLE OF INFLAMMATORY ADHESION MOLECULES AND NK CELLS IN BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA: A IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 16 CASES | 44 |
| 6. CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS | 59 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO DA TESE..... | 61 |

RESUMO

INTRODUÇÃO: Displasia Broncopulmonar (DBP) é uma das complicações do período neonatal mais estudada atualmente. Inicialmente foi relacionada com a prematuridade, suplementação de oxigênio elevada e ventilação mecânica agressiva, levando a alterações anatomopatológicas como presença de membranas hialinas e edema, na fase mais aguda, colagenização e posteriormente fibrose, esta denominada DBP “clássica”. Com os avanços tecnológicos, melhor entendimento da fisiologia do recém nascido prematuro, corticóide antenatal e surfactante exógeno, cada vez mais sobrevivem os recém-nascidos prematuros de muito baixo peso (<1500g), porém sem diminuição da incidência da DBP. A DBP, no entanto, se tornou mais branda, caracterizada pela redução do número de alvéolos e parada do crescimento alveolar, sendo denominada “nova” DBP. **OBJETIVO:** Demonstrar as alterações histopatológicas e morfométricas em pulmões de neomortos prematuros, com quadro anatomopatológico e clínico compatível, respectivamente, com “nova” DBP, comparando-as com um grupo sem DBP e com a forma “clássica” da doença, além de correlacionar os três grupos com o tempo de uso de oxigênio entre outros fatores de risco da DBP. Caracterização imunofenotípica do infiltrado inflamatório e identificação imunoistoquímica de moléculas de adesão e de células NK (*natural killer*) presente nos pulmões de prematuros abaixo de 34 semanas que desenvolveram DBP “clássica” ou “nova”, comparando-a com aqueles prematuros sem DBP. **MÉTODOS:** A população foi composta de 53 amostras de pulmões de prematuros com idade gestacional menor de 34 semanas e submetidos à oxigenioterapia. Amostras pulmonares foram separadas em 2 grupos anatomopatológicos: 1 - com DBP “clássica”, e 2 - sem DBP “clássica”. O grupo sem DBP “clássica” foi então submetido à análise morfométrica para contagem do número de alvéolos e para medidas das áreas e dos perímetros dos alvéolos. Após esta análise, a população estudada ficou dividida em três grupos anatomopatológicos: 1 – com DBP “clássica”, 2A – Com “nova” DBP e 2B - sem DBP. Todas as amostras pulmonares foram submetidas a contagem de neutrófilos, reações imunoistoquímicas para anticorpos CD4, CD8, CD14, CD20, CD25, CD45RO, CD54, CD57, CD74 e CD106. **RESULTADOS:** A análise morfométrica demonstrou que o grupo com “nova” DBP apresentou número de alvéolos, sua área e perímetro diminuídos ($p < 0.005$) quando comparados ao grupo sem DBP. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos com relação aos fatores de risco para desenvolvimento de DBP. Foi verificado que o fluxo de neutrófilos foi muito maior no grupo da DBP “clássica” quando comparada ao grupo da “nova” DBP e ao grupo sem DBP ($p < 0.001$). A contagem de células CD45RO+ foi maior no grupo da DBP “clássica” do que no grupo sem DBP e do que no grupo da “nova” DBP ($p = 0.0004$). As contagens de células CD4+ foram estatisticamente maiores no grupo da DBP “clássica” quando comparada com o grupo controle ($p = 0,016$). “Nova” DBP apresenta mais linfócitos TCD25+ e CD57+ do que a DBP “clássica” e do que o grupo sem DBP ($p = 0,040$ e $0,026$ respectivamente). Com relação às células CD74+, o grupo da DBP “clássica” apresenta maior número destas células quando comparado ao outros dois grupos ($p = 0,050$). Ocorreu uma maior expressão do ICAM-1 no grupo da “nova” DBP ($p < 0,020$) quando comparada aos outros 2 grupos. **CONCLUSÃO:** As formas de DBP “clássica” e “nova” são de etiologia multifatorial, porém distintas entre si. Para diagnóstico anatomopatológico da “nova” DBP pode ser necessária a análise morfométrica. As alterações histopatológicas e morfométricas deste estudo antecederam a necessidade de oxigenioterapia por mais de 28 dias, conceito utilizado para o diagnóstico clínico desta doença. Nossos achados parecem corroborar a hipótese de processo inflamatório inicial mediado por neutrófilos e sustentado pelos linfócitos TCD4+, TCD45RO+ e células CD74+, na forma “clássica” da DBP. Em nossos estudos também parecem estabelecer uma conexão entre o processo inflamatório e a apoptose, mediado pelas células NK (CD57+), TCD25+ e CD14+ que aparece na forma “nova” da DBP. Observamos ainda uma maior expressão do ICAM1 no grupo da “nova” DBP, o qual poderia ser encarado como um marcador precoce de DBP.

NOTA EXPLICATIVA

Este trabalho será apresentado sob a forma de dois artigos enviados para publicação e um artigo publicado, seguindo as normas editoriais dos respectivos periódicos.

1. O primeiro é um artigo original, publicado no **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, intitulado **“ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA NO DIAGNÓSTICO DA “NOVA” DISPLASIA BRONCOPULMONAR E COMPARAÇÃO CLÍNICOPATOLÓGICA COM A FORMA “CLÁSSICA” DA DOENÇA”** J Bras Patol Med Lab • v. 45 • n. 2 • p. 147-152 • abril 2009.

2. O segundo é um artigo enviado para publicação para *Pediatrics*, intitulado **“THE ROLE OF INFLAMMATORY RESPONSE IN BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA: A IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 16 CASES”**.

3. O terceiro é um artigo enviado para publicação para *Pediatric Research*, intitulado **“THE ROLE OF INFLAMMATORY ADHESION MOLECULES AND NK CELLS IN BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA: A IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 16 CASES”**.

- A introdução é sucinta, e está inserida nos artigos originais, bem como os objetivos.
- O conceito de Displasia Broncopulmonar e a dificuldade da sua definição estão inseridos nos três artigos, sendo o primeiro deles onde esta discussão se aprofunda.
- O mecanismo fisiopatogênico da DBP é o objetivo principal deste estudo, sendo discutido em seus vários aspectos nos três artigos. Desta forma, metodologia, resultados e discussão, dependendo do mecanismo estudado, estão inseridos nos três artigos.
- Finalizando, descrevemos as conclusões, considerações finais e referências, após os artigos desta dissertação. Fi

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Epidemiologia e Histórico

A displasia broncopulmonar (DBP) “clássica” é uma doença pulmonar crônica que afeta principalmente os recém nascidos prematuros e contribui para sua mortalidade e morbidade. Foi inicialmente descrita em 1967 e está relacionada à Síndrome do Distress Respiratório (SDR)(inicialmente denominada Doença da Membrana Hialina) e à ventilação mecânica, esta última com altos níveis pressóricos, altas frações inspiradas de oxigênio e volume corrente elevado (1). Sendo assim, o principal fator de risco para o desenvolvimento desta DBP parece ser mesmo a prematuridade e a suplementação de oxigênio agressiva por tempo prolongado. Com o avanço tecnológico na prevenção e tratamento das doenças da prematuridade em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, além do uso de corticóide e surfactante exógeno e de técnicas mais “gentis” de ventilação mecânica, tudo isto contribuindo para a retirada precoce da ventilação mecânica nestes prematuros, surge uma “nova” forma de DBP, mais branda, que acomete recém nascidos prematuros e/ou de muito baixo peso ao nascer(<1500g) (2, 3).

A incidência da DBP é inversamente proporcional à idade gestacional e ao peso de nascimento, afetando principalmente 19 a 36% dos prematuros de muito baixo peso, podendo chegar a 42% nos recém-nascidos prematuros de extremo baixo peso (<1000g). Assim, como o número de partos prematuros vem aumentando ao longo dos anos, a sobrevivência de recém nascidos com idades gestacionais e pesos cada vez menores também tem sofrido uma elevação. Dessa forma, atualmente, é crescente o número de recém nascidos com risco de desenvolverem esta morbidade pulmonar. Esta incidência é muito variável de centro para centro, devido a diversos fatores como: divergências no critério de definição clínica de DBP, diferenças de população estudada, falta de padronização das estratégias ventilatórias empregadas, grande variabilidade no manuseio hídrico, fechamento ou não do canal arterial e presença de infecção neonatal ou materna (4, 5).

1.2 – Definição Clínica :

Tema de muitas pesquisas e discussões é a definição clínica de DBP. Sabe-se que, genericamente, é uma doença que acomete o recém nascido prematuro e de muito baixo peso que permanece dependente de oxigênio por muitos dias. A maior dificuldade está em definir o tempo de dependência de oxigênio necessário para o desenvolvimento da DBP, bem como seu relacionamento com a idade gestacional e a idade pós-natal, parâmetros estes que ainda

permanecem controversos. Um dos critérios mais importantes e utilizados por vários centros de referência para definição clínica de DBP é a dependência de oxigênio após 28 dias de vida pós-natal. Porém, novos estudos preconizam uma definição clínica onde se faz necessária a dependência de oxigênio após 36 semanas de idade pós-conceptual (6, 7).

A definição clínica mais aceita atualmente foi caracterizada pelo último Consenso do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (*National Institute of Health*) em 2001, a qual leva em consideração vários critérios baseados principalmente na gravidade da doença, na necessidade de suplementação de oxigênio e na idade gestacional pós-conceptual, e está apresentada nos quadros 1 e 2 (8). Ehrenkranz e colaboradores, em um estudo com 4866 recém-nascidos prematuros de extremo baixo peso, avaliaram a validade desta definição proposta pelo *National Institute of Health*, e concluíram que os critérios utilizados, além de serem úteis na prática diária, permitem identificar um espectro de evoluções pulmonares adversas no início da infância (9).

Quadro 1. Critérios Diagnósticos para DBP Baseados na Gravidade da Doença

| | |
|--------------|--|
| DBP leve | – respiração em ar ambiente |
| DBP moderada | – necessidade de oxigênio <30% |
| DBP grave | – necessidade de oxigênio >30% e/ou pressão positiva |

Momento da avaliação: 36 semanas idade pós-menstrual ou alta para casa (o que ocorrer primeiro)

National Institute of Health

Quadro 2. Critérios Diagnósticos para DBP Baseados no Tempo de Oxigenioterapia

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| Pré DBP | – 0 a 7 dias de oxigenioterapia |
| DBP em evolução | – 7 a 14 dias de oxigenioterapia |
| DBP estabelecida | – mais de 14 dias de oxigenioterapia |

Momento da avaliação: 36 semanas idade pós-menstrual ou alta para casa (o que ocorrer primeiro)

National Institute of Health

Ainda neste controverso assunto que é a definição clínica da DBP, alguns autores estudaram um grupo de 232 recém-nascidos prematuros abaixo de 1250g e os classificaram conforme sua evolução pulmonar em: 1 – sem DBP; 2 – DBP típica e; 3 – DBP atípica, sendo que este último grupo correspondeu a 31% da amostra e foi dividido em dois subgrupos: 3a – aqueles que desenvolveram doença pulmonar após uma semana de vida e; 3b – aqueles que desenvolveram após 72h de vida. A maioria desenvolveu a “nova” DBP em torno de sete a nove dias de vida, coincidindo então, o conceito anatomopatológico de “nova” DBP com o conceito clínico de DBP “em evolução”, preconizado pelo *National Institute of Health*, conforme o quadro 2 (10). Esta definição clínica de DBP também foi descrita por outros autores e atribuída ao comprometimento do desenvolvimento alveolar associado à prematuridade (11).

Estas definições clínicas levam em consideração apenas o tempo de suplementação de oxigênio, utilizando critérios individuais, variando de centro para centro. Recentemente, alguns autores têm discutido sobre qual seria a saturação de oxigênio no recém-nascido prematuro, com suplementação de oxigênio, que indicaria a presença de DBP, uma vez que o tratamento e a definição desta doença não estão bem estabelecidos (12, 13, 14). Surge então o conceito de DBP “fisiológica”, que seria uma DBP própria da prematuridade e que se resolveria depois de 36 semanas de idade gestacional pós-conceptual, portanto, estes prematuros não apresentariam a lesão pulmonar da DBP propriamente dita (“clássica” ou “nova”). Para o diagnóstico da DBP “fisiológica”, os recém nascidos prematuros, em uso de suplementação de oxigênio, são submetidos a um teste de suspensão desta suplementação e observados com relação a sua saturação de oxigênio. Segundo este novo conceito, prematuros com fração inspirada de oxigênio <30% e saturação entre 90 a 96%, teriam DBP “fisiológica”, e não DBP propriamente dita. Walsh e colaboradores, em 2004, estudaram 1598 recém-nascidos prematuros de muito baixo peso, segundo os critérios convencionais de DBP e da DBP “fisiológica”. Houve uma redução em torno de 6% na incidência da DBP propriamente dita, indicando uma tendência a supervalorizar os critérios clínicos já descritos nos quadro 1 e 2. Após esta pesquisa, ficou evidente que apenas os critérios clínicos não são suficientes para o diagnóstico da DBP propriamente dita, devendo-se estabelecer também critérios fisiológicos. A discussão mais atual, então, fica em torno da incorporação da definição “fisiológica” da DBP no consenso (15,16).

Dada a dificuldade na definição clínica no diagnóstico da DBP e a lacuna no conhecimento sobre sua prevenção e tratamento, foi realizado em março de 2006 um Consenso da Academia Americana de Pediatria, para estudar e estabelecer as necessidades frente esta doença. Foram identificadas três grandes áreas a serem melhor exploradas: 1 – a definição de DBP; 2 – os estágios da DBP e 3 – identificar os subtipos de DBP (16). Neste consenso ficou estabelecido que a definição clínica de DBP seria aquela desenvolvida pelo *National Institute of Health* em 2001, acrescida da definição clínica de DBP “fisiológica” (16). A gravidade da doença, por sua vez, foi definida como leve, moderada e grave, de acordo com a necessidade de suplementação de oxigênio e/ou ventilação mecânica (vide quadro 1). Foram conceituados três estágios: 1- Pré DBP: compreende o período pré-natal e perinatal até sete dias de vida, 2- DBP em evolução: compreende o período entre 7 a 14 dias; e 3-DBP estabelecida: período de 28 dias de vida com variação de sete dias para mais ou para menos (vide quadro 2).

1.3 – Definição Anatomopatológica:

Os aspectos clínicos e radiológicos da DBP já são reconhecidos em recém-nascidos prematuros entre uma e quatro semanas de vida pós-natal (17). Os achados histológicos são encontrados muito antes disso e se sobrepõe à Síndrome do Distress Respiratório, por isso se faz necessário parear os grupos de acordo com a idade gestacional, grau de imaturidade

pulmonar, tipo e duração de ventilação, tempo de uso do oxigênio, grau de edema pulmonar, e presença ou não de outras intercorrências (18).

A definição anatomopatológica de DBP “clássica” na era pré-surfactante era bem entendida e de fácil diagnóstico. Os aspectos anatomopatológicos foram divididos em três fases distintas: 1 – fase aguda onde havia membranas hialinas e edema dos septos e ductos alveolares; 2 – fase subaguda ou reparadora com colagenização dos septos alveolares associada a processo inflamatório linfocitários e repopulação dos alvéolos com hiperplasia de pneumócitos do tipo II e; 3 – fase crônica com fibrose pulmonar intersticial, dilatação de bronquíolos terminais, bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares, focos de hiperinsuflação e atelectasia. Estas sequelas da fase crônica são, na grande maioria das vezes, irreversíveis, deixando estas crianças com deficiências respiratórias graves ao longo de suas vidas (2, 3,18).

