

Comparação entre duas técnicas de análise de fibras elásticas pulmonares em coelhos prematuros

Comparison between two techniques of analysis of lung elastic fibers in premature rabbits

Fernanda Polastri Thereza¹; Mariana Mendes Silva¹; Rodrigo Leonel dos Santos¹; Bruno Garcia de Aquino¹; Celso Moura Rebello²; Renata Suman Mascaretti³; Roberta Munhoz Manzano⁴

¹Fisioterapeutas – Faculdades Integradas de Bauru. Bauru, SP – Brasil.

²Doutor em Ciências (Pediatria), Faculdade de Medicina – USP; Médico Neonatologista do Hospital Israelita Albert Einstein; Professor Doutor do Departamento de Pediatria da FMUSP – Disciplina de Pediatria Neonatal. São Paulo, SP – Brasil.

³Doutora em Ciências (Pediatria), Faculdade de Medicina – USP; Médica Neonatologista do Hospital Promatre Paulista. São Paulo, SP – Brasil.

⁴Doutora em Ciências (Pediatria), Faculdade de Medicina – USP; Fisioterapeuta, Docente do curso de Fisioterapia das Faculdades Integradas de Bauru. Bauru, SP – Brasil.

Endereço para correspondência

Roberta Munhoz Manzano
R. Bartolomeu de Gusmão, nº 2-102, Apto. 24, Jardim América
17017-336 – Bauru – SP [Brasil]
roberta_m_m@hotmail.com

Resumo

Introdução: A displasia broncopulmonar se caracteriza por um bloqueio no desenvolvimento pulmonar. **Objetivo:** Comparar a eficiência de duas técnicas de análise de fibras elásticas em pulmão de coelhos prematuros. **Métodos:** Coelhos prematuros nascidos no 28º e 29º dia de gestação foram submetidos a ar ambiente ou oxigênio, durante 11 dias, após serem randomizados nos quatro grupos, a seguir: AR28, O₂28 (FiO₂ ≥ 95%), AR29 e O₂29 (FiO₂ = 80%). Os pulmões foram retirados e corados para análise de fibras elásticas. Foram utilizados o microscópio Nikon E600 e o programa de análise de imagem (Image-Pro Plus 4.5®). Para a comparação entre a análise microscópica *versus* programa foi utilizado o teste “t” pareado. **Resultados:** Houve diferença significativa entre as formas de análise de fibras elásticas, realizadas no microscópio e no programa (p<0,001). **Conclusão:** As duas formas de análise de fibras elásticas levam a resultados diferentes. Estudos adicionais comparando as duas técnicas são necessários.

Descritores: Displasia broncopulmonar; Tecido elástico; Prematuro.

Abstract

Introduction: Bronchopulmonary dysplasia is characterized by a blockage in lung development. **Objective:** To compare the efficiency of two techniques of analysis of elastic fibers in lungs of premature rabbits. **Methods:** Preterm rabbits born on the 28th and 29th days of gestation were subjected to ambient air or oxygen for 11 days, randomized into four groups, Ar 28 (n=17), O₂ 28 (n= 7), Ar 29 (n=8), O₂ 29 (n=8). The lungs were removed and stained for analysis of elastic fibers. The Nikon E600 microscope and the image analysis software (Image-Pro Plus 4.5®) were used for elastic fiber analysis. To compare the analysis between microscope and program was used paired “t” test. **Results:** There were significant differences between the proportion of elastic fibers performed on the microscope and at the program (p <0.001). **Conclusion:** The two types of analysis of elastic fibers yield different results. Additional studies comparing the two techniques are required.

Key words: Bronchopulmonary dysplasia; Elastic tissue; Infant, premature.

Introdução

O desenvolvimento pulmonar se divide em cinco estágios, a saber: 1º período embrionário – desenvolvimento das vias aéreas maiores (3-4 semanas); 2º período pseudoglandular – desenvolvimento das vias aéreas até os bronquíolos terminais (6-16 semanas); 3º período canalicular – desenvolvimento dos ácinos e da vascularização (16-28 semanas); 4º período sacular – subdivisão dos sáculos (28-36 semanas) e 5º período alveolar – aparecimento dos alvéolos (32 semanas ao termo)¹.

