

# Análise comparativa de duas técnicas de contagem de número de alvéolos e de medição do espessamento septal em coelhos prematuros com displasia broncopulmonar

## *Comparative analysis of two techniques for counting number of alveoli and measuring septal thickening in premature rabbits with bronchopulmonary dysplasia*

Rodrigo Leonel dos Santos<sup>1</sup>; Bruno Garcia de Aquino<sup>1</sup>; Mariana Mendes Silva<sup>1</sup>; Fernanda Polastri Thereza<sup>1</sup>; Celso Moura Rebello<sup>2</sup>; Renata Suman Mascaretti<sup>3</sup>; Roberta Munhoz Manzano<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Fisioterapeutas – FIB. Bauru, SP – Brasil.

<sup>2</sup>Doutor em Ciências (Pediatria), Faculdade de Medicina – USP; Médico Neonatologista do Hospital Israelita Albert Einstein; Professor

Doutor do Departamento de Pediatria – FMUSP, Disciplina de Pediatria Neonatal. São Paulo, SP – Brasil.

<sup>3</sup>Doutora em Ciências (Pediatria), Faculdade de Medicina – USP; Médica Neonatologista – Hospital Promatze Paulista. São Paulo, SP – Brasil.

<sup>4</sup>Doutora em Ciências (Pediatria), Faculdade de Medicina – USP; Fisioterapeuta, Docente do curso de Fisioterapia – FIB. Bauru, SP – Brasil.

### Endereço para correspondência

Roberta Munhoz Manzano  
R. Bartolomeu de Gusmão, 2-102, Apto. 24, Jardim América  
17017-336 – Bauru – SP [Brasil]  
roberta\_m\_m@hotmail.com

### Resumo

**Introdução:** A “nova” displasia broncopulmonar se caracteriza por diminuição da septação alveolar e do desenvolvimento vascular pulmonar. **Objetivo:** Comparar a contagem manual e a automática do número de alvéolos e medir o espessamento septal por um programa de análise de imagem. **Métodos:** Coelhos prematuros nascidos no 28<sup>o</sup> e 29<sup>o</sup> dia de gestação foram submetidos a ar ambiente ou oxigênio, durante 11 dias, após serem randomizados em quatro grupos, a saber: AR28, O<sub>2</sub>28 (FiO<sub>2</sub> ≥ 95%), AR29, O<sub>2</sub>29 (FiO<sub>2</sub> = 80%). Os pulmões foram retirados e corados para a contagem de número de alvéolos e medição do espessamento septal. Utilizou-se o programa Image-Pro Plus 4.5<sup>®</sup> para análise de imagem. **Resultados:** Houve diferença entre as formas de contagem do número de alvéolos e a análise de espessamento septal, realizadas manual e automaticamente (p<0,05). **Conclusão:** Os dados encontrados na análise histológica manual realizada no programa corroboram os descritos na literatura para número de alvéolos e espessamento septal.

**Descritores:** Alvéolos pulmonares; Displasia broncopulmonar; Hiperóxia; Histologia comparada; Nascimento Prematuro.

### Abstract

**Introduction:** The “new” bronchopulmonary dysplasia is characterized by decreased alveolar septation and lung vascular development. **Objectives:** To compare manual and automatic counting of the number of alveoli and measurement of septal thickening in a program for image analysis. **Methods:** Preterm rabbits born on the 28<sup>th</sup> and 29<sup>th</sup> days of gestation were subjected to ambient air or oxygen for 11 days, randomized into four groups, AR28, O<sub>2</sub>28 (FiO<sub>2</sub> ≥ 95%), AR 29, O<sub>2</sub>29 (FiO<sub>2</sub> = 80%). The lungs were removed to count the number of alveoli and measure septal thickening. The program used for image analysis was Image-Pro Plus 4.5<sup>®</sup>. **Results:** A statistically significant difference was found between the manual and automatic methods of counting the number of alveoli and analyzing the septal thickening. (p<0.05). **Conclusion:** The data found in the histological analysis performed manually in the program corroborate what is reported in the literature on data for number of alveoli and septal thickening.

**Key words:** Bronchopulmonary dysplasia; Histology comparative; Hyperoxia; Premature birth; Pulmonary alveoli.

## Introdução

Os 25 milhões de alvéolos pulmonares normalmente presentes na criança ao nascer, aumentam após o nascimento até o décimo ano de vida. Por volta dos dez anos a criança possui 300 milhões de alvéolos, atingindo a maturidade pulmonar com essa idade. Entretanto, em neonatos prematuros, os acometimentos respiratórios são os mais encontrados, interferindo no desenvolvimento dos pulmões ou destruindo os alvéolos existentes, o que diminui seu número potencial em um adulto<sup>1</sup>.

O nascimento prematuro e eventos subsequentes (por exemplo, hiperóxia, ventilação mecânica, agentes inflamatórios, infecção, baixo peso ao nascer, subnutrição, síndrome do desconforto respiratório e persistência do canal arterial) são fatores que podem alterar o equilíbrio do desenvolvimento de pulmão<sup>2,3</sup>.