Com o advento da terapêutica com corticóide antenatal, surfactante e com a ventilação “gentil”, (definida como aquela em que há menor exposição ao oxigênio excessivo, menores volumes tidal, tempos inspiratórios mais curtos e extubação precoce para Pressão Positiva Contínua em Vias Aéreas Nasais ou CPAP), a DBP “clássica”, como é agora chamada a DBP descrita acima, foi desaparecendo gradativamente, dando lugar a uma nova modalidade anatomopatológica de DBP, onde as sequelas inflamatórias e fibrosantes são menos intensas. Na “nova” DBP, o achado anatomopatológico mais encontrado é o bloqueio do desenvolvimento pulmonar com redução do número de alvéolos e da área de superfície alveolar, além de insuflação não uniforme dos espaços aéreos distais. Há pouca ou nenhuma fibrose septal, reação inflamatória e presença de edema intersticial. Os aspectos predominantes nesta nova modalidade de DBP são, portanto, as alterações da alveologênese, com diminuição do número e tamanho dos alvéolos destes recém-nascidos, deixando, muitas vezes, seqüelas respiratórias até a vida adulta (2,18,19). Estas alterações anatomopatológicas de defeitos na alveologênese são muito discretas, sendo que a morfologia, num exame de rotina, pode ser muito semelhante a um pulmão normal para a idade gestacional do recém nascido. Sendo assim, as alterações que caracterizam esta nova modalidade de DBP são de ordem muito mais morfométrica do que morfológica. Por este motivo, a morfometria, com medição do tamanho e contagem dos alvéolos, tem sido usada como critério diagnóstico da DBP “nova” (20-23).

O crescimento pulmonar é, em grande parte, dependente de vários fatores como o espaço intratorácico, a presença de líquido amniótico, os movimentos respiratórios fetais e o controle hormonal para produção do surfactante. Nos seres humanos existem cinco estágios bem definidos de desenvolvimento pulmonar: 1 – período *embrionário* (até nona semana), quando acontece a organogênese com a formação de estruturas primordiais do pulmão a partir do endoderme e do mesoderme do intestino primitivo; 2 – período *pseudoglandular* (8 a 16 semanas), com a formação das vias aéreas de condução; 3 – período *canalicular* (17 a 28 semanas), quando se observa a formação dos bronquíolos terminais e ácinos, sendo que é nesta fase que os pneumócitos tipo II iniciam a síntese de surfactante; 4 – período *sacular* (28

a 36 semanas), onde ocorre a formação dos sáculos alveolares transitórios e alargamento das porções distais dos bronquíolos terminais e; 5 – período *alveolar* (pós-natal), quando se observa a total diferenciação dos alvéolos e do leito vascular. No momento do nascimento a termo, os sáculos alveolares transitórios estão em processo de alveolização, sendo que estes se desenvolvem até o final do segundo ano de vida. Do ponto de vista anatomopatológico, sabe-se que a maioria dos grandes prematuros nasce com o desenvolvimento pulmonar no período canalicular e/ou sacular e a alveolização somente se dá na fase pós-natal (24, 25). Existe uma vulnerabilidade maior à lesão pulmonar deste prematuro devido à necessidade de adaptação precoce à vida extra-uterina. Acredita-se que esta nova modalidade anatomopatológica de DBP atue exatamente no período alveolar pós-natal, deixando as sequelas anatomopatológicas já descritas.

1.4 – Fisiopatogenia:

A patogênese da DBP parece ser multifatorial, ainda largamente pesquisada, sendo o seu esclarecimento de suma importância para sua prevenção e tratamento. Inicialmente foram descritos fatores como a prematuridade, baixo peso ao nascimento, ventilação mecânica, suplementação de oxigênio e principalmente SDR. Mesmo com a reposição de surfactante exógeno para minimizar os efeitos da SDR, principal fator de risco para o desenvolvimento da DBP “clássica”, a prevalência da mesma não diminuiu como era o esperado. Apenas houve um decréscimo da prevalência da DBP “clássica”, dando lugar a um aumento da “nova” DBP. Isto provavelmente se deve ao fato de que novos fatores de risco, diferentes da SDR, estariam implicados na gênese desta nova forma de DBP. Mais recentemente, a persistência do canal arterial, a desnutrição, a enterocolite necrosante e a presença de infecção tanto no recém-nato como materna, em especial a corioamnionite, foram relacionadas à gênese da DBP “nova” (2, 18, 26).

Como já foi anteriormente citada, a DBP não desapareceu, mas agora afeta recém nascidos prematuros com espaços aéreos distais não desenvolvidos, resultando em “nova” DBP com suas alterações de hipoalveolização, quadro diferente da DBP “clássica”, onde o fenômeno inflamatório predomina. Os mecanismos que regulam o desenvolvimento da rede de capilares e de alvéolos, assim como as causas da sua interrupção na “nova” DBP, merecem melhor entendimento, sendo que a compreensão deste processo poderia contribuir para o desenvolvimento de tratamentos efetivos, a fim de que a DBP tenha melhor evolução e prognóstico (27, 28).

No último consenso da Academia Americana de Pediatria, publicado em março de 2006 (16), a DBP foi definida como um processo evolutivo que pode estar associado a desenvolvimento tardio da linguagem, paralisia cerebral e distúrbios cognitivos. Além disso, determinaram a necessidade de pesquisa em três áreas na DBP: 1 – prevenção, 2 – tratamento da DBP “em evolução” e 3 – tratamento da DBP estabelecida (27).

Vários estudos experimentais tentaram desvendar as causas que levam a alteração do desenvolvimento pulmonar, tais como: 1 – mecanismos inflamatórios e oxidativos com

liberação de radicais livres; 2 – inibidores ou ativadores da proliferação celular; 3 – processos imunológicos que levam a alteração da angiogênese; ou 4 – fatores que desencadeiam a apoptose no pulmão. Muitos ensaios, pesquisas, revisões e estudos clínicos discutem qual a via de ativação da resposta imunológica e/ou apoptótica desta doença (2, 5).

1.5 – O Sistema Imunológico e a DBP

A importância do sistema imunológico para a saúde é dramaticamente ilustrada pela observação frequente de que indivíduos com respostas imunológicas defeituosas são suscetíveis a infecções graves, geralmente com altas taxas de morbi-mortalidade. As respostas imunes inatas sempre estarão presentes no indivíduo, já a resposta imune adaptativa apresenta alta especificidade e produz células de memória para reconhecimento de contatos prévios (29, 30). A ativação da resposta inflamatória é um dos principais fatores envolvidos na gênese da DBP tanto a “clássica” quanto a “nova”, sendo desencadeada por três principais condições clínicas: infecção pré-natal ou pós-natal, ventilação mecânica e a hiperóxia. Quais seriam os fatores que induziriam uma maior resposta inflamatória (como na DBP “clássica”) ou uma maior interferência na alveolização (como na “nova” DBP)? Esses aspectos são motivos para muitas discussões e pesquisas (31).

Dos Santos e colaboradores, defendem a hipótese de que a resposta imune inata do organismo, frente à ventilação mecânica, levaria a “Lesão Pulmonar Induzida por Ventilação” (VILI). Neste tipo de lesão (VILI), o estiramento das estruturas alveolares em formação pela ventilação forçada, levaria a danos como a descompartimentação (falência da barreira alveolar epitélio-endotelial por *stress*), necrose (falência da membrana plasmática por *stress*), mecanotransdução (alterações da estrutura citoesquelética sem dano ultraestrutural) e efeitos na vasculatura. Estes mecanismos levariam a um processo descrito como “Biotrauma”, que desencadearia o aumento dos mediadores inflamatórios pulmonares e sistêmicos o que, por sua vez, induziria ao aparecimento da DBP. Então, a teoria defende a existência da sensibilização da resposta imune inata pela ventilação mecânica forçada e, em contrapartida, a resposta imune inata sensibilizada, desencadearia uma série de cascatas imunes e inflamatórias que culminaria com a lesão pulmonar vista na DBP (32).

O fluxo de neutrófilos nas vias aéreas ocorre dentro de poucos minutos após o início da ventilação mecânica e acarreta na diminuição do número de neutrófilos circulantes. Junto a isto, ocorre a formação de edema pulmonar aumentando o risco de DBP (33). A presença de muitos neutrófilos nos capilares alveolares promove ativação e interação das células endoteliais com os mesmos, através das moléculas de adesão, como as integrinas e selectinas, iniciando um processo que permite o extravasamento de polimorfonucleares e de macrófagos (diapedese) para interstício alveolar, com subsequente migração para áreas de inflamação (34). A secreção de vias aéreas de recém-nascidos com DBP contém altas concentrações de fatores quimioquímicos que refletem a alta atividade quimiotática e que são responsáveis pelo recrutamento dos neutrófilos e dos macrófagos. A maioria das citocinas pró-inflamatórias que podem estar envolvidas no processo fisiopatológico tanto da DBP “clássica”

quanto da “nova”, tais como IL 1 β , IL 6, IL8 ou CXCL8, TNF- α , são sintetizadas pelos macrófagos alveolares, células epiteliais das vias aéreas, fibroblastos, pneumócitos tipo II e pelas células endoteliais, após terem sofrido estímulo hipóxico, hiperóxico, endotóxico, bio, baro e/ou volutrauma (35). Citocinas anti- inflamatórias, tais como a IL10, IL4, IL12, IL13, IL18, também são produzidas por estas mesmas células. Alguns autores evidenciam, em seus estudos, que na fisiopatologia da “nova” DBP existe um desequilíbrio entre mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, com um predomínio do primeiro, devendo, este desequilíbrio, ser considerado como fator importante de lesão pulmonar.

Uma vez que vários mecanismos inflamatórios estão intimamente relacionados à patogênese da DBP “clássica” e “nova”, o estudo de subpopulações de leucócitos, moléculas de adesão inflamatória e de marcadores e mediadores da inflamação, como as interleucinas, além de fatores proliferativos e apoptóticos, envolvidos nesta doença, pode ser importante para melhor entendimento de sua fisiopatogenia .

Com o estudo dos marcadores da subpopulação de leucócitos e moléculas de adesão inflamatória (CD4, CD8, CD74, CD25 entre outros), alguns autores demonstraram que prematuros, com doença da membrana hialina, que evoluíram para DBP, apresentavam uma redução significativa de CD4 (36). Estes marcadores de subpopulação de linfócitos são anticorpos anti- proteínas de superfície, como o CD4, o qual tem a função de molécula de adesão e de co-receptor de membrana. O anticorpo anti-CD4, utilizado neste último estudo descrito, identifica os linfócitos T auxiliares, já que o CD4 aparece com grande frequência neste tipo de linfócito. Já o anticorpo anti- CD8 identifica os linfócitos T citotóxicos pelo mesmo motivo. Seguindo a mesma linha de raciocínio, o anticorpo anti-CD25 identifica as células TCD25+, auxiliadoras da resposta Th1, pois este anticorpo reconhece o receptor da interleucina-2, comumente expresso na membrana do linfócito T auxiliar da resposta Th1. Já o anticorpo anti- CD74 identifica as células que expressam o complexo de histocompatibilidade de classe II, porque se liga ao co-receptor CD74, que por sua vez, está ligado ao receptor MHC de classe II (37, 38).

Watterberg demonstrou que recém nascidos prematuros abaixo de 2000g, cujas mães cursaram com corioamnionite e evoluíram com DBP, apresentaram IL1 β elevada desde o primeiro dia de vida, em lavado brônquico traqueal (39). Neste contexto, substâncias que diminuam o efeito das citocinas pró-inflamatórias, ou que interfiram no fluxo de neutrófilos nas vias aéreas ou tecido pulmonar podem ser de grande ajuda para regular o processo inflamatório (40).

Infecção materna, principalmente a corioamnionite, tem sido implicada na gênese da DBP. Alguns autores demonstraram que citocinas inflamatórias detectadas no sangue de cordão, no primeiro dia de vida, principalmente IL 8 e IL 10, são associadas ao risco de DBP, principalmente pela resposta fetal das citocinas inflamatórias insuficiente (41, 42).

Alguns estudos clínicos e experimentais sugerem que a toxicidade do oxigênio parece ser um dos fatores mais importantes envolvidos na fisiopatologia da DBP, sendo assim, a lesão do tecido pulmonar não está claramente dependente da concentração e do tempo de exposição

ao oxigênio, mas à concentração do mesmo. As alterações provocadas pelo oxigênio são inespecíficas, sendo que ocorrem diferentes graus de atelectasia, inflamação, fibrose, edema e hemorragia. Além destas lesões, ocorre também a migração de polimorfonucleares, os quais contêm enzimas proteolíticas e seus inibidores. Parece que um desequilíbrio entre estes dois sistemas enzimáticos poderia levar a algumas lesões na matriz extracelular da parede alveolar, acarretando a diminuição da área de superfície interna alveolar e, sendo assim, interferindo no processo de desenvolvimento pulmonar conhecido como alveologênese, culminado com a hipoalveolização (33, 34). Além das proteases, a metaloproteinase tem papel importante no remodelamento durante o desenvolvimento pulmonar, sendo que foi identificada na secreção de vias aéreas de recém nascidos com DBP e correlacionada com lesão da matriz extracelular pulmonar, quando houve um aumento de sua expressão.

Autores têm demonstrado outro processo de lesão pulmonar decorrente da hiperóxia em pulmões de ratos, a apoptose pulmonar (43, 44). Através da demonstração da presença ou não da Fas e Fas-ligante nas primeiras horas de suplementação de oxigênio, estes autores têm identificado a presença de ativação de cascatas de apoptose durante o processo da gênese da DBP. Porém, após 72h de hiperóxia, a necrose inflamatória, e não a apoptose do tecido pulmonar, prevalece. Em outro estudo mais recente, autores concluíram que a presença de Fas-ligante, induzindo apoptose do epitélio alveolar, durante a fase de remodelamento pós-canalicular, é suficiente para alterar o desenvolvimento alveolar pós-natal em ratos. Este fato leva a novos horizontes no entendimento da patogênese das doenças pulmonares induzidas por desregulação da apoptose e do crescimento celular, como a DBP “nova” (43- 47).

A validade do estudo da resposta inflamatória em material de necropsia baseia-se em grandes amostras, material controlado, com seguimento clínico, resultando em análise mais imparcial, entre outras vantagens (48). As desvantagens de trabalhar com material de necropsia é o fato de que dados epidemiológicos das formas leves da doença podem não estar incluídas na amostra. Outra desvantagem é que, na maioria das vezes, este material é fixado em formol e embocado em parafina, tornando um pouco mais difícil o estudo de moléculas secretadas, pequenas e frágeis como as citocinas, interleucinas e leucotrienos (49). No entanto, marcadores de superfície são facilmente detectados em material parafinado por análise de imunistoquímica (49).

Perguntas importantes acerca da DBP permanecem sem resposta e incluem a classificação clínica e laboratorial da doença, a fisiopatologia e o papel da resposta inflamatória. Em que momento as respostas inflamatórias se exacerbam e quais os mecanismos específicos proliferativos, apoptóticos ou não que levam a formação capilar e alveolar diminuída que se observa nestes bebês. Além disso, não se sabe ao certo qual o papel dos fatores de risco como a presença de corioamnionite, sepse, persistência do canal arterial e da enterocolite necrosante na fisiopatogenia desta doença.

A hipótese deste estudo se baseia no fato de que as subpopulações de leucócitos e as moléculas de adesão inflamatória podem influenciar o tipo de lesão broncodisplásica, se

“clássica” ou “nova”. Este fato pode ser dependente ou não de fatores etiopatogênicos como o tempo de uso de oxigênio e a presença ou não de fatores de risco.

2 - OBJETIVO

2.1 – Objetivo Principal

Estudar os marcadores das subpopulações de leucócitos e moléculas de adesão inflamatória em pulmões de neomortos prematuros com DBP “clássica” e “nova”, comparando os resultados com tempo de exposição ao oxigênio.