O conceito de prematuridade inclui todo recém-nascido (RN) vivo com menos de 37 semanas completas de gestação (<259 dias). A incidência é variável e depende de características populacionais².

A displasia broncopulmonar (DBP) foi inicialmente descrita por Northway et al., em 1967, como uma lesão pulmonar em recém-nascidos (RN) prematuros submetidos a altas concentrações de oxigênio e à ventilação mecânica agressiva. Constitui uma das principais causas de morbidade entre os recém-nascidos pré-termo, especialmente os extremos, admitidos nas unidades de terapia intensiva neonatal³.

A DBP é uma doença pulmonar crônica com características clínicas, radiológicas e histológicas próprias⁴. Sua incidência aumenta com a diminuição do peso de nascimento e da idade gestacional⁵. Desde a sua descrição, na década de 60, observaram-se grandes progressos na assistência perinatal, tais como o maior uso de corticoide antenatal, a viabilização da terapêutica com o surfactante exógeno e o surgimento de novas técnicas de monitoração não invasiva e de ventilação mecânica. Tais fatos contribuíram para o aumento da sobrevivência de recém-nascidos cada vez mais imaturos⁶. A lesão na DBP ocorre por um mecanismo multifatorial, incluindo a prematuridade, defesas antioxidantes inadequadas e a ativação da resposta inflamatória por vários mecanismos, sendo a exposição ao oxigênio um dos mais importantes^{6,7,8}, e também a ventilação mecânica,

infecção perinatal, baro/volutrauma e persistência de canal arterial⁹. A lesão pulmonar se caracteriza por uma diminuição da septação alveolar e do desenvolvimento vascular, ocorre um bloqueio no desenvolvimento pulmonar e, conseqüentemente, a alveolarização é reduzida^{3,10,11,12,13,14,15,16}.

Na constituição do tecido pulmonar, são encontradas fibras elásticas e colágenas que fornecem elasticidade e força de tensão ao tecido pulmonar¹. As fibras elásticas são finas, onduladas que se anastomosam e têm cor levemente amarelo-vivo. Constituem-se num material elástico e possuem alta resistência e durabilidade. O principal componente das fibras elásticas é a proteína elastina, além de microfibrilas sintetizadas pelos fibroblastos. São encontradas em todos os locais do corpo onde existe a necessidade de elasticidade, como, por exemplo, nas paredes das artérias, em certo tipo de cartilagem e nos pulmões¹⁷.

Há alguns anos os *softwares* para análise de imagem começaram a ser utilizados na patologia para analisar fibras elásticas. Posteriormente, essa análise passou a ser realizada no microscópio, por meio da contagem de pontos. A vantagem desse tipo de programa é não ter o erro de contagem ocasionado por observadores diferentes. Inicialmente, faz-se uma seleção de cores com as lâminas que serão estudadas, realizada por patologistas, e essa seleção “mostra” para o programa o que são fibras elásticas. Após a escolha das cores é realizada a contagem da proporção de fibras elásticas pelo programa, em cada foto tirada das lâminas. O número de artigos com essa nova metodologia ainda é escasso, por isso, o estudo aqui apresentado é importante, uma vez que utiliza esse método mais atual (programa de análise de imagem) e compara com o comumente utilizado (microscópio).

O objetivo neste estudo foi comparar a eficiência de duas técnicas diferentes de análise de fibras elásticas em lâminas pulmonares de coelhos prematuros submetidos ao oxigênio ou ar ambiente.

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 o nascimento, os filhotes foram randomizados entre os grupos de estudo de acordo com a ordem em que nasciam. Nas diversas 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, desde o nascimento, em relação à sobrevivência e, após esse 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; O₂ 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; O₂ 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.[®], 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 animais foi controlado diariamente, antes da primeira alimentação do dia (balança TR 403, Denver Instrument Company[®], Estados Unidos).

A partir do terceiro dia de vida foi iniciada a antibioticoterapia profilática¹⁸ 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 coelha¹⁹, constituída por 5 g de Neocate (Support[®]), 5 g de caseical (Support[®]) e 15 g de trigliceril CM AGE (Support[®]) para 100 ml de leite. Após o terceiro dia de vida, foi adicionada à fórmula uma gota de complexo vitamínico Vitanove[®].