Os prematuros são frequentemente expostos ao oxigênio após o nascimento em decorrência de sua imaturidade pulmonar estrutural e funcional. A prematuridade tem como consequência defesas antioxidantes prejudicadas, sendo assim, a hiperóxia durante a terapia pode causar lesão tecidual. A toxicidade direta induzida pela reação acentuada aos radicais livres derivados do oxigênio desencadeia um processo inflamatório que é comum nos pulmões, resultando em lesão das vias aéreas, no epitélio alveolar e no endotélio capilar, que resulta em edema intersticial e alveolar e acarreta inativação do surfactante<sup>4,5</sup>. A toxicidade indireta das respostas fisiológicas inadequadas ao oxigênio é caracterizada pela proliferação de células alveolares tipo II, e após exposição prolongada, fibrose intersticial<sup>6,7</sup>.

A displasia broncopulmonar (DBP) é uma das complicações mais comuns associadas ao nascimento prematuro. Foi inicialmente descrita como uma lesão pulmonar em recém-nascidos prematuros (RNPT), submetidos a altas concentrações de oxigênio e à ventilação mecânica agressiva. A lesão pulmonar, nessa época, foi descrita como secundária ao processo de lesão e reparação tecidual, apresentando edema alveo-

lar intersticial precoce, fibrose, e inflamação das vias aéreas. O perfil dos recém-nascidos com DBP modificou-se em relação à descrição inicial feita por Northway em 1967<sup>8</sup>. Atualmente, a doença ocorre, de forma predominante, entre recém-nascidos (RN), com peso de nascimento inferior a 1000 g e idade gestacional de 24 a 26 semanas<sup>4,9,10</sup>. Essa mudança de perfil de recém-nascidos com DBP, assim como de sua apresentação clínica, resultou na criação do termo “nova” displasia broncopulmonar<sup>9</sup>.

A lesão pulmonar dessa “nova” DBP se caracteriza por uma diminuição da septação alveolar e do desenvolvimento vascular, ou seja, ocorre um bloqueio no desenvolvimento pulmonar e, conseqüentemente, a alveolarização é reduzida<sup>4,9,10,11,12,13</sup>.

A DBP é uma doença multifatorial que leva a diversas alterações histopatológicas no pulmão prematuro. Sua patogênese inclui prematuridade, ventilação mecânica, defesas antioxidantes inadequadas, ativação da resposta inflamatória por vários mecanismos, sendo a exposição ao oxigênio um dos fatores mais importantes<sup>6</sup>, incluindo também infecções pré-natais e nosocomiais e a persistência de canal arterial<sup>14</sup>.

A resposta inflamatória na DBP é caracterizada por um acúmulo de neutrófilos, macrófagos e de mediadores pró-inflamatórios no tecido pulmonar<sup>9</sup>. O efeito deletério da hiperóxia sobre o tecido pulmonar é dose dependente, sendo diretamente proporcional à concentração de oxigênio fornecida e ao tempo de exposição. O grau da lesão também apresenta relação inversa com a idade gestacional em que ocorre a exposição<sup>9</sup>.

Além das características da lesão pulmonar da “nova” DBP, mencionadas acima, também ocorre aumento do espessamento septal, que é causado pela proliferação e infiltração de células reticuloendoteliais ou mesenquimatosas que invadem os septos em todos os locais. Para quantificar a lesão, é necessário realizar a contagem do número de alvéolos e mensurar o espessamento septal por meio de análise histopatológica<sup>11,12,13,15,16,17,18</sup>.

Um método em que pode ser realizada a análise de imagens digitais é por intermédio do *software* Image-Pro Plus<sup>®</sup>. Esse programa, pelo desenho livre do contorno alveolar, fornece medidas de perímetro, área e número dos alvéolos por campo, automaticamente, além disso, também permite a contagem manual<sup>19</sup>.

A contagem do número de alvéolos e o espessamento septal costumavam ser realizados no microscópio. Com a utilização dos *softwares* de análise de imagem, essa metodologia vem sendo utilizada atualmente, no entanto, o número de artigos com essa nova metodologia ainda é escasso, por isso a importância do estudo aqui apresentado, que utiliza essa nova metodologia de duas formas diferentes, ambas realizadas no programa, tanto para a contagem do número de alvéolos quanto para o cálculo do tamanho do septo interalveolar.

O objetivo neste estudo foi comparar duas formas diferentes de análise, contagem manual e automática, do número total de alvéolos e espessamento septal por um programa de análise de imagem na displasia broncopulmonar.

## Material e métodos

O protocolo de experimentação foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – projeto número 487/07).

A fase de experimentação animal foi realizada no Laboratório de Pesquisa Experimental da Disciplina de Pediatria Neonatal do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). A análise histopatológica foi orientada e supervisionada pelo Departamento de Patologia da FMUSP.

Coelhas grávidas foram submetidas a parto cesáreo no 28º e 29º dia de gestação (termo 31 dias). Imediatamente após nascerem, os filhotes foram randomizados entre os grupos de estudo de acordo com a ordem de nascimento. Nas di-

versas ninhadas, foram também alternados os primeiros filhotes das diferentes fêmeas entre os grupos de estudo, sendo os animais expostos à hiperoxia ou submetidos ao ar ambiente. Os recém-nascidos foram observados por 30 minutos, logo após o nascimento, em relação à sobrevivência e, depois desse período, foram colocados dentro das respectivas incubadoras (com exposição ao oxigênio ou ao ar ambiente), onde permaneceram por 11 dias.