2.2 – Objetivos Secundários

- 1) Analisar, do ponto de vista anatomopatológico, amostras de pulmões de neomortos prematuros submetidos a oxigenioterapia a fim de identificar os casos com características histopatológicas de DBP “clássica”, separando-os dos casos com “nova” DBP e dos casos sem DBP.
- 2) Analisar morfometricamente, amostras de pulmões de neomortos prematuros submetidos a oxigenioterapia, sem características histopatológicas de DBP “clássica”, a fim de identificar os casos com características histopatológicas e morfométricas de “nova” DBP, separando-os dos casos sem DBP.
- 3) Correlacionar os três grupos anatomopatológicos do estudo (grupo 1 = DBP “clássica”; grupo 2A = “nova” DBP e; grupo 2B = sem DBP) com os fatores de risco para DBP, além de dados clínicos dos pacientes, identificando assim, os grupo clínicos de DBP (grupo 1 = pré-DBP; grupo 2 = DBP em evolução e; grupo 3 = DBP estabelecida; conforme classificação do *National Institute of Health* de 2001).
- 4) Analisar, através da técnica de imunistoquímica, subpopulações de leucócitos e moléculas de adesão, nos três grupos anatomopatológicos do estudo, comparando seus resultados entre si, além de compará-los com os dados clínicos dos pacientes e com os fatores de risco para DBP.

3 – PRIMEIRO ARTIGO (PUBLICADO)

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA NO DIAGNÓSTICO DA
“NOVA” DISPLASIA BRONCOPULMONAR E COMPARAÇÃO
CLÍNICOPATOLÓGICA COM A FORMA “CLÁSSICA” DA DOENÇA.**

**HISTOPATHOLOGICAL AND MORPHOMETRIC ANALYSIS IN THE DIAGNOSIS OF "NEW"
BRONCOPULMONAR DYSPLASIA AND CLINICAL AND PATHOLOGICAL COMPARISON
WITH THE "CLASSIC" FORM OF THE DISEASE.**

Análise histopatológica e morfométrica no diagnóstico da “Nova” Displasia Broncopulmonar e comparação clinicopatológica com a forma clássica da doença.

Okamoto C*, Bahr J**, Silva LGL** e Noronha L***

Abstract:

Introduction: The Bronchopulmonary dysplasia (BPD) remains a major complication in premature infants. Using exogenous surfactant and the prevention of respiratory diseases in the neonatal period, the incidence of classic BPD is decreasing, however, a new form of BPD has appeared, more gentle/lenient? associated to the pulmonary alveolus and vascular incomplete development. The anatomopathologic findings in the classic BPD are injury and repair lesion, and the findings of the "new" BPD are cellular hypoplasia with few or no fibrosis.

Objectives: To demonstrate the morphometric and histopathological alterations in the lungs of premature infants, who died with clinical course consistent of new BPD compared to a control group (without BPD) and the classic form of BPD, in addition to correlate the three groups, the lengthy time of use of oxygen and other risk factors of BPD. **Methods:** The studied population was composed of 59 premature infants lungs samples of gestational age less than 34 weeks and use of oxygen. Review of records and clinical data related to risk factors for BPD ante and post-natal care were compiled. After reviewing histological laminas samples of lung, 2 groups were separated: 1 - with histological criteria for diagnosis of classic BPD, and 2 - without classic BPD. The group without classic BPD was then submitted to morphometric analysis, which measures the areas and perimeters of alveolus, in addition to counting the number of alveolus by field. Following this analysis, the studied population was divided: 1 - with histological criteria for the diagnosis of BPD classic, 2 - With morphometric findings for new diagnosis of BPD (cases with more than 7 days of oxygen) and 3 - the control group or without classic BPD or new BPD (cases with less than 7 days of oxygen). **Results:** Group 1 (classic BPD) had inflammation and evident septal fibrosis. The groups 2 and 3 (BPD new and control) histopathological alterations were minimal, and morphometric analysis was necessary to separate them. The group 2 (new BPD) showed the number of alveolus, its area and perimeter reduced when compared to group 3 (control), with difference statistically significant. There was no significant statistical difference when comparing the 3 groups on the risk factors for development of both classic and new BPD. **Conclusion:** The forms of classic and new BPD have multifactorial etiology, but distinct among themselves. Pathologic diagnosis of new BPD may require morphometric analysis. Histopathologic and morphometric alterations in this study preceded the need for oxygen for more than 28 days, therefore, establish therapeutics for BPD before the 28 days of life in premature newborns in oxygen would be justified by our histopathological and morphometric findings.

Palavras-chave: Bronchopulmonary dysplasia, morphometric analysis,

Introdução

A despeito dos avanços tecnológicos e prevenção de doenças respiratórias no período neonatal, a Displasia Broncopulmonar (DBP) continua sendo a maior complicação nos recém nascidos prematuros que necessitam de suporte ventilatório e ou oxigenioterapia prolongados. Ela foi primeiramente descrita por Northway, (1) como uma lesão pulmonar crônica em consequência da Doença da Membrana Hialina, ventilação mecânica prolongada e agressiva com altas concentrações de oxigênio. Esta forma de DBP severa que leva a insuficiência respiratória grave, hipertensão pulmonar e alterações radiológicas

características, como enfisema, atelectasia e fibrose, é atualmente classificada como DBP clássica.

Com o aumento crescente da sobrevivência dos prematuros de muito baixo peso (menos de 1000g), em parte pelo uso obstétrico de corticóide antenatal e aplicação de surfactante exógeno, a DBP na sua forma mais branda tem sido motivo de discussões. Inúmeras pesquisas tem sido realizadas para sua definição e diagnóstico. Uma vez que a necessidade de suporte ventilatório e falência respiratória são menores, os achados radiológicos desta forma de DBP também são inespecíficos,(3) sendo que esta última seria decorrente de uma alteração do desenvolvimento pulmonar normal em um recém nato prematuro, como modificações na alveolização e no amadurecimento dos pulmões.(2) Estes fatos levaram muitos autores a classificar esta forma de DBP de “nova DBP”.

Enquanto a DBP clássica é correlacionada com os efeitos deletérios do barotrauma, volutrauma, atelectrauma e a toxicidade do oxigênio ou biotrauma, a DBP nova associa-se ao desenvolvimento pulmonar alveolar e vascular incompleto, processos inflamatórios ante ou pós natais, persistência do canal arterial, enterocolite necrosante e corioamnionite, entre outros.

Do ponto de vista anatomopatológico a DBP clássica é caracterizada por um processo de lesão e reparação, com edema alveolar e intersticial precoce, inflamação e fibrose (3). Coalson e col evidenciaram em pulmões de macacos achados histopatológicos da “nova” DBP como hipoplasia alveolar, fibrose variável da parede sacular, e doença mínima das vias aéreas. Estes autores demonstraram também diminuição da alveolização e da medida da superfície interna da área alveolar. Estes achados também foram confirmados por outros autores em pulmões de ovelhas, carneiros e coelhos (4-5-6).

O objetivo deste trabalho é demonstrar as alterações histopatológicas e morfométricas em amostras de pulmões de recém nascidos prematuros que foram a óbito com evidencia clínica de DBP “nova” comparando-as com grupo controle e forma clássica da DBP e correlacionar estas formas com o tempo de uso de oxigênio e fatores de risco da DBP.

Materiais e Métodos

A amostra foi coletada no período compreendido entre janeiro de 1994 a janeiro de 2005 e consistiu em revisão de 7000 necrópsias de recém nascidos do banco de dados do Serviço de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Paraná, Unidade de Patologia Pediátrica e Perinatal. A população do estudo foi composta por 59 amostras de tecidos pulmonares de recém nascidos prematuros com idade gestacional menor de 34 semanas, submetidos a oxigenioterapia. Foram excluídos os que apresentaram malformações e/ou broncoaspiração de mecônio. Foi realizada revisão dos prontuários e coletados dados quanto ao gênero, idade gestacional, peso de nascimento, Apgar de 1º e 5º minuto, tempo de ventilação mecânica e oxigenioterapia, fatores de risco para DBP tais como sepse (clínica e laboratorial com confirmação da detecção do patógeno), enterocolite necrosante (dados clínicos e radiológicos), persistência do canal arterial (dados clínicos e ecocardiográficos),

corioamnionite (clínica e/ou confirmada pelo anátomo-patológico das placentas).

Todas as lâminas das amostras pulmonares (4 em média) de todas as 59 necrópsias, foram reavaliadas em hematoxilina- eosina, sendo que após esta fase, os casos foram divididos em 2 grupos: 1- aqueles que apresentavam alterações histopatológicas características da DBP clássica e 2- aqueles casos sem DBP clássica. Este 2º grupo foi dividido quanto ao tempo de uso de oxigênio: entre 0 a 7 dias e mais de 7 dias. O grupo sem DBP clássica foi submetido à análise morfométrica, para confirmação ou não da presença de alterações características da “nova” DBP, tais como a diminuição do número de alvéolos e diminuição do perímetro e área dos alvéolos.

Imagens digitais de 10 campos não justapostos do parênquima pulmonar foram capturadas das amostras dos prematuros do grupo 2, utilizando software Image Pro Plus®. Através do aplicativo denominado “morfometria de linhas”, este software, por meio de desenho livre do contorno alveolar, fornece medidas de perímetro e área dos alvéolos e nº dos mesmos por campo. [7] Foram medidos todos os alvéolos presentes em cada um dos 10 campos digitalizados na objetiva de 20x. Por fim, foram calculadas as médias e os desvios padrões de cada caso. Esta análise foi realizada por um único observador, sem o conhecimento prévio dos dados de oxigenioterapia.

Após esta análise morfométrica, a população em estudo ficou assim dividida: grupo 1- DBP clássica, grupo 2- DBP nova (com mais de 7 dias de oxigenioterapia) e grupo 3- controle (com menos de 7 dias de oxigenioterapia)

Análise estatística dos dados coletados foi examinada pelos métodos de Mann- Whitney, ANCOVA, Levène, Bonferroni, Kruskall- Wallis Spearman e Shapiro-Wilks. Valores de $p < 0.05$ indicaram significância estatística.

Resultados

Dos 59 casos do estudo, 11 foram classificados como DBP clássica. 48 casos restantes divididos em 2 grupos de acordo com as alterações morfométricas encontradas e correspondendo também ao tempo de uso de oxigênio; sendo que 43 casos com menos de 7 dias de oxigenioterapia, caracterizaram o grupo controle com número e tamanho de alvéolos próximo do normal e 5 casos com mais de 7 dias de oxigenioterapia caracterizaram o grupo com DBP “nova”, com diminuição tanto no número quanto no tamanho dos alvéolos.

1-Análise histomorfométrica:

1a- Análise histopatológica

Na análise histopatológica inicial de revisão de casos, o grupo com DBP clássica (n=11), foi facilmente evidenciado nas lâminas coradas em Hematoxilina- Eosina com as seguintes características predominantes: a- fase aguda: membranas hialinas, necrose brônquica,

bronquiolite obliterante, bronquiectasias e fibrose precoce de septo. b- fase crônica: fibrose intersticial, espessamento da parede vascular e ácinos colapsados e hiperdistendidos.

Os casos sem DBP, clássica (n=48), apresentavam alterações histopatológicas mínimas, tais como: leve edema de septo, alteração de insuflação alveolar e quase ou nenhum processo inflamatório, não sendo possível diferenciar do ponto de vista histopatológico, o grupo com DBP nova do grupo controle, sendo assim necessária a análise morfométrica.

1b- Análise morfométrica

O número de alvéolos está diminuído no grupo que utilizou oxigenioterapia por mais de 7 dias, bem como o seu perímetro e sua área, e tem uma diferença estatisticamente significativa, comparada com o grupo com menor tempo de terapia (vide tabela 1 e 2)

Tabela 1- Número de alvéolos

| Nºalvéolos | n | Média | DP | Valor de p |
|------------|----|-------|-------|------------|
| DBP NOVA | 5 | 40.94 | 15.13 | |
| SEM DBP | 37 | 57.65 | 16.20 | 0.033* |

Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05^*$

*6 casos retirados do grupo controle por falta de dados clínicos completos

Tabela 2-Área e perímetro médio dos alvéolos:

| Área dos alvéolos | n | Média | DP | Valor de p |
|------------------------|--------|----------|--------------|------------|
| DBP NOVA | 5 | 14549,67 | 9486,06 | |
| SEM DBP | 4 3 | 19083,02 | 11491,1 1 | 0,054* |
| | | | | |
| Perímetro dos alvéolos | N | Média | DP | Valor de p |
| DBP NOVA | 5 | 481,52 | 182,42 | |
| SEM DBP | 4 3 | 611,33 | 206,19 | 0,018* |

ANCOVA (ajustada para idade gestacional), $p < 0.05$

2-Análise clínico patológica:

Em relação ao gênero, não há predomínio de nenhum dos gêneros nos 3 grupos. Os neomortos do grupo da DBP nova mostraram- se mais pesados e mais maduros em relação aos outros 2 grupos, não tendo diferença quanto a idade materna. (vide Tabela 3)

Tabela 3- Idade gestacional, peso de nascimento e idade materna:

| ID GEST | N | MÉDIA | DP | Valor de p |
|--------------|----|-------|------|------------|
| DBP CLÁSSICA | 11 | 29,05 | 2,71 | |
| DBP NOVA | 5 | 32,10 | 2,92 | |
| SEM DBP | 37 | 28,61 | 2,45 | 0,05 |
| | | | | |

| PESO DE NASC | N | MÉDIA | DP | Valor de p |
|---------------------|----------|--------------|-----------|-------------------|
| DBP CLÁSSICA | 11 | 1021,36 | 288,90 | |
| DBP NOVA | 5 | 1340,00 | 397,54 | |
| SEM DBP | 37 | 927,14 | 354,02 | 0.044 |
| | | | | |
| ID MATERNA | N | MÉDIA | DP | Valor de p |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 26,18 | 7,95 | |
| DBP NOVA | 5 | 29,75 | 8,10 | |
| SEM DBP | 37 | 23,89 | 5,39 | 0.282 |

Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$

*6 casos retirados do grupo controle por falta de dados clínicos completos

Em relação aos fatores de risco ante-natais, como paridade, realização de pré natal, gemelaridade, amniorrexe prematura, via de parto (vaginal ou cesárea), corioamnionite clínica e/ou alteração anátomo- patológica da placenta e diabetes gestacional, podem estar correlacionados ao desenvolvimento da forma mais branda da DBP, segundo a literatura internacional.(8). Porém, os dados deste estudo não demonstraram diferença estatisticamente significativa, para estas variáveis. (vide Tabela 4). Apenas a Doença Hipertensiva Específica da Gravidez (DHEG) demonstrou uma tendência do ponto de vista estatístico, a se correlacionar com o desenvolvimento da nova DBP.