O volume administrado de dieta no primeiro dia de vida foi 100 ml/kg; no segundo, 150 ml/kg e do terceiro ao décimo primeiro dia de vida foi administrado um volume de 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 O₂ 29, e em uma concentração $\geq 95\%$ para os animais do grupo O₂ 28, através de uma câmara de acrílico selada e multiperfurada para evitar acúmulo de dióxido de carbono (CO₂). O controle da concentração de O₂ foi realizado por meio 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 pulmonar.

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 a coloração de resorcína-orceína para a análise de proporção de fibras elásticas.

Proporção de fibras elásticas

A avaliação da proporção das fibras elásticas no tecido pulmonar foi realizada de duas maneiras diferentes, uma utilizando o microscópio; e outra, um programa para análise de imagens.

O microscópio Nikon E600 foi utilizado para a análise morfométrica acoplado a uma grade de 100 pontos e 50 retas de área, sendo examinados 20 campos microscópicos por animal. A análise morfométrica foi realizada por dois investigadores, de maneira cega.

Utilizando a grade no aumento de 400x, em 20 campos por animal, a proporção de fibras no parênquima pulmonar foi determinada pela relação entre o número de pontos que incidiram sobre as fibras coradas e o de pontos que caíram sobre o parênquima pulmonar.

Para a análise de imagem, foi utilizado o analisador de imagens (Image-Pro Plus 4.5®, Media Cybernetics INC™, EUA), de maneira cega, por um único investigador. Em cortes pulmonares corados com resorcína-orceína, fotografados em aumento de 200x, sendo utilizados 20 campos (fotos) em cada lâmina.

Ao iniciar o programa, o arquivo com a foto a ser analisada foi carregado, e a imagem foi calibrada sob um aumento de 200x. A ferramenta do programa *Rectangular AOI* foi selecionada e, por meio dela, calcularam-se as áreas correspondentes ao total da fotografia e ao do parênquima pulmonar (área total menos área do espaço aéreo), ao espaço aéreo e às fibras elásticas. A proporção das fibras elásticas foi calculada de acordo com a fórmula (1):

$$\text{Proporção das Fibras Elásticas} = \frac{\text{Área de Fibra Elástica}}{\text{Área Total} - \text{Área do espaço aéreo}} \quad (1)$$

Foi realizada uma comparação entre as duas técnicas para analisar as fibras elásticas, a contagem manual no microscópio e a contagem no programa para análise de imagem, em cada grupo de estudo.

Análise estatística

Para a comparação de cada grupo em dois momentos diferentes – análise realizada no microscópio x análise realizada pelo *software* de análise de imagem –, foi utilizado o teste “t” pareado para amostras normais ou o teste Wilcoxon, a um nível de significância de 0,05 e um poder de teste de 0,80.

Resultados

Foram realizados 71 partos cesáreos, desse total excluíram-se do estudo seis coelhas, cinco por infecção ovular; e uma, por erro na data do cruzamento. As restantes 65 coelhas grávidas geraram um total de 400 filhotes, dos quais seis foram excluídos por apresentarem malformações grosseiras e um por óbito fetal. Outros 41 recém-nascidos foram excluídos por óbito na primeira hora de vida. Dos 352 coelhos prematuros que sobreviveram, 120 foram alocados no grupo Ar 28; e 232, no O₂ 28. Desses, 38 animais foram sacrificados no 7º dia de vida (19 em cada grupo) para a realização de outro projeto de pesquisa. Dos 314 coelhos restantes, 17 sobreviveram até o 11º dia e constituíram o grupo Ar 28 e 17 filhotes, expostos ao oxigênio, tiveram somente 11 dias de vida, constituindo o grupo O₂ 28. Em relação aos grupos Ar 29 e O₂ 29, foram realizados 40 partos cesáreos com o nascimento de 228 filhotes. Desse número, 91 recém-nascidos foram alocados para o grupo Ar 29; e 137, para o O₂ 29. Foram excluídos, no grupo O₂ 29, 60 animais por óbito, 7 por falha na alimentação, 26 por hipertermia (falha no controle de temperatura da incubadora) e um por perda da identificação. No grupo Ar 29, foram excluídos 34 animais por óbito; e dois, por falha na

alimentação. Sobreviveram até o 11º dia de vida e constituíram os grupos de estudo oito animais no grupo Ar 29; e oito, no O₂ 29.