Dessa forma, foram constituídos quatro grupos de estudo, conforme a exposição dos filhotes, da seguinte maneira: grupo AR 28 formado por 17 animais com 28 dias de gestação expostos ao ar ambiente; O<sub>2</sub> 28, por 17 recém-nascidos, com 28 dias de gestação com exposição ao oxigênio em concentração  $\geq 95\%$ ; AR 29, 8 indivíduos, com 29 dias de gestação expostos ao ar ambiente; O<sub>2</sub> 29, 8 coelhos, com 29 dias de gestação com exposição ao oxigênio em concentração igual a 80%.

Os animais foram mantidos em incubadoras para prematuros (C-86, Fanem Ltda.<sup>□</sup>, São Paulo, Brasil), em bandejas revestidas com serragem de flocos finos autoclavada (maravalha estéril), sendo realizadas duas trocas por dia, com a finalidade de mantê-los em ambiente seco e limpo. A temperatura no interior da incubadora foi mantida constante entre 30 e 32 °C, controlada por termômetro eletrônico. O peso dos filhotes foi controlado diariamente, antes da primeira alimentação do dia (balança TR 403, Denver Instrument Company<sup>®</sup>, Estados Unidos).

A partir do terceiro dia de vida, foi iniciada antibioticoterapia profilática<sup>20</sup> com penicilina cristalina (20.000 UI/kg – IM) e estreptomicina (20 mg/kg.dia – IM) uma vez ao dia, associadas à administração de vitamina K (0,002 mg/kg/dia – IM), com o objetivo de prevenir quadros hemorrágicos. Os animais foram alimentados com fórmula láctea semelhante ao leite natural de coelha<sup>21</sup>, constituída por 5 g de Neocate (Support<sup>®</sup>), 5 g de caseical (Support<sup>®</sup>) e 15 g de trigliceril CM AGE (Support<sup>®</sup>) para 100 ml de leite. Do terceiro dia de vida em diante foi adicionada à fórmula uma gota de complexo vitamínico Vitanove<sup>®</sup>.

O volume de dieta administrado no primeiro dia de vida foi 100 ml/kg, no segundo, 150 ml/kg, e do terceiro ao décimo primeiro dia de vida, 200 ml/kg.

Com o auxílio de nebulizadores neonatais (Intermed®, São Paulo, Brasil), oxigênio aquecido e umidificado foi fornecido em uma concentração de 80% para os animais do grupo O<sub>2</sub> 29; e em uma concentração ≥ 95% aos coelhos do grupo O<sub>2</sub> 28, através de uma câmara de acrílico selada e multiperfurada para evitar acúmulo de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O controle da concentração de O<sub>2</sub> foi realizado por intermédio de analisador de oxigênio ambiente (Dixtal®, São Paulo, Brasil).

Os animais foram sacrificados por secção da aorta abdominal, após sedação profunda com pentobarbital (25 mg/kg – intraperitoneal), no 11º dia após o nascimento. Optou-se por essa técnica de sacrifício para evitar a hemorragia pulmonar, que poderia prejudicar a leitura das lâminas na análise histológica do pulmão.

Os pulmões foram conservados em álcool etílico a 70% até serem embebidos em parafina, seguido do processamento em cortes seriados de 5µm de espessura e confecções de lâminas, as quais foram submetidas às colorações de hematoxilina-eosina para a contagem de número de alvéolos e Picrosirius para espessamento septal.

A descrição mais detalhada de toda a técnica de manipulação dos animais, cesárea, manutenção dos prematuros, alimentação, sacrifício, retirada dos pulmões e confecção das lâminas está descrita em Manzano<sup>22</sup>.

As fotos realizadas de todas as lâminas para a leitura pelo programa de análise de imagem foram tiradas, sendo selecionado apenas o parênquima pulmonar (alvéolos e septos), excluindo-se vasos e outras estruturas.

## Número de alvéolos

A contagem do número total de alvéolos foi realizada utilizando-se o analisador de imagens (Image-Pro Plus 4.5®, Media Cybernetics INC™, EUA) de maneira cega por um investigador. Em cortes pulmonares corados com hematoxilina-

eosina, fotografados em aumento de 100x, foram utilizados dez campos (fotos) por lâmina.

Para a contagem manual, ao iniciar o programa o arquivo com a foto a ser analisada era carregado, a foto calibrada no aumento de 100x, a ferramenta *Irregular AOI* era selecionada e, em cada campo, os alvéolos foram selecionados um a um e contados manualmente (Figura 1).

A contagem automática dos alvéolos foi também realizada pelo mesmo programa. O arquivo com a foto a ser analisada era carregado, a foto calibrada no aumento de 100x, a ferramenta *Irregular AOI* era selecionada e, em cada campo, os alvéolos foram selecionados um a um. Era dado o comando macro, posteriormente o comando alvéolos, e anotado o valor de *samples* com o número de alvéolos contados pelo programa.

## Espessamento septal

A medida da espessura do septo interalveolar foi realizada manualmente com auxílio do analisador de imagens (Image-Pro Plus 4.5®, Media Cybernetics INC™, EUA) de maneira cega por um investigador. Foi utilizada uma lâmina por animal corada com Picrosirius, sendo realizadas quatro fotografias por lâmina, em aumento de 200x, avaliando-se de quatro a oito septos por foto.