Dados pós-natais referentes à necessidade de reanimação neonatal cardiopulmonar, Apgar de 1º e 5º minuto, administração de surfactante exógeno, enterocolite necrosante, broncopneumonia, hemorragia pulmonar, hipertensão pulmonar, hemorragia intracraniana, asfixia perinatal, sepse neonatal, pneumotórax e persistência do canal arterial não tiveram diferença estatística significativa. (vide Tabela 5)

Tabela 4- Fatores de risco ante- natais

| PARIDADE | N | MÉDIA | DP |
|--------------------------------|----------|--------------|------------|
| DBP CLÁSSICA | 11 | 2,36 | 1,50 |
| DBP NOVA | 5 | 3,80 | 3,70 |
| SEM DBP | 37 | 2,39 | 1,50 |
| | | | |
| PRÉ NATAL | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 63.64%(7) | 36.36%(4) |
| DBP NOVA | 5 | 80%(4) | 20%(1) |
| SEM DBP | 37 | 48.64%(18) | 51.36%(19) |
| | | | |
| AMNIORREXE PREMATURA | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 10 | 90%(9) | 10%(1) |
| DBP NOVA | 5 | 80%(4) | 20%(1) |
| SEM DBP | 32 | 68.75%(22) | 31.25%(10) |
| | | | |
| CORIOAMNIONIT E CLÍNICA | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 9.09%(1) | 90.91%(10) |
| DBP NOVA | 5 | 0% | 100%(5) |
| SEM DBP | 37 | 13.51%(5) | 86.49%(32) |
| | | | |

| DIABETES GESTACIONAL | N | SIM | NÃO |
|-----------------------------|----------|------------|------------|
| DBP CLÁSSICA | 11 | 0% | 100%(11) |
| DBP NOVA | 5 | 20%(1) | 80%(4) |
| SEM DBP | 37 | 0% | 100%(37) |
| | | | |
| DHEG | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 21.27%(3) | 72.73%(8) |
| DBP NOVA | 5 | 60%(3) | 40%(2) |
| SEM DBP | 37 | 13.89%(5) | 86.11%(31) |

Teste exato de Fischer, $p < 0.017$ (corrigido por Bonferroni)
DHEG-Doença Hipertensiva Específica da Gravidez
Dados sem significância estatística ($p > 0.017$)

Tabela 5- Fatores de risco pós- natais:

| REANIMAÇÃO | N | SIM | NÃO |
|--------------------------|----------|------------|------------|
| DBP CLÁSSICA | 11 | 91.91%(10) | 9.09%(1) |
| DBP NOVA | 5 | 100%(5) | 0% |
| SEM DBP | 37 | 81.08%(30) | 18.92%(7) |
| | | | |
| PNEUMONIA | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 54.55%(6) | 45.45%(5) |
| DBP NOVA | 5 | 0% | 100%(5) |
| SEM DBP | 37 | 18.92%(7) | 81.08%(30) |
| | | | |
| PCA | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 91.91%(10) | 9.09%(1) |
| DBP NOVA | 5 | 40%(2) | 60%(3) |
| SEM DBP | 37 | 8.11%(3) | 91.89%(34) |
| | | | |
| SEPSE CLÍNICA | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 9.09%(1) | 90.91%(10) |
| DBP NOVA | 5 | 0% | 100%(5) |
| SEM DBP | 37 | 13.51%(5) | 86.49%(32) |
| | | | |
| ASFIXIA PERINATAL | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 54.55%(6) | 45.45%(5) |
| DBP NOVA | 5 | 20%(1) | 80%(4) |
| SEM DBP | 37 | 63.89%(23) | 36.11%(13) |
| | | | |
| PNEUMOTORAX | N | SIM | NÃO |

| | | | |
|----------------------------|----------|------------|------------|
| DBP CLÁSSICA | 11 | 9.09%(1) | 91.91%(10) |
| DBP NOVA | 5 | 0% | 100%(5) |
| SEM DBP | 37 | 5.41%(2) | 94.59%(35) |
| | | | |
| HEMORRAGIA PULMONAR | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 27.27%(3) | 72.73%(8) |
| DBP NOVA | 5 | 20%(1) | 80%(4) |
| SEM DBP | 37 | 13.51%(5) | 86.49%(32) |
| | | | |
| HPERTENSÃO PULMONAR | N | SIM | NÃO |
| DBP CLÁSSICA | 11 | 18.18%(2) | 81.82%(9) |
| DBP NOVA | 5 | 20%(1) | 80%(4) |
| SEM DBP | 37 | 10.81%(4) | 81.19%(32) |

Teste exato de Fischer, $p < 0.017$ (corrigido por Bonferroni)

PCA-Persistência do Canal Arterial

Dados sem significância estatística ($p > 0.017$)

Discussão

Foram identificados vários fatores desencadeantes para o desenvolvimento da DBP, tais como imaturidade pulmonar, lesão pulmonar aguda com resposta inflamatória e reparativa. Estes fatores ainda servem de base para os estudos que buscam o entendimento da DBP atualmente. Por ser de etiologia multifatorial seu estudo tem desencadeado diversas discussões na sua definição, diagnóstico, fisiopatologia e possíveis tratamentos. Atualmente a instabilidade cardiovascular, a acidose metabólica, a oligúria e a hipotensão, além da nutrição enteral inadequada, da propensão a infecções hospitalares, do desenvolvimento de colestase, sepse, enterocolite necrosante e da persistência do canal arterial também são fatores que isolados ou associados podem contribuir para o desenvolvimento de DBP.(9)

Desde a descrição inicial da DBP há 40 anos atrás, avanços no cuidado perinatal permitiram a sobrevivência de crianças cada vez mais imaturas. A doença não desapareceu, mas o padrão clínico, histopatológico e morfométrico mudou, como o hipodesenvolvimento dos espaços aéreos distais. Enquanto a DBP clássica é relacionada claramente com a ventilação mecânica, oxigenioterapia e volutrauma, a DBP nova ainda tem suscitado muito estudo e pesquisa para reconhecer os mecanismos que interrompem a seqüência normal de desenvolvimento pulmonar, resultando no padrão de simplificação alveolar.

Chambers em 1989 descreveu os achados patológicos do pulmão com DBP clássica como metaplasia escamosa, fibrose peribronquial e do septo alveolares com alterações hipertensivas vasculares, como foi observado neste estudo. Posteriormente Pierce, Albertine e Bland (2001)(10) descreveram

achados anátomopatológicos da forma mais branda da DBP como o bloqueio do desenvolvimento pulmonar com conseqüente redução do número de alvéolos e da área alveolar, insuflação não uniforme dos espaços aéreos, presença de edema intersticial, escassa reação inflamatória e pouca ou nenhuma fibrose. Estes dados também foram encontrados no presente estudo.

Coalson demonstrou que em pulmões de macacos prematuros, com 7 dias de vida, submetidos a ventilação mecânica e oxigenioterapia a 100%, já apresentavam acentuada redução do número de alvéolos. Este dado confirma então que alterações histopatológicas e morfométricas da DBP precede a confirmação clínica da necessidade de oxigenioterapia por mais de 28 dias de vida e/ou 36 semanas de idade gestacional corrigida pós - conceptual. Em vista disso, o conceito para a confirmação clínica da DBP nova acima descrita, não parece estar de acordo com a evolução fisiopatológica da doença, sendo assim, poderíamos pensar em iniciar terapêuticas preventivas, em grandes prematuros, já a partir de 7 dias de uso de oxigênio, acompanhando o aparecimento das lesões na anatomia patológica.

Os fatores de risco que podem estar relacionados a interrupção do desenvolvimento alveolar, mais encontrados na literatura são a corioamnionite, persistência do canal arterial, sepse e doença hipertensiva específica da gravidez, sendo que neste estudo não foram encontrados fatores de risco antenatais e pós-natais com significância estatística, apenas uma tendência da Doença Hipertensiva específica da gravidez, a se correlacionar com o desenvolvimento de DBP nova.

Conclusões

As formas de DBP, nova e clássica, são de etiologia multifatorial, porém distintas entre si. Estas diferenças tanto clínica, quanto anatomopatológicas, foram identificadas neste estudo. A DBP clássica apresentou, após 21 dias de oxigenioterapia em média, alterações anatomopatológicas características, já amplamente descritas na literatura.

A alteração anatomopatológica da DBP nova, é facilmente detectada pela análise morfométrica dos pulmões, com menor número de alvéolos, menor área e perímetro alveolar, naqueles casos que utilizaram oxigenioterapia e ventilação mecânica por mais de 7 dias. Para este tipo de análise, seria necessária a biópsia pulmonar a céu aberto, a qual é inviável e altamente invasivo nesta faixa etária. Diante disso, a instituição precoce de medidas terapêuticas, na tentativa de minimizar as alterações descritas na DBP nova, estaria justificada pelo aparecimento também precoce das alterações anatomopatológicas, fato este já descrito por diversos autores e corroborado por este trabalho.

Neste estudo, quando correlacionamos os dados clínicos com os dados anatomopatológicos, observamos que apenas o fato de ser prematuro e utilizar oxigênio por mais de 7 dias são fatores de risco na gênese da DBP nova.

Além disso, a Doença Hipertensiva Específica da Gravidez apresentou tendência estatística para influenciar a gênese da DBP nova, talvez por contribuir na angiogênese pulmonar, e assim levar à interrupção do desenvolvimento pulmonar e ao surgimento da doença.

Referências

- [1] Northway WH Jr et al. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline-membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1967; 27:356-368.
- [2] Bourbon J et al. Control mechanisms of lung Alveolar Development and their disorders in Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatr Res* 2005; 57:38R-46R.
- [3] Rebello CM, Mascaretti RS. A nova displasia broncopulmonar. *Manual de atualizações em Neonatologia. 1º ed. Rio de Janeiro. Editora Panamericana. 2004; pág 87 – 132.*
- [4] Coalson JJ, Winter V, deLemos RA. Decreased Alveolarization in Baboon survivors with Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:640-6
- [5] Coalson JJ et al. Neonatal Chronic Lung Disease in Extremely Immature Baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1333-1346.
- [6] Mascaretti RS et al. Preterm rabbits exposed to prolonged hyperoxias as a model for the study of bronchopulmonary dysplasia *Pediatr Res* 2003; 53:436A.
- [7] Willet KE et al. Antenatal Endotoxin and Glucocorticoid Effects on Lung Morphometry in Preterm Lambs. *Pediatr Res* 2000;48:782-788.
- [8] Tapia JL ET AL. Bronchopulmonary dysplasia: incidence, risk factors and resource utilization in a population of South American very low birth weight infants. *J. Pediatr. (Rio de J).* 2006; 82; 15- 20
- [9] Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1723-29
- [10] Bland RD et al. Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: potential benefits of retinol treatment. *Biol Neonate*2003;84(1):101-2

4 – SEGUNDO ARTIGO (ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO-PEDIATRICS)

**THE ROLE OF INFLAMMATORY RESPONSE IN BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA: AN
IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 16 CASES**

**THE ROLE OF INFLAMMATORY RESPONSE IN
BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA: AN
IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 16 CASES**

Cristina Terumy Okamoto¹, Ana Paula Persicote², Luca Rodrigo Pasqualotto³, Gabriela Traiano³,
Tammy Almeida⁴, Lúcia de Noronha⁵

EXPERIMENTAL PATHOLOGY LABORATORY
CENTER FOR HEALTH AND BIOLOGICAL SCIENCES
PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF PARANÁ (PUCPR)

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE CURITIBA
PATHOLOGICAL ANATOMY DEPARTMENT
FEDERAL UNIVERSITY OF PARANÁ (UFPR)

- 1 – Neonatologist, Doctoral Student at the Center for Health and Biological Sciences (PUCPR)
- 2 – Pathologist, Masters Student at the Department of Pathological Anatomy (UFPR)
- 3 – Undergraduate Medical Student (PUCPR)
- 4 – Undergraduate Medical Student (UFPR)
- 5 – Pediatric Pathologist at the Department of Pathological Anatomy (UFPR) and the Center for Health and Biological Sciences (PUCPR), MD, MSc, PhD

Corresponding author:

Dr. Cristina Okamoto

Rua João Pontoni 98 ap 82

Cristo Rei

CEP 80050-490

Curitiba

PR

BRAZIL

Phone.: (00 55 41) 3077-0352

Fax: (00 55 41) 3077-2446

e-mail: crstoka@livemail.com.br

Keywords:

Bronchopulmonary dysplasia, premature newborn, Immunophenotyping, inflammatory process and apoptosis.

Abbreviations:

BPD: Bronchopulmonary dysplasia

TMA: tissue microarrays

GA: gestational age

TNF- α : tumor necrosis factor-alpha

IL-17: interleukin 17

PTN; premature newborn

The authors have indicated they have no financial relationships relevant to this article to disclose.

ABSTRACT

Introduction: Bronchopulmonary dysplasia's (BPD) physiopathology mechanisms studied are inflammatory process(Classic BPD) and/or arrest of lung growth(new BPD).

Objectives: Immunophenotypic characterization of inflammatory infiltrate in the lungs of with less than 34 weeks GA who developed "classic" or "new" BPD.

Methods: 53 lung samples from dead premature newborns with less than 34 weeks GA submitted to oxygen therapy. The samples were separated into 3 groups according with the histopathological and morphometrical findings and duration of oxygen therapy : 1 – with "classic" BPD, 2A – with "new" BPD and 2B – without "classic" or "new" BPD (No BPD group). Immunohistochemical analysis was performed with anti-CD14, anti-CD45RO, anti-CD20, anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. Neutrophil count was measured.

Results: Morphometric analysis revealed statistically significant differences between groups 2A and 2B. Neutrophil count and CD45RO+ T cell was higher in the "classic" BPD group than in the other groups ($p < 0,001$ and $p < 0.0004$ respectively). CD4+ T cell count was statistically higher in the "classic" BPD group than in the No BPD group ($p = 0.016$) and CD14+ cell count was higher in the "new" BPD group than in the "classic" BPD group ($p = 0.052$).

Conclusion: Our findings seem to corroborate the hypothesis that the initial inflammatory process is mediated by neutrophils and sustained by CD45RO+ and CD4+ T lymphocytes in the "classic" BPD form. The findings also establish a connection between CD14+ cells and the inflammatory process and apoptosis, especially in lung injury with decreased alveolar volume observed in "new" BPD.

INTRODUCTION

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a chronic pulmonary disorder and one of the main causes of morbidity that affects premature newborns (PTN) (1, 2, 3). The classic presentation of this disorder was described, in 1960, as presence of hyaline membrane disease, high inspired of oxygen concentrations, aggressive mechanical ventilation and characteristic radiological changes. The classic histological findings of BPD are hyaline membrane disease,

emphysema, atelectasis, fibrosis, squamous metaplasia and smooth muscle hypertrophy in the airways and pulmonary vasculature (4).

With the use of antenatal corticosteroid therapy, exogenous surfactant and technological advances in mechanical ventilation, there has been a significant increase in the survival rates of very PTN, particularly those under 1500 g. However, the incidence of BPD has not changed as expected (4, 5). Rather, a “new” modality of BPD has emerged, in which very low birth-weight PTN (<1500g) with less than 30 weeks gestational age(GA) and extremely immature lungs who require mechanical ventilation and/or oxygen therapy for a shorter period immediately after birth because of mild to moderate respiratory insufficiency (4), but still need supplemental oxygen at more than 28 days after birth (3), even when they do not show the radiological, anatomical and pathological alterations typical of “classic” BPD. In 2001, a consensus meeting suggested that the clinical criteria for the diagnosis of BPD in a PTN should be dependency on respiratory support at 28 days of postnatal life or 36 weeks postmenstrual age (6, 7, 8).

The most common pathological alterations in the “New BPD” are decreased alveolar septation and abnormal pulmonary vascular development compatible with arrested pulmonary growth and/or a decreased number of alveoli and reduced alveolar surface area, as well as non-uniform inflation in distal airways (5, 9, 10). Little or no septal fibrosis and almost no inflammatory reaction or interstitial edema is observed. The alterations in alveolar formation can be very subtle and not detectable on routine morphological tests. Therefore, the changes characteristic of “new” BPD can be related more to morphometric data than to morphological aspects (11, 12, 13). Morphometry, including alveolar count and measurement of alveolar size, has been used as a diagnostic criterion for this form of the disease (5, 9, 10, 14).

Over the last 10 years, the physiopathological basis of BPD has been mainly associated with two processes: inflammation and arrest of pulmonary growth (2, 4, 5). The lung inflammatory process in BPD is exacerbated by mechanical ventilation and exposure to supplemental oxygen. Several studies seem to indicate that the type of cell that prevails in the earliest stages of BPD is the neutrophil, followed by an abundance of macrophages and other inflammatory cells (15), with an increased influx of inflammatory cells, increased pulmonary vascular permeability and damage to or apoptosis of endothelial and epithelial cells (16, 17, 18).

Other authors believe this inflammatory process precedes and perpetuates the arrest of lung growth through the several activation pathways common to both processes. Nevertheless, little is known about the connection between these two processes (2).

The aims of the present study were (a) to investigate the subtypes of inflammatory cells that contribute to BPD using lung samples from autopsies of PTN with less than 34 weeks GA; and (b) to correlate the findings with clinical and pathological types of BPD (“classic” or “new”) and compare them with the findings for PTN without BPD (No BPD).

MATERIALS AND METHODS

The sample consisted of lung specimens from autopsies of PTN between 1994 and 2005, from the archives in the Department of Pathological Anatomy, Federal University of Paraná. Inclusion criteria were: complete autopsy; no congenital malformations; 34 weeks or less of GA and at least 2 hours of mechanical ventilation and/or oxygen therapy. The study population consisted of 53 PTN lung samples. The medical records were analyzed to collect data related to gender, gestational age, maternal age, weight at birth and duration of oxygen therapy, as well as other risk factors for BPD (type of delivery birth, APGAR score, prenatal care and pregnancy diseases, such as hypertensive diseases of pregnancy, chorioamnionitis or gestational diabetes). Samples unsuitable for testing, with meconium aspiration or insufficient tissue for immunohistochemical analysis or medical records not available or not found were excluded.

All the slides of the 53 patients were stained with hematoxylin-eosin and divided into two groups: 1- with histopathological alterations of “classic” BPD (n = 11) and 2- without histopathological alterations of “classic” BPD (n = 42). The

42 cases without “classic” BPD were divided into two groups according to the duration of oxygen therapy: 2A – oxygen administered for more than seven days (new BPD, n=5) and 2B – oxygen administered for less than seven days (without BPD, n=37). The samples in groups 2A and 2B were then analyzed morphometrically to confirm the existence of morphometrical alterations characteristic of “new” BPD in the group 2A (6, 7, 8).

Digital images of 10 non-adjacent fields (200x) in slides of pulmonary parenchymal tissue from the 42 cases without “classic” BPD were captured using Image Pro Plus® software. It measures alveolar perimeter and area in micrometers and the number of alveoli per field using the Line Morphometry application (22). All the alveoli in each of the 10 digitalized fields in the 20X object glass were measured. The means and standard deviations for each case were calculated. This analysis was performed by only one observer, who had no prior knowledge of the oxygen therapy data. Neutrophil count was determined using the same hematoxylin-eosin stained slides.

Neutrophil count was measured by scanning all the high power fields (400x) for each of the four samples for each case using a Olympus BX50 microscope. An average of 20 high-power fields was counted.

According to this morphometric analysis, group 2A had the characteristics of “new” BPD (Table 1). Thus, the study population was classified as follows: group 1 (“classic” BPD; duration of oxygen therapy not taken into account; n = 11); group 2A (“new” BPD; oxygen therapy for more than seven days; n = 5) and group 2B (No BPD; without “classic” or “new” BPD; oxygen therapy for less than seven days; n = 37).

The paraffin blocks of the study cases (n=53) were used to construct tissue microarrays (TMAs) (23). Lung samples from all the patients were inserted in multi-sample paraffin blocks

(TMAs) containing samples from 5 to 6 patients each (4 samples for each patient). Sections from the TMA blocks were cut for immunohistochemical analysis (immunoperoxidase staining).

The protocol for the immunoperoxidase assay was standardized with positive and negative controls. All the cases were tested with the following antibodies: anti-CD14 (clone 7, isotype IgG2a, mouse monoclonal, Novocastra^R); anti-CD45RO (clone UCHL, isotype IgG2-kappa, mouse monoclonal, Dako^R); anti-CD20 (clone IF5; isotype L26, mouse monoclonal, Dako^R); anti-CD4 (clone 4B12, isotype IgG1, kappa 1, mouse monoclonal, Novocastra^R); anti-CD8 (clone 1A5, isotype IgG1, mouse monoclonal, Novocastra^R).

The staining was interpreted as follows: for the anti-CD4, CD8, CD14, CD20 and CD45RO antibodies, the numbers of positive cells in four random high-power fields (400x) were counted for each of the four samples for each case. Cells that had a characteristic membrane staining pattern when observed under an Olympus BX50 microscope and were located in the alveolar septum or intra-alveolar space were considered positive. Cells in the intravascular space or in regions that normally contain peribronchial lymphoid aggregates were disregarded. For the anti-CD14 antibody only mononuclear cells (monocytes/histiocytes) were counted. Polymorphonuclear neutrophils with CD14 expression were ignored, and positive cells located in the interstitial space (alveolar septum) or the intra-alveolar space was counted separately.

The data were analyzed using the Mann-Whitney, ANCOVA, Levene, Bonferroni, Kruskal-Wallis, Spearman and Shapiro-Wilks tests. p values <0.05 indicated statistical significance.

RESULTS

In the histopathological analysis of the “classic” BPD group (n=11), the morphological characteristics were observed during the acute and chronic stage of the disease, previously described by the literature. Cases without the pathological characteristics of “classic” BPD (2A and 2B, n = 42) had minimal histopathological changes, so no histopathological distinction could

be made between the groups. The samples were therefore analyzed morphometrically, and this revealed differences statistically significant between these two groups (see Table 1). Group 2A, with “new” BPD, had fewer and smaller alveoli than the samples in group 2B, No BPD.

Table 1 – Median number of alveoli and alveolar area and perimeter (in micrometers) in the No BPD and “new” BPD groups.

| | “NEW” BPD (N=5) | NO BPD (N=37) | p VALUE |
|--------------------------|--------------------|------------------|----------------|
| NUMBER OF ALVEOLI | 40.94 | 57.65 | 0.033** |
| AREA | 14549.67 | 19083.02 | 0.054* |
| PERIMETER | 481.52 | 611.33 | 0.018* |

*Ancova (gestational age adjustment) p<0.05.

**Mann-Whitney non-parametric test p<0.05.

Coincidentally, the “classic” BPD group had received oxygen therapy for the longest (at least 15 days and an average of 23 days). The cases in 2A had received supplemental oxygen for more than 7 days and average of 10.4 days. And group 2B had been on oxygen for less than 7 days and average was 43.87 hours.

Table 2 shows the epidemiological profile of the study sample and gives gender, gestational age, maternal age and birth weight.

Table 2 – Gestational age, maternal age, birth weight and gender for the three groups:

| | CLASSIC BPD (N=11) | “NEW” BPD (N=5) | NO BPD (N=37) | p VALUE |
|------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|---------------|
| GESTATIONAL AGE | 29.05 | 32.10 | 28.61 | 0.050 |
| BIRTH WEIGHT | 1021.36 | 1340.00 | 927.14 | 0.044* |
| GENDER(male %) | 45.45%(5) | 20%(1) | 32.44%(12) | 0.100 |
| MATERNAL AGE | 26.18 | 29.75 | 23.89 | 0.282 |

*Kruskal-Wallis non-parametric test p<0.05.

No statistically significant differences between the groups were observed for the other risk factors investigated (type of delivery birth, APGAR score, prenatal care and diseases during pregnancy).

Neutrophil influx was much higher in the “classic” BPD than in the “new” BPD or No BPD group (Table 3); this difference was statistically significant ($p < 0.001$).

Table 3 – Neutrophil count for each of the three groups.

| | “CLÁSSIC” BPD | “NEW” BPD | NO BPD | <i>p</i> VALUE |
|---------------------------------------|---------------|-----------|--------|-------------------|
| MEDIAN NUMBER OF NEUTROPHILS** | 3.11 | 1.49 | 0.59 | <0.001* |

* Kruskal-Wallis non parametric test $p < 0.05$.

** median number of neutrophils per high-power field (400X).

The results of the immunohistochemical analysis for antibodies are summarized in Table 4.

Table 4 – Number of cells positive (median) for each antibody for the three groups.

| GROUPS/ANTIBODIES | “CLÁSSIC” BPD | “NEW” BPD | NO BPD | <i>p</i> VALUE |
|-------------------------------|---------------|-----------|--------|-----------------|
| CD20 | 1.50 | 2.12 | 1.25 | 0.9380 |
| CD45RO | 5.25 | 1.36 | 2.00 | 0.0004* |
| CD14 (ALVEOLAR SEPTUM) | 3.00 | 341.50 | 15.00 | 0.0523 |
| CD14 (ALVEOLAR SPACE) | 2.00 | 61.00 | 11.00 | 0.1380 |
| CD4 | 5.00 | 2.00 | 1.88 | 0.0160** |
| CD8 | 0.25 | 3.00 | 0.50 | 0.1700 |

Kruskal- Wallis non-parametric test $p < 0.05$.

* statistically significant difference between “classic” BPD and No BPD group and between “classic” BPD and “new” BPD.

** statistically significant difference between “classic” BPD and No BPD group.

There was no statistically significant difference between the groups in terms of CD20+ cell and CD8+T cell count. CD45RO+ T cell count was higher in the “classic” BPD than in the No BPD and the “new” BPD group, with a p value = 0.0004. CD14+ cell count was higher in alveolar septum and the alveolar space in the “new” BPD than in the “classic” BPD or No BPD group. For both these differences there was a trend towards statistical significance, as shown in Table 4. CD4+ T cell count was higher in the “classic” BPD than in the No BPD group, with a p value = 0.016.

DISCUSSION

The pathogenesis of BPD is complex and remains little understood despite the abundant literature published on the subject. The condition is the result of a combination of many factors that can damage lung tissue either by interfering with alveolar septation, leading to

a deficit in lung growth(21, 24). Here, we sought to investigate the inflammatory process in lung samples from PTN with “classic” or “new” BPD and compare these findings with those for PTN without any morphological and morphometrical signs of BPD, primarily by immunophenotypic characterization of leukocytes found in the lung tissue.

In this study, the group with “new” BPD could not be distinguished histologically from the No BPD group. However, morphometric analysis revealed statistically significant differences between these two groups, with a decrease in the number and size of alveoli in the “new” BPD group ($p = 0.033$ and 0.018 , respectively). Although the disease has not disappeared, the clinical, histopathological and morphometric patterns have changed with the emergence of the concept of underdeveloped distal airways. The histopathological findings for “new” BPD were recently described (44) and were also observed in our study.

The risk factors related to interruption of alveolar development most commonly reported in the literature are chorioamnionitis, persistence of a patent ductus arteriosus, sepsis and hypertensive disease of pregnancy. However, no statistically significant antenatal or postnatal risk factors were found in the present study (6).

The inflammatory response in the lung tissue of PTN receiving supplemental oxygen is characterized by an accumulation of neutrophils and macrophages, as well as the presence of several proinflammatory mediators and free radicals, which can result in damage to the lung alveoli. The imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory activity, and its intimate relationship with cellular apoptosis and proliferation, may affect alveolar formation and pulmonary vascular growth, leading eventually to pulmonary hypoplasia (19, 25).

Neutrophils can also produce recruiting factors for other leukocytes, such as interleukin-8 (IL8), as well as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), which is responsible for prolonging neutrophil survival by inhibiting the activation of the apoptotic cascade. Some authors have also shown that there is increased evidence of CD4+ and CD8+ T-lymphocyte involvement in the

mobilization and maintenance of neutrophils at the injury site, which can be a key factor (26-28), particularly in chronic lung diseases, bronchial hyper reactivity and bronchiectasis (29- 32).

Our findings show that the influx of neutrophils was higher in the “classic” BPD than in the No BPD and “new” BPD” groups ($p < 0.001$). Also, the number of CD4+ T lymphocytes was greater in the “classic” BPD than in the No BPD group ($p = 0.016$), corroborating the hypothesis that the inflammatory process is more intense in the “classic” form of BPD. The physiopathological relationship between the accumulation of neutrophils and the presence of CD4+ T lymphocytes has not been fully clarified to date. Nevertheless, there is some evidence that interleukin-17 (IL17) plays a significant role in the action orchestrated by these two types of leukocytes. Some authors have also demonstrated that IL-17 released by CD45RO+ T lymphocytes can activate T cells, which then act as mediators in the increased neutrophil recruitment and activation in the damaged tissues, especially lung tissue (33, 34). This was confirmed in studies in which azithromycin was used as an inhibitor of IL-17 secretion and a reduction in tissue damage was observed (35-37). In our study a greater CD45RO+ T-lymphocyte count was found in the “classic” BPD than in the “new” BPD and No BPD group ($p = 0.0004$). It was also followed by a high neutrophil count in the same group ($p < 0.001$), corroborating the hypothesis of an initial inflammatory process mediated by neutrophils and maintained by T lymphocytes in this form of BPD.

CD14 is a glycoprotein expressed on cells of the myelomonocytic lineage, including monocytes, macrophages and Langerhans cells. CD14 act as an opsonin receptor, to promote the release of proinflammatory cytokines, particularly when associated to toll-like receptors (TLR) (38). TLR4 expression seems to be closely related to CD14 receptor expression in the macrophage cell membrane. Some authors have studied the connection between CD14 and TLR4 in the cell membrane of macrophages, particularly in relation to cell death. These two receptors are believed, when connected, to share intracellular death domains (such as FADD) with molecules such as FAS, a cell death receptor located in the cell membranes of most cells. FAS is responsible, when activated

by FAS-L (present in NK cells), for triggering the caspase cascade, culminating in turn in programmed cell death (apoptosis). The intracellular domain of FAS is FADD, which is the same domain as that of CD14-TLR4, and FADD connected to CD14-TLR4 may activate FAS in the cytoplasm without the need for its intracellular connection with FAS-L (i.e., without the presence of NK cells). Furthermore, the CD14-TLR4 complex may activate an intracellular death domain known as MyD88, which in turn may activate the p65 cascade, culminating in the increased release of TNF- α and interleukin-1 β (IL1 β), two proteins involved in the apoptosis process (39). This seems to be the most likely explanation for the relationship between the inflammatory process and apoptosis, especially in relation to lung injury.

In our study the number of CD14+ cells found was greater in the “new” BPD than in the “classic” BPD or No BPD groups, particularly in alveolar septum, for which the results showed a trend towards a statistically significant difference ($p = 0.0523$). Some studies have shown that CD14 expression and Th1 proinflammatory cytokine release in peripheral blood were lower in PTN than in term neonates, while Th2 anti-inflammatory cytokine levels remained relatively unchanged (40, 41). These results contrast with the findings of other authors in relation to peripheral blood (38, 42). However, the PTN in the latter two studies were not affected by any form of BPD. In our study, BPD, especially “new” BPD, may have been the determining factor in the increase in the number of CD14+ cells in the alveolar septum. If this is indeed the case, it is reasonable to assume that the increased number of CD14+ cells may influence the increase in apoptotic cascade activity, which seems to be one of the main

causes of the reduced alveolar formation that occurs in “new” BPD. However, further immunohistochemical and molecular studies are needed to clarify this.

There are few studies correlating lymphocytes B with BPD (43), and no statistically significant differences in the number of CD20+ cells were found between the groups in our study.

CONCLUSIONS

Our findings seem to corroborate the hypothesis of an initial inflammatory process mediated by neutrophils and maintained by CD45RO+ and CD4+ T in “classic” BPD. They also appear to establish a connection between the inflammatory process mediated by CD14+ cells and apoptosis, especially in lung tissue with decreased alveolar volume found in the “new” form of BPD.