Ao iniciar o programa, o arquivo com a foto a ser analisada era carregado, cada foto foi calibrada no aumento de 200x, e foi selecionada a ferramenta do programa *manual measurements*, dentro dessa ferramenta selecionou-se outra, nomeada *create click and drag line feature*, com esta última foi medido manualmente cada septo interalveolar até totalizar de quatro a oito septos por foto. Nos pulmões com maior homogeneidade do septo interalveolar, foram avaliados quatro septos por foto; e nos pulmões que apresentavam maior heterogeneidade do septo interalveolar avaliaram-se oito septos por foto (Figura 2).

A coloração e o tamanho dos aumentos utilizados foram orientados pelo departamento de Patologia da FMUSP, cada tipo de análise tem suas especificidades.

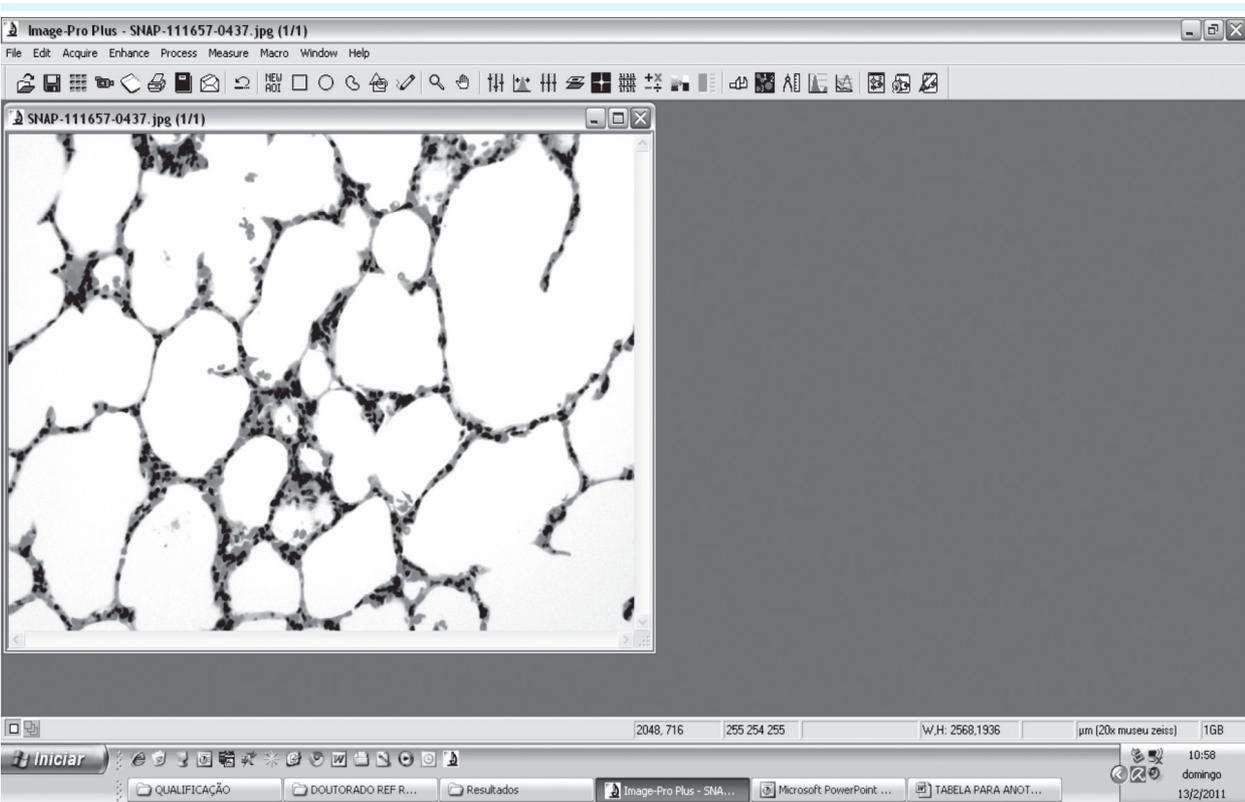


Figura 1: Imagem do programa na contagem manual do número de alvéolos

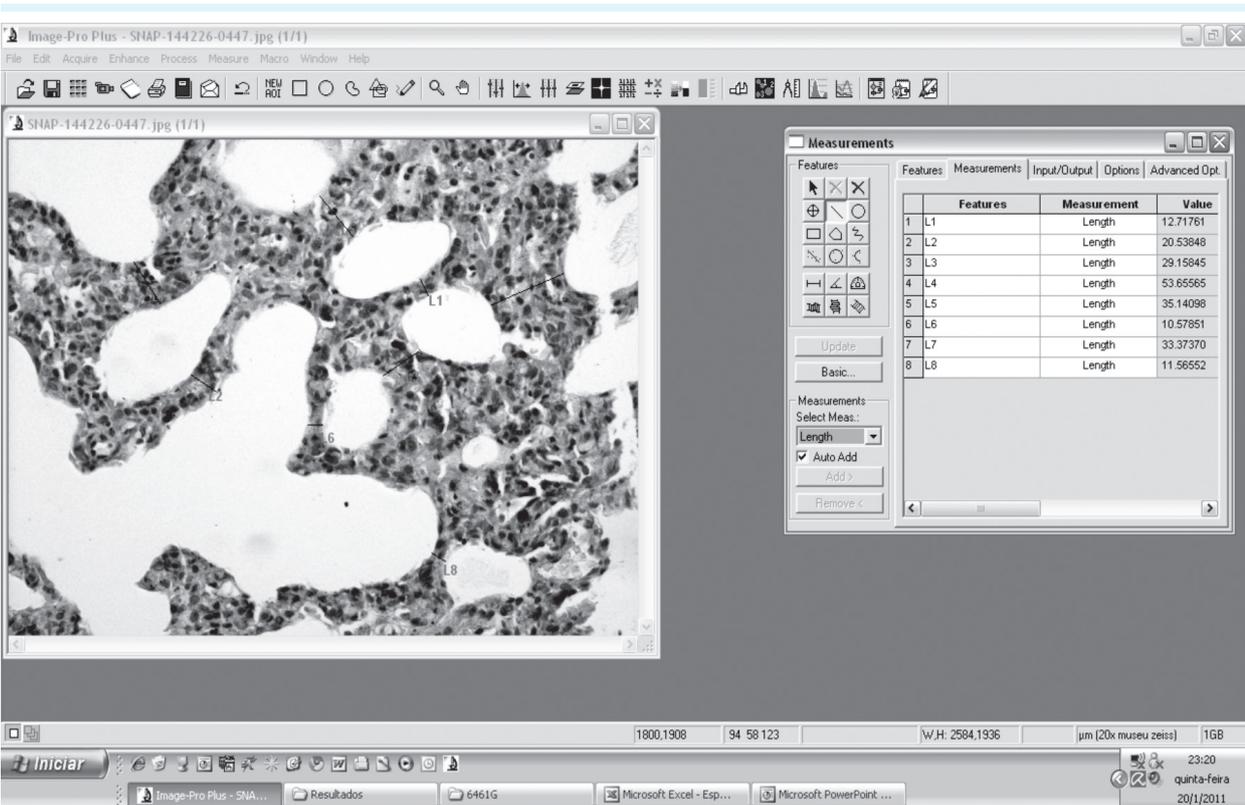


Figura 2: Imagem do programa na contagem manual do espessamento septal (oito septos)

A outra maneira de analisar o espessamento septal era contando o número de alvéolos, essa tarefa foi realizada pelo mesmo analisador de imagem. O arquivo com a foto a ser analisada era carregado, a foto calibrada no aumento de 100x, na coloração hematoxilina eosina, a ferramenta *Irregular AOI* era selecionada e, em cada campo, os alvéolos foram selecionados um a um. Era dado o comando macro, alvéolos, e anotado os valores de área total e perímetro total para calcular o espessamento septal pela fórmula:

$$\text{Espessamento Septal} = \frac{\text{Área Total}}{\text{Perímetro Total}} \quad (1)$$