REFERENCES

- 1- Thompson A and Bhandari V. Pulmonary Biomarkers of Bronchopulmonary Dysplasia. *Biomark Insights* 2008 July 2:3: 361-373
- 2- Ryan RM, Ahmed Q and Lakshminrusimha S. Inflammatory Mediators in the Immunobiology of Bronchopulmonary Dysplasia. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008 Apr;34(2):174-90.
- 3- Northway WH Jr et al. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline-membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1967; 27:356-368.
- 4- Sankar MJ, Agarwal R, Deorari AK and Vinod KP. Chronic lung disease in newborns. *J Pediatr* 2008;75(4): 369-376
- 5- Bancalari e. BPD: old problem, new presentation. *J Pediatr* 2006; 82(1):2-3.
- 6- Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1723-29
- 7- Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA et al. Validação da Definição de Displasia Broncopulmonar do Consenso do Instituto Nacional de Saúde. *Pediatrics(ed brás)* Vol 10(6) 2006; 413-422
- 8- Walsh MC, Szeffler S, Davis J, Allen M, Van Marter L, Jobe A et al. Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group. *Pediatrics* 2006 Mar(117):pS52(5)

- 9- Rebello CM, Mascaretti RS. A nova displasia broncopulmonar. *Manual de atualizações em Neonatologia*. 1º ed. Rio de Janeiro. Editora Panamericana. 2004; pág 87 – 132.
- 10- Okamoto CT, Bahr JA ET al. Análises histopatológica e morfométrica no diagnóstico da “nova” displasia broncopulmonar e comparação clinicopatológica com a forma clássica da doença. *J Bras Patol Med Lab*; 2009 abr; 45(2): 147-152.
- 11- Tapia JL , Agost D, Alegria A, Staden J ,Escobar M, Grandi C et al. Bronchopulmonary dysplasia: incidence, risk factors and resource utilization in a population of South American very low birth weight infants. *J. Pediatr. (Rio de J)*. 2006; 82:15-20
- 12- Coalson JJ, Winter V, deLemos RA. Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:640-6
- 13- Coalson JJ, Winter VT, Siler- Khodr T and Yoder BA. Neonatal Chronic Lung Disease In Extremely Immature Baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1333- 1346.
- 14- Mascaretti RS et al. Preterm rabbits exposed to prolonged hyperoxia as a model for the study of bronchopulmonary dysplasia *Pediatr Res* 2003; 53:436A.
- 15- Bose CL, Dammann CEL and Laughon MM. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed* 2008; 93: 455-461
- 16- Bourbon J et al. Control mechanisms of lung Alveolar Development and their disorders in Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatr Res* 2005; 57:38R-46R.
- 17- Santos CC, Slutsky A. The contribution of biophysical lung injury to the development of biotrauma. *Annu Rev Physiol*. 2006; 68: 585-618
- 18- Santos CC, Zhang H, Liu M and Slutsky AS. Bench-to-bedside review: Biotrauma and modulation of the innate immune response. *Critical Care* 2005, 9(3): 280-286.
- 19- Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003; 8:29-38
- 20- Urlichs F, Speer CP. Neutrophil function in preterm and term infants. *Neo Rev* 2004; 5:417-29
- 21- Ballabh P, Simm M, Kumari J, Krauss AN, Jain A, Peter AM. Lymphocyte subpopulations in bronchopulmonary dysplasia. *Am J perinatol*. 2003;20(8):465-75
- 22- Willet KE et al. Antenatal Endotoxin and Glucocorticoid Effects on Lung Morphometry in Preterm Lambs. *Pediatr Res* 2000;48:782-788.
- 23- Kumar, B; De Silva, M; Venter, DJ; Armes, JE. Tissue microarrays: a practical guide. *Pathology*, 2004 Aug 36(4): 295-300
- 24- Ambalavanan N, Carlo WA et al. Cytokines associated with Bronchopulmonary Dysplasia or Death in Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics* 2009; 123:1132-1141
- 25- Speer CP. Inflammation and Bronchopulmonary Dysplasia: A continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2006 Oct;11(5):354-62
- 26- Lindén A, Laan M and Anderson GP. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J* 2005; 25:159-172
- 27- Lindén A. Interleukin-17 and airway remodeling. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2006;19:47-50
- 28- Schmidt-weber C, Akdis M and Akdis CA. Th17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:247-54.

- 29- Turato G, Zuin R and Saetta M. Pathogenesis and Pathology of COPD. *Respiration* 2001;68:117–128
- 30- Gaga M, Bentley AM et al. Increases in CD4+ T lymphocytes, macrophages, neutrophils and interleukin 8 positive cells in the airways of patients with bronchiectasis. *Thorax* 1998;53:685–691
- 31- [Bochner BS](#). Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Nov;106(5):817-28.
- 32- O'Byrne PM. Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness. *Chest* 1986;90:575-577.
- 33- Laan and Linén A. IL-17 as a potential target for modulating airway neutrophilia. *Curr Pharm Des* 2002;8(20):1855-61.
- 34- Laan M, Prause O ET al. A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF-alpha. *Eur Respir J*. 2003 Mar;21(3):387-93.
- 35- Ballard HO, Bernard P, Qualls J, Everson W and Shook LA. Azithromycin protects against hyperoxic lung injury in neonatal rats. *J Invest Med* 2007; 55(6): 299-305.
- 36- [Aghai ZH](#), [Kode A](#), [Saslow JG](#), [Nakhla T](#), [Farhath S](#), [Stahl GE](#), [Eydelman R](#), [Strande L](#), [Leone P](#), [Rahman I](#). Azithromycin suppresses activation of nuclear factor-kappa B and synthesis of pro-inflammatory cytokines in tracheal aspirate cells from premature infants. *Pediatr Res*. 2007 Oct;62(4):483-8.
- 37- Ballard HO, Anstead M and Shook LA. Azithromycin in the extremely low birth weight infant for the prevention of Bronchopulmonary Dysplasia: a pilot study. *Respir Res*. 2007 Jun 5;8:41.
- 38- Bessler H, Komlos L, Punskey I et al. CD14 Receptor Expression and Lipopolysaccharide-induced Cytokine Production in Preterm and Term Neonates. *Biol Neonate* 2001;80:186-192
- 39- Pedreira PR, Garcia-Prieto E, Albaiceta GM and Taboada F. Respuesta inflamatoria y apoptosis em La lesion pulmonar aguda. *Med intensiva* 2006; 30:268-275
- 40- Levy O. Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *Journal of Endotoxin Research* 2005;11(2):113-116.
- 41- Henneke P, Osmers I Bauer K et al. Impaired CD14-dependent and independent response of polymorphonuclear leukocytes in preterm infants. *J Perinat Med* 2003;31(2):176-183
- 42- Forster-Waldi E, Sadeghi K, Tamandl D et al. Monocyte Toll-Like Receptor 4 Expression and LPS-Induced Cytokine Production Increase during Gestational Aging. *Pediatr Res* 2005; 58:121-124.
- 43- Chávez-Galán L, Arenas-Del A, Zenteno E, Chávez R and Lascurain R. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cellular and Molecular Immunology*. 2009;6(1):15-25.
- 44 - Bland RD et al. Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: potential benefits of retinol treatment. *Biol Neonate*2003;84(1):101-2

5- TERCEIRO ARTIGO (ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO-PEDIATRIC RESEARCH)

**THE ROLE OF INFLAMMATORY ADHESION MOLECULES AND NK CELLS IN
BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA: A IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 16
CASES**

THE ROLE OF INFLAMMATORY RESPONSE IN BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF 16 CASES

Cristina Terumy Okamoto¹, Ana Paula Persicote², Luca Rodrigo Pasqualotto³, Gabriela Traiano³,
Tammy Almeida⁴, Lúcia de Noronha⁵

EXPERIMENTAL PATHOLOGY LABORATORY
CENTER FOR HEALTH AND BIOLOGICAL SCIENCES
PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF PARANÁ (PUCPR)

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE CURITIBA
PATHOLOGICAL ANATOMY DEPARTMENT
FEDERAL UNIVERSITY OF PARANÁ (UFPR)

- 1 – Neonatologist, Doctoral Student at the Center for Health and Biological Sciences (PUCPR)
- 2 – Pathologist, Masters Student at the Department of Pathological Anatomy (UFPR)
- 3 – Undergraduate Medical Student (PUCPR)
- 4 – Undergraduate Medical Student (UFPR)
- 5 – Pediatric Pathologist at the Department of Pathological Anatomy (UFPR) and the Center for Health and Biological Sciences (PUCPR), MD, MSc, PhD

Corresponding author:

Dr. Cristina Okamoto

Rua João Pontoni 98 ap 82

Cristo Rei

CEP 80050-490

Curitiba

PR

BRAZIL

Phone.: (00 55 41) 3077-0352

Fax: (00 55 41) 3077-2446

e-mail: crstoka@livemail.com.br

Keywords:

Bronchopulmonary dysplasia, premature newborn, Immunophenotyping, inflammatory process and apoptosis.

Abbreviations:

BPD: Bronchopulmonary dysplasia

TMA: tissue microarrays

GA: gestational age

TNF- α : tumor necrosis factor-alpha

IL-17: interleukin 17

PTN; premature newborn

The authors have indicated they have no financial relationships relevant to this article to disclose.

ABSTRACT

Introduction: Bronchopulmonary dysplasia's (BPD) physiopathology mechanisms studied are inflammatory process(Classic BPD) and/or arrest of lung growth (new BPD).

Objectives: Immunophenotypic characterization of inflammatory infiltrate in the lungs of with less than 34 weeks GA who developed "classic" or "new" BPD.

Methods: 53 lung samples from dead premature newborns with less than 34 weeks GA submitted to oxygen therapy. The samples were separated into 3 groups according with the histopathological and morphometrical findings and duration of oxygen therapy : 1 – with "classic" BPD, 2A – with "new" BPD and 2B – without "classic" or "new" BPD (No BPD group). Immunohistochemical analysis was performed with anti-CD14, anti-CD45RO, anti-CD20, anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. Neutrophil count was measured.

Results: Morphometric analysis revealed statistically significant differences between groups 2A and 2B. Neutrophil count and CD45RO+ T cell was higher in the "classic" BPD group than in the other groups ($p < 0,001$ and $p < 0.0004$ respectively). CD4+ T cell count was statistically higher in the "classic" BPD group than in the No BPD group ($p = 0.016$) and CD14+ cell count was higher in the "new" BPD group than in the "classic" BPD group ($p = 0.052$).

Conclusion: Our findings seem to corroborate the hypothesis that the initial inflammatory process is mediated by neutrophils and sustained by CD45RO+ and CD4+ T lymphocytes in the "classic" BPD form. The findings also establish a connection between CD14+ cells and the inflammatory process and apoptosis, especially in lung injury with decreased alveolar volume observed in "new" BPD.

INTRODUCTION

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a chronic pulmonary disorder and one of the main causes of morbidity that affects premature newborns(PTN) (1, 2, 3). The classic presentation of this disorder was described, in 1960, as presence of hyaline membrane disease, high inspired of oxygen concentrations, aggressive mechanical ventilation and characteristic radiological changes. The classic histological findings of BPD are hyaline

membrane disease, emphysema, atelectasis, fibrosis, squamous metaplasia and smooth muscle hypertrophy in the airways and pulmonary vasculature (4).

With the use of antenatal corticosteroid therapy, exogenous surfactant and technological advances in mechanical ventilation, there has been a significant increase in the survival rates of very PTN, particularly those under 1500 g. However, the incidence of BPD has not changed as expected (4, 5). Rather, a “new” modality of BPD has emerged, in which very low birth-weight PTN (<1500g) with less than 30 weeks gestational age(GA) and extremely immature lungs who require mechanical ventilation and/or oxygen therapy for a shorter period immediately after birth because of mild to moderate respiratory insufficiency (4), but still need supplemental oxygen at more than 28 days after birth (3), even when they do not show the radiological, anatomical and pathological alterations typical of “classic” BPD. In 2001, a consensus meeting suggested that the clinical criteria for the diagnosis of BPD in a PTN should be dependency on respiratory support at 28 days of postnatal life or 36 weeks postmenstrual age (6, 7, 8).

The most common pathological alterations in the “New BPD” are decreased alveolar septation and abnormal pulmonary vascular development compatible with arrested pulmonary growth and/or a decreased number of alveoli and reduced alveolar surface area, as well as non-uniform inflation in distal airways (5, 9, 10). Little or no septal fibrosis and almost no inflammatory reaction or interstitial edema is observed. The alterations in alveolar formation can be very subtle and not detectable on routine morphological tests. Therefore, the changes characteristic of “new” BPD can be related more to morphometric data than to morphological aspects (11, 12, 13). Morphometry, including alveolar count and measurement of alveolar size, has been used as a diagnostic criterion for this form of the disease (5, 9, 10, 14).

Over the last 10 years, the physiopathological basis of BPD has been mainly associated with two processes: inflammation and arrest of pulmonary growth (2, 4, 5). The lung inflammatory process in BPD is exacerbated by mechanical ventilation and exposure to supplemental oxygen. Several studies seem to indicate that the type of cell that prevails in the earliest stages of BPD is the neutrophil, followed by an abundance of macrophages and other inflammatory cells (15), with an increased influx of inflammatory cells, increased pulmonary vascular permeability and damage to or apoptosis of endothelial and epithelial cells (16, 17, 18).

Other authors believe this inflammatory process precedes and perpetuates the arrest of lung growth through the several activation pathways common to both processes. Nevertheless, little is known about the connection between these two processes (2).

The aims of the present study were (a) to investigate the subtypes of inflammatory cells that contribute to BPD using lung samples from autopsies of PTN with less than 34 weeks GA; and (b) to correlate the findings with clinical and pathological types of BPD (“classic” or “new”) and compare them with the findings for PTN without BPD (No BPD).

MATERIALS AND METHODS

The sample consisted of lung specimens from autopsies of PTN between 1994 and 2005, from the archives in the Department of Pathological Anatomy, Federal University of Paraná. Inclusion criteria were: complete autopsy; no congenital malformations; 34 weeks or less of GA and at least 2 hours of mechanical ventilation and/or oxygen therapy. The study population consisted of 53 PTN lung samples. The medical records were analyzed to collect data related to gender, gestational age, maternal age, weight at birth and duration of oxygen therapy, as well as other risk factors for BPD (type of delivery birth, APGAR score, prenatal care and pregnancy diseases, such as hypertensive diseases of pregnancy, chorioamnionitis or gestational diabetes). Samples unsuitable for testing, with meconium aspiration or insufficient tissue for immunohistochemical analysis or medical records not available or not found were excluded.

All the slides of the 53 patients were stained with hematoxylin-eosin and divided into two groups: 1- with histopathological alterations of “classic” BPD (n = 11) and 2- without histopathological alterations of “classic” BPD (n = 42). The 42 cases without “classic” BPD were divided into two groups according to the duration of oxygen therapy: 2A – oxygen administered for more than seven

days (new BPD, n=5) and 2B – oxygen administered for less than seven days (without BPD, n=37). The samples in groups 2A and 2B were then analyzed morphometrically to confirm the existence of morphometrical alterations characteristic of “new” BPD in the group 2A (6, 7, 8).

Digital images of 10 non-adjacent fields (200x) in slides of pulmonary parenchymal tissue from the 42 cases without “classic” BPD were captured using Image Pro Plus® software. It measures alveolar perimeter and area in micrometers and the number of alveoli per field using the Line Morphometry application (22). All the alveoli in each of the 10 digitalized fields in the 20X object glass were measured. The means and standard deviations for each case were calculated. This analysis was performed by only one observer, who had no prior knowledge of the oxygen therapy data. Neutrophil count was determined using the same hematoxylin-eosin stained slides.

Neutrophil count was measured by scanning all the high power fields (400x) for each of the four samples for each case using a Olympus BX50 microscope. An average of 20 high-power fields was counted.

According to this morphometric analysis, group 2A had the characteristics of “new” BPD (Table 1). Thus, the study population was classified as follows: group 1 (“classic” BPD; duration of oxygen therapy not taken into account; n = 11); group 2A (“new” BPD; oxygen therapy for more than seven days; n = 5) and group 2B (No BPD; without “classic” or “new” BPD; oxygen therapy for less than seven days; n = 37).

The paraffin blocks of the study cases (n=53) were used to construct tissue microarrays (TMAs) (23). Lung samples from all the patients were inserted in multi-sample paraffin blocks (TMAs) containing samples from 5 to 6 patients each (4 samples for each patient). Sections from the TMA blocks were cut for immunohistochemical analysis (immunoperoxidase staining).

The protocol for the immunoperoxidase assay was standardized with positive and negative controls. All the cases were tested with the following antibodies: anti-CD14 (clone 7, isotype IgG2a, mouse monoclonal, Novocastra^R); anti-CD45RO (clone UCHL, isotype IgG2-kappa, mouse monoclonal, Dako^R); anti-CD20 (clone IF5; isotype L26, mouse monoclonal, Dako^R); anti-CD4 (clone 4B12, isotype IgG1, kappa 1, mouse monoclonal, Novocastra^R); anti-CD8 (clone 1A5, isotype IgG1, mouse monoclonal, Novocastra^R).

The staining was interpreted as follows: for the anti-CD4, CD8, CD14, CD20 and CD45RO antibodies, the numbers of positive cells in four random high-power fields (400x) were counted for each of the four samples for each case. Cells that had a characteristic membrane staining pattern when observed under an Olympus BX50 microscope and were located in the alveolar septum or intra-alveolar space were considered positive. Cells in the intravascular space or in regions that normally contain peribronchial lymphoid aggregates were disregarded. For the anti-CD14 antibody only mononuclear cells (monocytes/histiocytes) were counted. Polymorphonuclear neutrophils with CD14 expression were ignored, and positive cells located in the interstitial space (alveolar septum) or the intra-alveolar space was counted separately.

The data were analyzed using the Mann-Whitney, ANCOVA, Levene, Bonferroni, Kruskal-Wallis, Spearman and Shapiro-Wilks tests. *p* values <0.05 indicated statistical significance.

RESULTS

In the histopathological analysis of the “classic” BPD group (n=11), the morphological characteristics were observed during the acute and chronic stage of the disease, previously described by the literature. Cases without the pathological characteristics of “classic” BPD (2A and 2B, n = 42) had minimal histopathological changes, so no histopathological distinction could be made between the groups. The samples were therefore analyzed morphometrically, and this revealed differences statistically significant between these two groups (see Table 1). Group 2A, with “new” BPD, had fewer and smaller alveoli than the samples in group 2B, No BPD.

Table 1 – Median number of alveoli and alveolar area and perimeter (in micrometers) in the No BPD and “new” BPD groups.

| | “NEW” BPD (N=5) | NO BPD (N=37) | <i>p</i> VALUE |
|--------------------------|--------------------|------------------|----------------|
| NUMBER OF ALVEOLI | 40.94 | 57.65 | 0.033** |
| AREA | 14549.67 | 19083.02 | 0.054* |
| PERIMETER | 481.52 | 611.33 | 0.018* |

*Ancova (gestational age adjustment) $p < 0.05$.

**Mann-Whitney non-parametric test $p < 0.05$.

Coincidentally, the “classic” BPD group had received oxygen therapy for the longest (at least 15 days and an average of 23 days). The cases in 2A had received supplemental oxygen for more than 7 days and average of 10.4 days. And group 2B had been on oxygen for less than 7 days and average was 43.87 hours.

Table 2 shows the epidemiological profile of the study sample and gives gender, gestational age, maternal age and birth weight.

Table 2 – Gestational age, maternal age, birth weight and gender for the three groups:

| | CLASSIC BPD (N=11) | “NEW” BPD (N=5) | NO BPD (N=37) | <i>p</i> VALUE |
|------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| GESTATIONAL AGE | 29.05 | 32.10 | 28.61 | 0.050 |
| BIRTH WEIGHT | 1021.36 | 1340.00 | 927.14 | 0.044* |
| GENDER(male %) | 45.45%(5) | 20%(1) | 32.44%(12) | 0.100 |
| MATERNAL AGE | 26.18 | 29.75 | 23.89 | 0.282 |

*Kruskal-Wallis non-parametric test $p < 0.05$.

No statistically significant differences between the groups were observed for the other risk factors investigated (type of delivery birth, APGAR score, prenatal care and diseases during pregnancy).

Neutrophil influx was much higher in the “classic” BPD than in the “new” BPD or No BPD group (Table 3); this difference was statistically significant ($p < 0.001$).

Table 3 – Neutrophil count for each of the three groups.

| | “CLASSIC” BPD | “NEW” BPD | NO BPD | p VALUE |
|---------------------------------------|----------------------|------------------|---------------|-------------------|
| MEDIAN NUMBER OF NEUTROPHILS** | 3.11 | 1.49 | 0.59 | <0.001* |

* Kruskal-Wallis non parametric test $p < 0.05$.

** median number of neutrophils per high-power field (400X).

The results of the immunohistochemical analysis for antibodies are summarized in Table 4.

Table 4 – Number of cells positive (median) for each antibody for the three groups.

| GROUPS/ANTIBODIES | “CLASSIC” BPD | “NEW” BPD | NO BPD | p VALUE |
|-------------------------------|----------------------|------------------|---------------|-----------------|
| CD20 | 1.50 | 2.12 | 1.25 | 0.9380 |
| CD45RO | 5.25 | 1.36 | 2.00 | 0.0004* |
| CD14 (ALVEOLAR SEPTUM) | 3.00 | 341.50 | 15.00 | 0.0523 |
| CD14 (ALVEOLAR SPACE) | 2.00 | 61.00 | 11.00 | 0.1380 |
| CD4 | 5.00 | 2.00 | 1.88 | 0.0160** |
| CD8 | 0.25 | 3.00 | 0.50 | 0.1700 |

Kruskal- Wallis non-parametric test $p < 0.05$.

* statistically significant difference between “classic” BPD and No BPD group and between “classic” BPD and “new” BPD.

** statistically significant difference between “classic” BPD and No BPD group.

There was no statistically significant difference between the groups in terms of CD20+ cell and CD8+T cell count. CD45RO+ T cell count was higher in the “classic” BPD than in the No BPD and the “new” BPD group, with a p value = 0.0004. CD14+ cell count was higher in alveolar septum and the alveolar space in the “new” BPD than in the “classic” BPD or No BPD group. For both these differences there was a trend towards statistical significance, as shown in Table 4. CD4+ T cell count was higher in the “classic” BPD than in the No BPD group, with a p value = 0.016.

DISCUSSION

The pathogenesis of BPD is complex and remains little understood despite the abundant literature published on the subject. The condition is the result of a combination of many factors that can damage lung tissue either by interfering with alveolar septation, leading to a deficit in lung growth(21, 24). Here, we sought to investigate the inflammatory process in lung samples from PTN with “classic” or “new” BPD and compare these findings with those for PTN without any morphological and morphometrical signs of BPD, primarily by immunophenotypic characterization of leukocytes found in the lung tissue.

In this study, the group with “new” BPD could not be distinguished histologically from the No BPD group. However, morphometric analysis revealed statistically significant differences between these two groups, with a decrease in the number and size of alveoli in the “new” BPD group ($p = 0.033$ and 0.018 , respectively). Although the disease has not disappeared, the clinical, histopathological and morphometric patterns have changed with the emergence of the concept of underdeveloped distal airways. The histopathological findings for “new” BPD were recently described(44) and were also observed in our study.

The risk factors related to interruption of alveolar development most commonly reported in the literature are chorioamnionitis, persistence of a patent ductus arteriosus, sepsis and hypertensive disease of pregnancy. However, no statistically significant antenatal or postnatal risk factors were found in the present study (6).

The inflammatory response in the lung tissue of PTN receiving supplemental oxygen is characterized by an accumulation of neutrophils and macrophages, as well as the presence of several proinflammatory mediators and free radicals, which can result in damage to the lung alveoli. The imbalance between proinflammatory and anti-inflammatory activity, and its intimate relationship with cellular apoptosis and proliferation, may affect alveolar formation and pulmonary vascular growth, leading eventually to pulmonary hypoplasia (19, 25).

Neutrophils can also produce recruiting factors for other leukocytes, such as interleukin-8 (IL8), as well as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), which is responsible for prolonging neutrophil survival by inhibiting the activation of the apoptotic cascade. Some authors have also shown that there is increased evidence of CD4+ and CD8+ T-lymphocyte involvement in the mobilization and maintenance of neutrophils at the injury site, which can be a key factor (26-28), particularly in chronic lung diseases, bronchial hyper reactivity and bronchiectasis (29- 32).

Our findings show that the influx of neutrophils was higher in the “classic” BPD than in the No BPD and “new” BPD” groups ($p < 0.001$). Also, the number of CD4+ T lymphocytes was

greater in the “classic” BPD than in the No BPD group ($p = 0.016$), corroborating the hypothesis that the inflammatory process is more intense in the “classic” form of BPD. The physiopathological relationship between the accumulation of neutrophils and the presence of CD4+ T lymphocytes has not been fully clarified to date. Nevertheless, there is some evidence that interleukin-17 (IL17) plays a significant role in the action orchestrated by these two types of leukocytes. Some authors have also demonstrated that IL-17 released by CD45RO+ T lymphocytes can activate T cells, which then act as mediators in the increased neutrophil recruitment and activation in the damaged tissues, especially lung tissue (33, 34). This was confirmed in studies in which azithromycin was used as an inhibitor of IL-17 secretion and a reduction in tissue damage was observed (35-37). In our study a greater CD45RO+ T-lymphocyte count was found in the “classic” BPD than in the “new” BPD and No BPD group ($p = 0.0004$). It was also followed by a high neutrophil count in the same group ($p < 0.001$), corroborating the hypothesis of an initial inflammatory process mediated by neutrophils and maintained by T lymphocytes in this form of BPD.

CD14 is a glycoprotein expressed on cells of the myelomonocytic lineage, including monocytes, macrophages and Langerhans cells. CD14 act as an opsonin receptor, to promote the release of proinflammatory cytokines, particularly when associated to toll-like receptors (TLR) (38). TLR4 expression seems to be closely related to CD14 receptor expression in the macrophage cell membrane. Some authors have studied the connection between CD14 and TLR4 in the cell membrane of macrophages, particularly in relation to cell death. These two receptors are believed, when connected, to share intracellular death domains (such as FADD) with molecules such as FAS, a cell death receptor located in the cell membranes of most cells. FAS is responsible, when activated by FAS-L (present in NK cells), for triggering the caspase cascade, culminating in turn in programmed cell death (apoptosis). The intracellular domain of FAS is FADD, which is the same domain as that of CD14-TLR4, and FADD connected to CD14-TLR4 may activate FAS in the cytoplasm without the need for its

intracellular connection with FAS-L (i.e., without the presence of NK cells). Furthermore, the CD14-TLR4 complex may activate an intracellular death domain known as MyD88, which in turn may activate the p65 cascade, culminating in the increased release of TNF- α and interleukin-1 β (IL1 β), two proteins involved in the apoptosis process (39). This seems to be the most likely explanation for the relationship between the inflammatory process and apoptosis, especially in relation to lung injury.

In our study the number of CD14+ cells found was greater in the “new” BPD than in the “classic” BPD or No BPD groups, particularly in alveolar septum, for which the results showed a trend towards a statistically significant difference ($p = 0.0523$). Some studies have shown that CD14 expression and Th1 proinflammatory cytokine release in peripheral blood were lower in PTN than in term neonates, while Th2 anti-inflammatory cytokine levels remained relatively unchanged (40, 41). These results contrast with the findings of other authors in relation to peripheral blood (38, 42). However, the PTN in the latter two studies were not affected by any form of BPD. In our study, BPD, especially “new” BPD, may have been the determining factor in the increase in the number of CD14+ cells in the alveolar septum. If this is indeed the case, it is reasonable to assume that the increased number of CD14+ cells may influence the increase in apoptotic cascade activity, which seems to be one of the main causes of the reduced alveolar formation that occurs in “new” BPD. However, further immunohistochemical and molecular studies are needed to clarify this.

There are few studies correlating lymphocytes B with BPD (43), and no statistically significant differences in the number of CD20+ cells were found between the groups in our study.

CONCLUSIONS

Our findings seem to corroborate the hypothesis of an initial inflammatory process mediated by neutrophils and maintained by CD45RO+ and CD4+ T in “classic” BPD. They also appear to establish a connection between the inflammatory process mediated by CD14+ cells and apoptosis, especially in lung tissue with decreased alveolar volume found in the “new” form of BPD.

REFERENCES

- 1- Thompson A and Bhandari V. Pulmonary Biomarkers of Bronchopulmonary Dysplasia. *Biomark Insights* 2008 July 2:3: 361-373
- 2- Ryan RM, Ahmed Q and Lakshminrusimha S. Inflammatory Mediators in the Immunobiology of Bronchopulmonary Dysplasia. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008 Apr;34(2):174-90.
- 3- Northway WH Jr et al. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline-membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1967; 27:356-368.
- 4- Sankar MJ, Agarwal R, Deorari AK and Vinod KP. Chronic lung disease in newborns. *J Pediatr* 2008;75(4): 369-376
- 5- Bancalari e. BPD: old problem, new presentation. *J Pediatr* 2006; 82(1):2-3.
- 6- Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1723-29
- 7- Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA et al. Validação da Definição de Displasia Broncopulmonar do Consenso do Instituto Nacional de Saúde. *Pediatrics(ed brás)* Vol 10(6) 2006; 413-422
- 8- Walsh MC, Szeffler S, Davis J, Allen M, Van Marter L, Jobe A et al. Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group. *Pediatrics* 2006 Mar(117):pS52(5)
- 9- Rebello CM, Mascaretti RS. A nova displasia broncopulmonar. *Manual de atualizações em Neonatologia. 1º ed. Rio de Janeiro. Editora Panamericana. 2004; pág 87 – 132.*
- 10- Okamoto CT, Bahr JA ET al. Análises histopatológica e morfométrica no diagnóstico da “nova” displasia broncopulmonar e comparação clinicopatológica com a forma clássica da doença. *J Bras Patol Med Lab; 2009 abr; 45(2): 147-152.*
- 11- Tapia JL , Agost D, Alegria A, Staden J , Escobar M, Grandi C et al. Bronchopulmonary dysplasia: incidence, risk factors and resource utilization in a population of South American very low birth weight infants. *J. Pediatr. (Rio de J).* 2006: 82;15-20
- 12- Coalson JJ, Winter V, deLemos RA. Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:640-6
- 13- Coalson JJ, Winter VT, Siler- Khodr T and Yoder BA. Neonatal Chronic Lung Disease In Extremely Immature Baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1333- 1346.