## Análise estatística

Para a comparação de cada grupo em dois momentos diferentes – análise manual x automática –, foi utilizado o teste “t” pareado para amostras normais ou o teste Wilcoxon. Para a comparação entre os grupos AR 28 x O<sub>2</sub> 28 e AR 29 x O<sub>2</sub> 29, foi utilizado o teste “t” de Student para amostras normais ou o Mann-Whitney a um nível de significância de 0,05 e um poder de teste de 0,80.

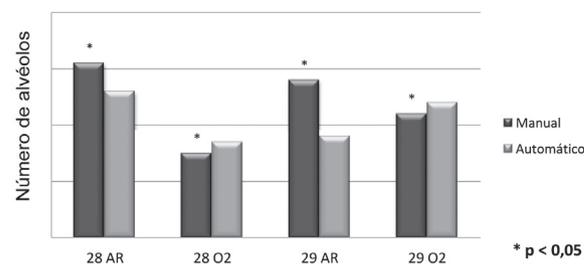
## Resultados

Foram avaliadas 50 lâminas de pulmões prematuros; e cada lâmina foi analisada de duas maneiras diferentes, manual e automaticamente, pelo programa de análise de imagem.

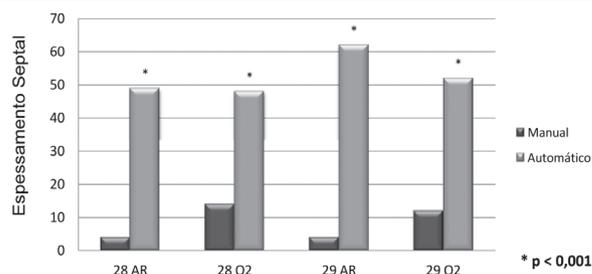
Neste modelo experimental, pode-se verificar diferença significativa na comparação da contagem do número de alvéolos pelo programa, realizado manual e automaticamente, conforme mostrado no gráfico da Figura 3.

Também houve diferença estatística significativa na comparação da análise do espessamento septal pelo programa, no método manual e no automático, como apresentado no gráfico da Figura 4.

Dessa forma, é possível afirmar que a contagem do número de alvéolos e do espessamento



**Figura 3:** Análise comparativa da contagem do número de alvéolos pelo programa (manual e automático)



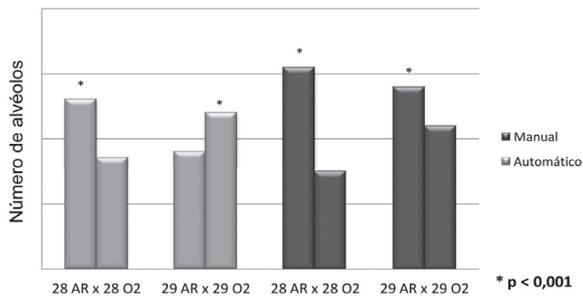
**Figura 4:** Análise comparativa do espessamento septal pelo programa (manual e automático)

septal utilizando o *software* analisador de imagens apresenta resultados diferentes, quando comparada a aplicação automática e a manual.