- 14- Mascaretti RS et al. Preterm rabbits exposed to prolonged hyperoxia as a model for the study of bronchopulmonary dysplasia *Pediatr Res* 2003; 53:436A.
- 15- Bose CL, Dammann CEL and Laughon MM. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed* 2008; 93: 455-461
- 16- Bourbon J et al. Control mechanisms of lung Alveolar Development and their disorders in Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatr Res* 2005; 57:38R-46R.
- 17- Santos CC, Slutsky A. The contribution of biophysical lung injury to the development of biotrauma. *Annu Rev Physiol.* 2006; 68: 585-618
- 18- Santos CC, Zhang H, Liu M and Slutsky AS. Bench-to-bedside review: Biotrauma and modulation of the innate immune response. *Critical Care* 2005, 9(3): 280-286.
- 19- Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003; 8:29-38
- 20- Urlichs F, Speer CP. Neutrophil function in preterm and term infants. *Neo Rev* 2004; 5:417-29
- 21- Ballabh P, Simm M, Kumari J, Krauss AN, Jain A, Peter AM. Lymphocyte subpopulations in bronchopulmonary dysplasia. *Am J perinatol.*2003;20(8):465-75
- 22- Willet KE et al. Antenatal Endotoxin and Glucocorticoid Effects on Lung Morphometry in Preterm Lambs. *Pediatr Res* 2000;48:782-788.
- 23- Kumar, B; De Silva, M; Venter, DJ; Armes, JE. Tissue microarrays: a practical guide. *Pathology*,2004 Aug 36(4): 295-300
- 24- Ambalavanan N, Carlo WA et al. Cytokines associated with Bronchopulmonary Dysplasia or Death in Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics* 2009; 123:1132-1141
- 25- Speer CP. Inflammation and Bronchopulmonary Dysplasia: A continuing story. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006 Oct;11(5):354-62
- 26- Lindén A, Laan M and Anderson GP. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J* 2005; 25:159-172
- 27- Lindén A. Interleukin-17 and airway remodeling. *Pulmonary Pharmacologyband Therapeutics* 2006;19:47-50
- 28- Schmidt-weber C, Akdis M and Akdis CA. Th17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:247-54.
- 29- Turato G, Zuin R and Saetta M. Pathogenesis and Pathology of COPD. *Respiration* 2001;68:117–128
- 30- Gaga M, Bentley AM et al. Increases in CD4+ T lymphocytes, macrophages, neutrophils and interleukin 8 positive cells in the airways of patients with bronchiectasis. *Thorax* 1998;53:685–691
- 31- [Bochner BS](#). Road signs guiding leukocytes along the inflammation superhighway. [J Allergy Clin Immunol.](#) 2000 Nov;106(5):817-28.
- 32- O'Byrne PM. Airway Inflammation and Airway Hyperresponsiveness. *Chest* 1986;90:575-577.
- 33- Laan and Linén A. IL-17 as a potential target for modulating airway neutrophilia. *Curr Pharm Des* 2002;8(20):1855-61.

- 34- Laan M, Prause O ET al. A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF-alpha. *Eur Respir J*. 2003 Mar;21(3):387-93.
- 35-Ballard HO, Bernard P, Qualls J, Everson W and Shook LA. Azithromycin protects against hyperoxic lung injury in neonatal rats. *J Invest Med* 2007; 55(6): 299-305.
- 36- [Aghai ZH](#), [Kode A](#), [Saslow JG](#), [Nakhla T](#), [Farhath S](#), [Stahl GE](#), [Eydelman R](#), [Strande L](#), [Leone P](#), [Rahman I](#). Azithromycin suppresses activation of nuclear factor-kappa B and synthesis of pro-inflammatory cytokines in tracheal aspirate cells from premature infants. *Pediatr Res*. 2007 Oct;62(4):483-8.
- 37- Ballard HO, Anstead M and Shook LA. Azithromycin in the extremely low birth weight infant for the prevention of Bronchopulmonary Dysplasia: a pilot study. *Respir Res*. 2007 Jun 5;8:41.
- 38- Bessler H, Komlos L, Punskey I et al. CD14 Receptor Expression and Lipopolysaccharide-induced Cytokine Production in Preterm and Term Neonates. *Biol Neonate* 2001;80:186-192
- 39- Pedreira PR, Garcia-Prieto E, Albaiceta GM and Taboada F. Respuesta inflamatoria y apoptosis em La lesion pulmonar aguda. *Med intensiva* 2006; 30:268-275
- 40- Levy O. Innate immunity of the human newborn: distinct cytokine responses to LPS and other Toll-like receptor agonists. *Journal of Endotoxin Research* 2005;11(2):113-116.
- 41- Henneke P, Osmers I Bauer K et al. Impaired CD14-dependent and independent response of polymorphonuclear leukocytes in preterm infants. *J Perinat Med* 2003;31(2):176-183
- 42- Forster-Waldi E, Sadeghi K, Tamandl D et al. Monocyte Toll-Like Receptor 4 Expression and LPS-Induced Cytokine Production Increase during Gestational Aging. *Pediatr Res* 2005; 58:121-124.
- 43- Chávez-Galán L, Arenas-Del A, Zenteno E, Chávez R and Lascurain R. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cellular and Molecular Immunology*. 2009;6(1):15-25.
- 44 - Bland RD et al. Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: potential benefits of retinol treatment. *Biol Neonate*2003;84(1):101-2

6- CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

- 1) As formas de DBP, “nova” e “clássica”, são distintas entre si. Estas diferenças anatomopatológicas foram identificadas neste estudo.
- 2) A alteração anatomopatológica da “nova” DBP naqueles casos que utilizaram suplementação de oxigênio e ventilação mecânica por mais de 7 e menos de 14 dias, detectada pela análise morfométrica dos pulmões, foi representada pelo menor número de alvéolos, menor área e perímetro alveolar. O período de 7 a 14 dias de oxigenioterapia, onde se encontram os casos com histopatologia de “nova” DBP coincide com o conceito clínico de DBP “em evolução” definido pelo *National Institute of Health*. Diante disso, podemos concluir que os recém-nascidos prematuros deste estudo, que apresentam diagnóstico histomorfométrico de “nova” DBP, apresentam também, do ponto de vista clínico, o diagnóstico de DBP “em evolução”.
- 3) Neste estudo, quando correlacionamos os dados clínicos com os dados anatomopatológicos, observamos que apenas o fato de ser prematuro e utilizar oxigênio por mais de sete dias são fatores de risco na gênese da “nova” DBP. Além disso, a doença hipertensiva específica da gravidez apresentou tendência estatística para influenciar a gênese da “nova” DBP, talvez por influenciar na diminuição da angiogênese pulmonar, e assim levar à interrupção do desenvolvimento pulmonar e ao surgimento da doença.
- 4) Em nosso estudo observamos um maior número de linfócitos, CD45RO+, CD4+, além uma forte tendência estatística a um maior número de células CD74+, ambos no grupo da DBP “clássica”,

provavelmente relacionadas à exacerbação e manutenção do processo inflamatório relacionado com a fisiopatogenia desta forma de DBP. Nossos achados imunoistoquímicos parecem corroborar a hipótese de processo inflamatório inicial mediado por neutrófilos e sustentado pelos linfócitos CD45+ e CD4+ e pelas células CD74+, na forma “clássica” da DBP. Encontramos também uma maior quantidade de células CD57+ (NK), CD14+ e de linfócitos CD25+ na forma “nova” de DBP, provavelmente relacionadas ao fenótipo de parada de desenvolvimento/apoptose e de mínima reação inflamatória encontrada nesta forma de DBP. Nossos achados parecem estabelecer uma conexão entre o processo inflamatório mediado por células CD14+ e CD57+ (NK) e a apoptose, especialmente no que concerne a lesão pulmonar do tipo hipoalveolização que aparece na forma “nova” da DBP. Observamos ainda uma maior expressão do ICAM-1 no grupo da “nova” DBP, o qual poderia ser encarado como um marcador precoce de DBP.

As medidas preconizadas para a DBP “em evolução” são apenas preventivas, porém as alterações anatomopatológicas já estão presentes como observamos no grupo da “nova” DBP deste estudo. Diante disto, a instituição precoce de medidas terapêuticas, na tentativa de minimizar as alterações descritas na “nova” DBP, estaria justificada pelo aparecimento também precoce das alterações anatomopatológicas, fato este já descrito por diversos autores e corroborado por este trabalho.

Além disso, as alterações imunoistoquímicas encontradas neste estudo, representadas pelas contagens diferenciais de células NK, linfócitos TCD25+ e macrófagos aumentadas no grupo da “nova” DBP, podem ajudar a elucidar os mecanismos fisiopatogênicos desta forma de DBP, como também podem servir de marcadores moleculares para implementar melhorias no diagnóstico precoce e no tratamento desta doença.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO DA TESE

- 1-Northway WH, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Méd.* 1967; 276:357-68.
- 2- Monte LF, Silva filho LV, Miyoshi MH, Rozov T. Displasia broncopulmonar. *J Pediatr (Rio de J)* 2005 ;mar 81(2) 45-82
- 3-Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, Papille LA, Stoll BJ, et al. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, January 1995 through December 1996. *Pediatrics* 2001;107:E1
- 4- Bhandari A and Bandhari V. Pitfalls, problems and progress in Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatrics* 2009;123:1562-1573.
- 5- Ryan RM, Ahmed Q and Lakshminrusimha S. Inflammatory Mediators in the Immunobiology of Bronchopulmonary Dysplasia. *Clin Ver Allerg Immunol* 2008 Apr;34(2):174-90.
- 6- Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1723-29
- 7- Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia: old problem, new presentation. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82(1) :2-3
- 8--Tapia JL , Agost D, Alegria A, Staden J ,Escobar M, Grandi C et al. Bronchopulmonary dysplasia: incidence, risk factors and resource utilization in a population of South American very low birth weight infants. *J. Pediatr. (Rio de J).* 2006; 82:15-20
- 9- Ehrenkranz RA, Walsh MC, Vohr BR, Jobe AH, Wright LL, Fanaroff AA et al. Validação da Definição de Displasia Broncopulmonar do Consenso do Instituto Nacional de Saúde. *Pediatrics*(ed brás) Vol 10(6) 2006; 413-422
- 10-- Charafeddine L, D'Angio CT, Phelps DL. Atypical chronic lung disease patterns in neonates. *Pediatrics* 1999;103:759-765.
- 11- Jobe AH. The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res* 1999;66:641-643.
- 12- Bancalari E, Claire N and Sosenko IRS. Bronchopulmonary Dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Seminars in Neonatology* 2003;8: 63-71.
- 13- Walsh MC, Wilson-Costello D et al. Safety, Reliability and validity of a physiologic definition of Bronchopulmonary Dysplasia. *Journal of Perinatology* 2003; 23: 451-456.
- 14- Bancalari E and Claire N. Definitions and diagnostic criteria for Bronchopulmonary Dysplasia. *Semin Perinatol* 2006; 30:164-170.
- 15-Walsh MC, Yao Q et al. Impact of a physiologic definition on Bronchopulmonary Dysplasia rates. *Pediatrics* 2004; 114: 1305-1311.
- 16- Walsh MC, Szeffler S, Davis J, Allen M, Van Marter L, Jobe A et al. Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group. *Pediatrics* 2006 Mar(117):pS52(5).
- 17- Travis WD, Colby TV, Koss MN, Christenson MR, Muller NL, King TE. Atlas of non tumor pathology. Non –neoplastic disorders of the lower respiratory tract. first series Fascicle 2. 2002. Ed AF/P-Washington DC. Chapter 11 pages 507-38.
- 18- Rebello CM, Mascaretti RS. A “nova” displasia broncopulmonar. *Manual da Atualização em Neonatologia 1ªed.* Rio de Janeiro Panamericana 2004; pág 87-132
- 19- Bancalari E. Bronchopulmonary Dysplasia: old problem, new presentation. *J Pediatr (Rio J)*, 2006;82:2-3.
- 20- Coalson JJ, Winter V, deLemos RA. Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia. *Am J. Respir Crit Care Med* 1995;152:640-6
- 21- Coalson JJ, Winter VT, Siler- Khodr T and Yoder BA. Neonatal Chronic Lung Disease In Extremely Immature Baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1333- 1346.
- 22- Bland, R. D. *et al.* Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: potential benefits of retinol treatment. *Biol Neonate*, v. 84, n. 1, p. 101-2, 2003.
- 23- Bourbon, J. *et al.* Control mechanisms of lung Alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res*, v. 57, p. 38R-46R, 2005.
- 24- Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia . 2006. *Lancet*;367:1421-31
- 25-Rubin and Farber JL. Bases clínicopatológicas da medicina. 4ªed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2006. Cap 14
- 26- Grupo Colaborativo Neocosur. Very low birth weight infants outcomes in 11 South – American NICU's. *J Perinatol* .2002;22:2-7
- 27- Einchenwald EC and Stark AR. Management and outcomes of Very Low Birth Weight. *N Engl J Med* 2008; 358:1700-11

- 28- Warburton D, Tefft D, Mailleux A, Bellusci S, Thiery JP, Jingsong Z et al. Do lung Remodeling, Repair, and Regeneration Recapitulate Respiratory Ontogeny? *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:s59-s62.
- 29- Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 2003; 8:29-38
- 30- Urlichs F, Speer CP. Neutrophil function in preterm and term infants. *Neo Rev* 2004; 5:417-29.
- 31- Speer, CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: A continuing story. *Semin fetal and neonat med* 2006
- 32- Santos CC, Slutsky A. The contribution of biophysical lung injury to the development of biotrauma. *Annu Rev Physiol.* 2006; 68: 585-618.
- 33- Perkowski S, Scherpereel A et al. Dissociation between alveolar transmigration of neutrophils and lung injury in hyperoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2006 nov; 291(5): 11050-1058
- 34- Gerik SM, Keeney SE et al. Neutrophil Adhesion Molecule expression in the developing neonatal rat exposed to hyperoxia. *Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2003; 29: 506-512.
- 35- - Paananen R, Husa AK, Vuolteenaho R, Herva R, Kaukola T, Hallman M. Blood Cytokines during the Perinatal Period in Very Preterm Infants: Relationship of Inflammatory Response and Bronchopulmonary Dysplasia. *J Pediatr* 2008 Aug 29.
- 36- Mottet C and Golshayan D. CD4+CD25+Foxp3 regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss med WKLY* 2007; 137: 625-634.
- 37- Gasparoni A et al. Age-related Changes in Intracellular Th1/Th2 Cytokine Production, immunoproliferative T Lymphocyte Response and Natural Killer Cell activity in Newborns, children and adults. *Biol Neonate.*2003; 84:297-303.
- 38- Turunen R , Vaarala O et al. Activation of T cells in preterm infants with Respiratory Distress Syndrome. *Neonatology* 2009; 96: 248-258.
- 39- Wattenberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics* 1996 vol 97:210-15.
- 40- Ballabh P, Simm M. et al. Neutrophil and monocyte adhesion molecules in Bronchopulmonary Dysplasia, and effects of corticosteroids. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2004; 89: 76-83.
- 41- Little S, Dean T, Bevin S et al. Role of elevated plasma soluble ICAM-1 And bronchial lavage fluid IL-8 levels as markers of chronic lung disease in premature infants. *Thorax* 1995; 50:1073-1079.
- 42- - Speer CP and Groneck P. Oxygen radicals, cytokines, adhesion molecules and lung injury in neonates. *Semin Neonatol* 1998; 3: 219-228.
- 43- - Hargitai B, Szabó V, Hajdu J, Harmath A, Pataki M, Farid P, Papp Z, Szende B. Apoptosis in various organs of preterm Infants: histopathologic study of lung, kidney, liver, and brain of ventilated infants. *Pediatr res* 2001; 50:110-114
- 44- Chavéz- Gala, L et al. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cell & Molecular Immunology* .2009; Feb 6(1)p:15-25.
- 45- Paepe ME, Mao Q, Powell JL, Rubin LP and Sharma S. Hyperoxia-induced apoptosis and Fas/Fas L expression in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: 647-659.
- 46- Lukkarinen HP, Laine J and Kääpä PO. Lung epithelial cells undergo apoptosis in neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatr res* 2003; 53: 254-259.
- 47- De Paepe ME, Gundavarapu S, Tantravahi U, Pepperell JR, Haley SA, Luks FI, Mao Q. Fas- ligand- induced apoptosis of respiratory epithelial cells causes disruption of postcanalicular alveolar development. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1): 42-56.
- 48- MCFarlane MJ, Feinstein AR, Wells CK, Chan CK. The 'epidemiologic necropsy': unexpected detections, demographic selections, and changing rates of lung cancer. *JAMA* 1987; 258: 331-8.
- 49- Forghani B, Dennis J. Immunoenzymatic staining. In: Schmidt NJ, Emmons RW 6^o Ed. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections.* American Public Health Association, 1989. p 135-156