Foi realizada também a análise comparativa entre os grupos AR 28 x O<sub>2</sub>28 e AR 29 x O<sub>2</sub>29 com as técnicas manual e automática para verificar se as duas formas apresentavam diferença estatística significativa.

Os resultados da comparação do número de alvéolos entre os grupos AR 28 x O<sub>2</sub>28 e AR 29 x O<sub>2</sub>29, contados automaticamente pelo *software*, apresentaram diferenças significativas. Entretanto, embora a comparação dos grupos AR 29 x O<sub>2</sub>29 tenha mostrado diferença estatisticamente significativa, esta diferença foi contrária aos dados encontrados na literatura, pois a contagem automática apresentou resultados que demonstram que os pulmões dos coelhos prematuros (29 dias), mantidos em hiperóxia, apresentavam um número maior de alvéolos, quando comparados aos de coelhos prematuros que foram mantidos em ar ambiente. Já na análise estatística comparativa dos mesmos grupos (28 AR x 28 O2 e 29 AR x 29 O2), em que foram re-

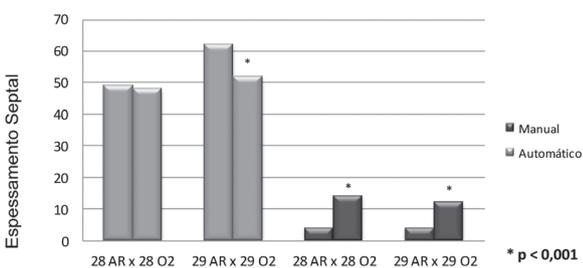
alizadas contagens manuais pelo *software*, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas, considerando  $p < 0,001$ , com resultados de acordo com os dados encontrados na literatura (Figura 5).



**Figura 5:** Análise comparativa da contagem do número de alvéolos pelo programa (manual e automático)

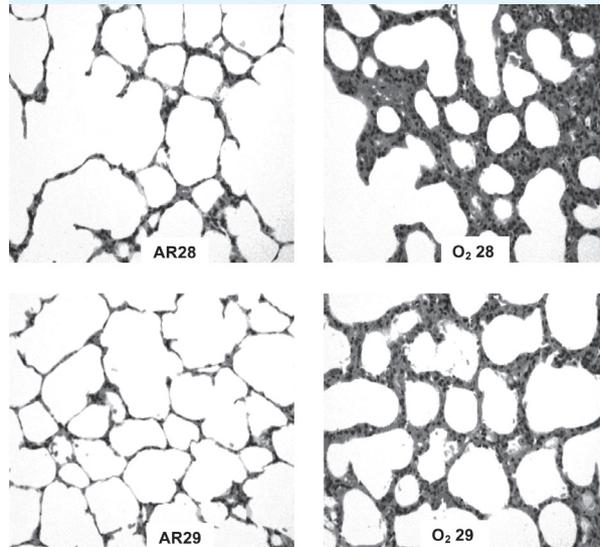
Na análise histológica do espessamento septal, realizada automaticamente pelo programa, é evidenciado que entre os grupos 28 AR x 28 O2 não houve diferença significativa. No grupo 29 dias na comparação do espessamento septal, realizado pelo programa de modo automático, entre os grupos 29 AR x 29 O2, a diferença foi significativa, no entanto esse resultado é contrário aos resultados encontrados na literatura. Quando um pulmão é exposto a uma alta concentração de oxigênio a espessura do septo interalveolar deve aumentar.

A mesma comparação 29 AR x 29 O2, quando realizada manualmente, encontra dados que corroboram os encontrados na literatura, ou seja, aumento do espessamento septal em hiperoxia (Figura 6).



**Figura 6:** Análise comparativa do espessamento septal pelo programa (manual e automático)

A fotomicrografia do número de alvéolos nos grupos de estudo é mostrada na Figura 7, com fotos realizadas no programa de análise de imagem, na coloração hematoxilina-eosina, no aumento 100x.



**Figura 7:** Fotomicrografia do número de alvéolos, coloração hematoxilina-eosina, aumento 100x

## Discussão

Foi possível, com este estudo, verificar que nessa amostra de coelhos prematuros expostos à hiperoxia, há diferença significativa quando se compara a contagem do número de alvéolos e a análise do espessamento septal realizada pelo programa de duas maneiras diferentes, manual e automática. Não foram encontrados na literatura, estudos que comparassem a contagem do número de alvéolos e o espessamento septal utilizando um *software* analisador de imagens por meio de métodos manuais e automáticos, porém, encontraram-se diferentes trabalhos que analisaram, sem comparação, o número de alvéolo e espessamento septal por outras técnicas. No modelo inicialmente desenvolvido em experimento anterior deste grupo, baseado em longos períodos de exposição a altas concentrações de oxigênio, foram utilizados coelhos pre-

maturos de 28 dias de gestação expostos a uma  $FiO_2 \geq 95\%$ . No entanto, a taxa de mortalidade foi elevada. Nesse modelo anterior, os animais foram submetidos à hiperoxia durante dois períodos de tempo: 7 e 11 dias. Embora com 7 dias de exposição ao oxigênio a mortalidade tenha sido inferior à encontrada com 11 dias, essa ainda era relativamente elevada (87,1%); e as lesões pulmonares observadas não foram suficientemente consistentes para a adoção desse modelo experimental<sup>12, 13</sup>. Dessa forma, entendeu-se que não se obteriam os resultados esperados com sete dias de exposição à hiperoxia, mesmo utilizando uma menor concentração de oxigênio, assim, optou-se por realizar a agressão por hiperoxia, durante 11 dias, com uma concentração de oxigênio de  $FiO_2 = 80\%$ , acreditando-se que um dia a mais de maturação pulmonar (29 dias) e uma concentração de oxigênio um pouco menor (80%) resultariam em um modelo de DBP com uma mortalidade reduzida.

Nos coelhos, a fase alveolar inicia-se no 28º dia de gestação<sup>23</sup>, nesta fase o animal está iniciando o processo de alveolização que continua até sua vida adulta que se estende de 24 a 36 semanas<sup>24</sup>. O tempo de gestação do coelho é de 31 dias, sendo 28 dias desse período o limite da viabilidade, correspondendo a 87% do termo. No recém-nascido humano, 87% do termo correspondem a uma idade gestacional inferior a 34 semanas, correspondendo, portanto, a fase sacular do desenvolvimento pulmonar, sendo que o aparecimento dos primeiros alvéolos ocorre ao redor de 32 semanas<sup>25</sup>. Em face da proximidade da semelhança nas etapas de desenvolvimento pulmonar de coelhos e seres humanos, escolheu-se analisar o coelho na pesquisa aqui apresentada.

Emery e Mithal<sup>26</sup> apresentaram em seu estudo um método que tem mostrado reprodutibilidade adequada, que consistia em ignorar todos os bronquíolos completamente revestidos por epitélio e selecionar somente aqueles revestidos por epitélio em um lado da parede. Para tanto, é preciso traçar uma linha perpendicular do centro de uma via respiratória até o septo alveolar

de tecido conjuntivo mais próximo. Em seguida, conta-se o número de alvéolos cortados por essa linha. Esse método supera, na medida do possível, os efeitos de diferentes graus de colapso ou da presença de fluido ou exsudato em alguns alvéolos<sup>26</sup>.

Outro procedimento utilizado para contagem do número de alvéolos foi o método modificado apresentado por Dunnill<sup>27</sup>. O número de alvéolos total foi calculado após os cortes pulmonares serem corados com hematoxilina-eosina, e fotografados em uma ampliação de 100x com o analisador de imagem Image-Pro, Media Cybernetics INC®, EUA. Três linhas foram rastreadas em diferentes níveis, de pleura a pleura, e o número de interceptos que cruzou a parede dos alveolos foi contado, somado e, em seguida, dividido por dois. O comprimento das linhas foi medido e somado, sendo o número de alvéolos dividido por esse valor (número de alvéolos /  $mm \times 10^{-3}$ )<sup>27</sup>.

No estudo de Warner et al.<sup>28</sup>, foi realizada a análise morfométrica por meio do analisador de imagem Image-1/Metamorph Imaging System, version 2 for Microsoft Windows (Universal Imaging, West Chester, PA). A medição da área média de cada espaço aéreo foi examinada com um microscópio que continha um quadrado composto por cinco linhas de intersecção. Os espaços aéreos foram distinguidos e corados com uma cor vermelha; e o tecido sólido, corado em cor cinza. Medições dos espaços aéreos terminais foram obtidas a partir dos pontos de intersecção de linhas. Foram realizadas as análises da área alveolar e do espessamento intersticial<sup>28</sup>.

Em 1991, Margraf et al.<sup>29</sup> analisaram lâminas histológicas dos pulmões de crianças com DBP, obtidos na autópsia, corados com hematoxilina-eosina e examinados por microscopia óptica, sendo projetados com um aumento de 200x revestidas com uma grade de 49 pontos. Foi avaliado o número total de alvéolos, a superfície interna e o intercepto linear média, usando as técnicas padrão de Dunnill<sup>27</sup>. O espessamento septal foi quantitativamente estimado em leve, moderado ou severo<sup>27, 29</sup>.

Okamoto et al.<sup>19</sup> utilizaram o *software* Image-Pro Plus® para contagem do número de alvéolos. A forma de contagem do número de alvéolos se deu por meio do desenho livre do contorno alveolar, que fornece medidas de perímetro, área e número dos alvéolos por campo, automaticamente<sup>19</sup>.

Outro estudo que avaliou o espessamento septal foi realizado, em 2009, por Pereira et al.<sup>30</sup> Foram estudados os pulmões de 12 ratos machos adultos, os cortes foram corados por hematoxilina-eosina; e as imagens capturadas por câmera acoplada ao microscópio. Para cada lâmina, foram fotografados dez campos diferentes obtidos de forma aleatória em objetiva de aumento final de 400x para hematoxilina-eosina. Para determinação da espessura do septo alveolar, foi realizada em cada campo fotográfico a mensuração de três septos, com escolha do maior valor para cada campo, a partir do qual se calculou a média do valor da espessura dos septos por animal, posteriormente, calculou-se a média por grupo e, ao final, realizou-se a comparação entre os grupos<sup>30</sup>.

Como limitações deste trabalho, destacam-se a escassez de estudos referentes à análise histológica comparativa de contagem alveolar e, principalmente, sobre os métodos de análise do espessamento septal, bem como a inexistência de pesquisa sobre a comparação de métodos manuais e automáticos possibilitados pelos *softwares* analisadores de imagem. Também não está bem delimitado na literatura qual é o melhor método para análise de imagem de número de alvéolos e espessamento septal.

## Conclusões

Houve diferença estatisticamente significativa entre as técnicas de contagem do número de alvéolos e a análise do espessamento septal, nos quatro grupos estudados utilizando-se *software* analisador de imagens de forma manual e automática.

Os dados encontrados relacionados à análise histológica realizada automaticamente pelo programa são controversos aos descritos na literatura, diferente dos obtidos na análise manual que corrobora a literatura. Ainda assim, não é possível afirmar qual dos métodos é mais fidedigno, devido à escassez de pesquisas sobre o tema abordado.

Diante do exposto, salienta-se a necessidade de mais estudos que demonstrem outros tipos de contagem alveolar e medidas de espessamento septal e que também comparem as análises histológicas manuais e automáticas realizadas por meio de *softwares* analisadores de imagem.

## Referências

1. Bhandari A, Bhandari V. Pathogenesis, pathology and pathophysiology of pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia in premature infants. *Front Biosci.* 2003;1(8):370-80.
2. Ambalavanan N, Carlo WA. Bronchopulmonary dysplasia: new insights. *Clin Perinatol.* Sept 2004;31:613-28.
3. Tapia JL, Agost D, Alegria A, Standen J, Escobar M, Grandi C, et al. Bronchopulmonary dysplasia: incidence, risk factors and resource utilization in a very low birth weight infant South-American population. *J Pediatr (RJ).* 2006;82:15-20.
4. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol.* 2003;8:73-81.
5. Monte Vlf, Silva F° Lvfs, Miyoshi Mh, Rozov T. Displasia broncopulmonar. *J Pediatr (RJ).* 2005;81:99-110.
6. Saugstad OD. Chronic lung disease: the role of oxidative stress. *Biol Neonate.* 1998;74(Suppl 1):21-8.
7. Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. Oxygen toxicity in premature infants. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002;181:60-7.
8. Northway WH Jr, Rosan RC; Porter DY. Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline-membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med.* 1967;27:356-68.

9. Bancalari E, Claure N, Sosenko IRS. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol.* 2003;8:63-71.
10. Parker TA, Abman SH. The pulmonary circulation in bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol.* 2003;8:51-62.
11. Suguihara C, Lessa AC. Como minimizar a lesão pulmonar no prematuro extremo: propostas. *J Pediatr.* 2005;81(1):69-78.
12. Mataloun MMGB, Rebello CM, Mascaretti RS, Dohnnikoff M, Leone CR. Pulmonary responses to nutritional restriction and hyperoxia in premature rabbits. *J Pediatr.* 2006;82:179-85.
13. Mascaretti RS, Mataloun MMGB, Dolhnikoff M, Rebello CM. Lung morphometry, collagen and elastin content: changes after hyperoxic exposure in preterm rabbits. *Clinics.* 2009;64(11):1099-104.
14. Speer CP. Inflammation and bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol.* 2003;8:29-38.
15. Chess PR, D'angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of Bronchopulmonary Dysplasia. *Semin Perinato.* 2006;30:171-8.
16. Deakins KM. Bronchopulmonary dysplasia. *Respiratory Care.* 2009;54(9):1252-62.
17. Haaften T, Byrne R, Bonnet S, Rochefort GY, Akabutu J, Bouchentouf M, et al. Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:1131-42.
18. Vadivel A. Adrenomedullin promotes lung angiogenesis, alveolar development, and repair. *Am J Respir Cell and Mol Biol.* 2010;43:152-60.
19. Okamoto CT, Bahr JA, Silva LLG, Noronha L. 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;45(2):155-60.
20. Shah M, Bry K, Hallman M. Protective effect of transferrin against hyperoxia: a study on premature rabbits. *Pediatr Pulmonol.* 1997;24:429-37.
21. Sogorb F, Damy SB, Rodrigues UP, Chaguri ICAG. Variação na composição do leite de coelha. *Mem Inst Butantan.* 1991;53:175-80.
22. Manzano RM. Modelo de lesão pulmonar em coelhos prematuros: influência da idade gestacional e da concentração de oxigênio [tese de doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2011.
23. Karnak I, Muftuoglu S, Cakar N, Cahit Tanyel F. Organ growth and lung maturation in rabbit fetuses. *Res Exp Med.* 1999;198:277-87.
24. Kovar J, Sly PD, Willet KE. Postnatal alveolar development of the rabbit. *J Appl Physiol.* 2002;93:629-35.
25. Burri PH. Structural aspects of prenatal and postnatal development and growth of the lung. In: *Lung Growth and Development*, edited by McDonald JA. New York: Dekker; 1997. p.1-35.
26. Emery JL, Mithal A. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child.* 1960;35:544-7.
27. Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax.* 1962;17:320-8.
28. Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol.* 1998;275:110-7.
29. Margraf LR, Tomashefski JF, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol.* 1991;143(2):391-400.
30. Pereira DM, Silva IF, Silva BAK, Aydos RD, Carvalho PTC, Odashiro NA, Oliveira LVF. Effect of high concentration of oxygen (hyperoxic) by long time in the lung tissue of wistar rats. *Revista Biociências, UNITAU.* 2008;14(2):110-6.