Foram analisadas 50 lâminas (1.000 campos) de coelhos prematuros pelos seguintes dois métodos: análise no microscópio por contagem de pontos e análise no programa de análise de imagem.

Neste estudo, nas lâminas analisadas pelo microscópio houve uma diminuição na proporção de fibras elásticas nos animais do grupo O₂ 28 com relação ao Ar 28. Quando as fibras elásticas foram analisadas pelo analisador de imagem, verificou-se um aumento na proporção de fibras elásticas nos animais do grupo O₂ 28 com relação ao Ar 28 (Figura 1).

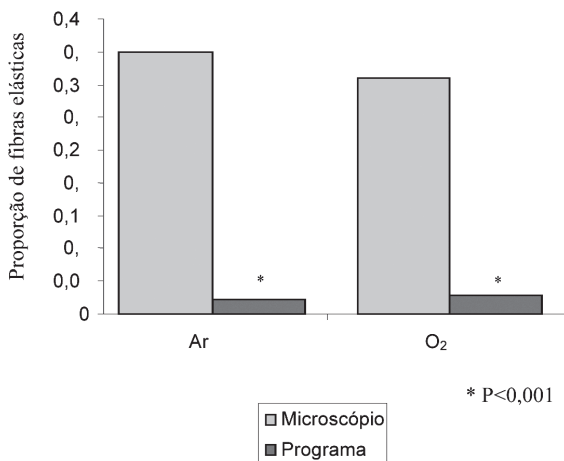


Figura 1: Comparação entre as análises no microscópio e no programa nos grupos Ar 28 e O₂ 28
* valor para comparação entre microscópio x programa

Com relação aos grupos 29 dias (Ar e Oxigênio), a proporção de fibras elásticas aumentou no grupo O₂ 29, com relação ao Ar 29, nas análises realizadas no microscópio e nas efetuadas no programa (Figura 2).

A fotomicrografia das fotos utilizadas para a análise das fibras elásticas no programa de análise de imagem é mostrada na Figura 3.

As análises realizadas no programa de análise de imagem (Image-Pro Plus 4.5®) e no

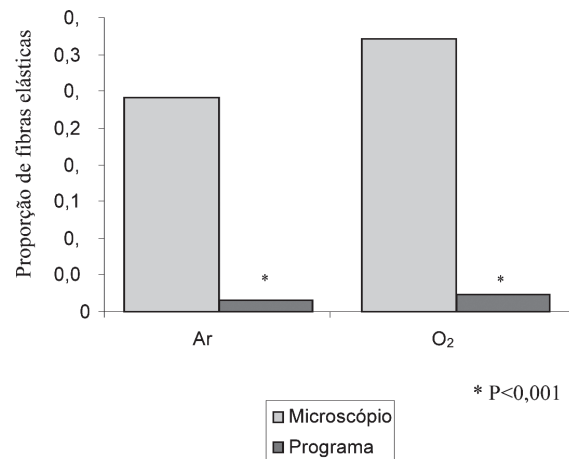


Figura 2: Comparação entre as análises no microscópio e no programa dos grupos Ar 29 e O₂ 29
* valor para comparação entre microscópio x programa

microscópio Nikon E600 são diferentes e possuem entre si uma diferença significativa ($p < 0,001$). No entanto, elas se comportaram da mesma forma, exceto no grupo O₂ 28, pois, quando a análise foi feita pelo microscópio, a proporção de fibras elásticas diminuiu, mas, quando realizada pelo programa de análise de imagem, a proporção aumentou.

Discussão

As duas formas de análise de fibras elásticas descritas neste estudo, pelo microscópio por meio da contagem de pontos e pelo programa de análise de imagem, apresentaram resultados, entre si, com diferença significativa. O efeito da displasia broncopulmonar sobre a proporção das fibras elásticas no pulmão prematuro tem sido bastante estudado; no entanto, a comparação entre as duas formas de análise ainda não foi descrita na literatura.

Ogden et al.²⁰ encontraram em seus estudos um aumento na elastase e outras proteases em pulmões com DBP, por meio de análise microscópica. Chen et al.²¹, ao avaliar lâminas pelo microscópio, encontraram um aumento significa-

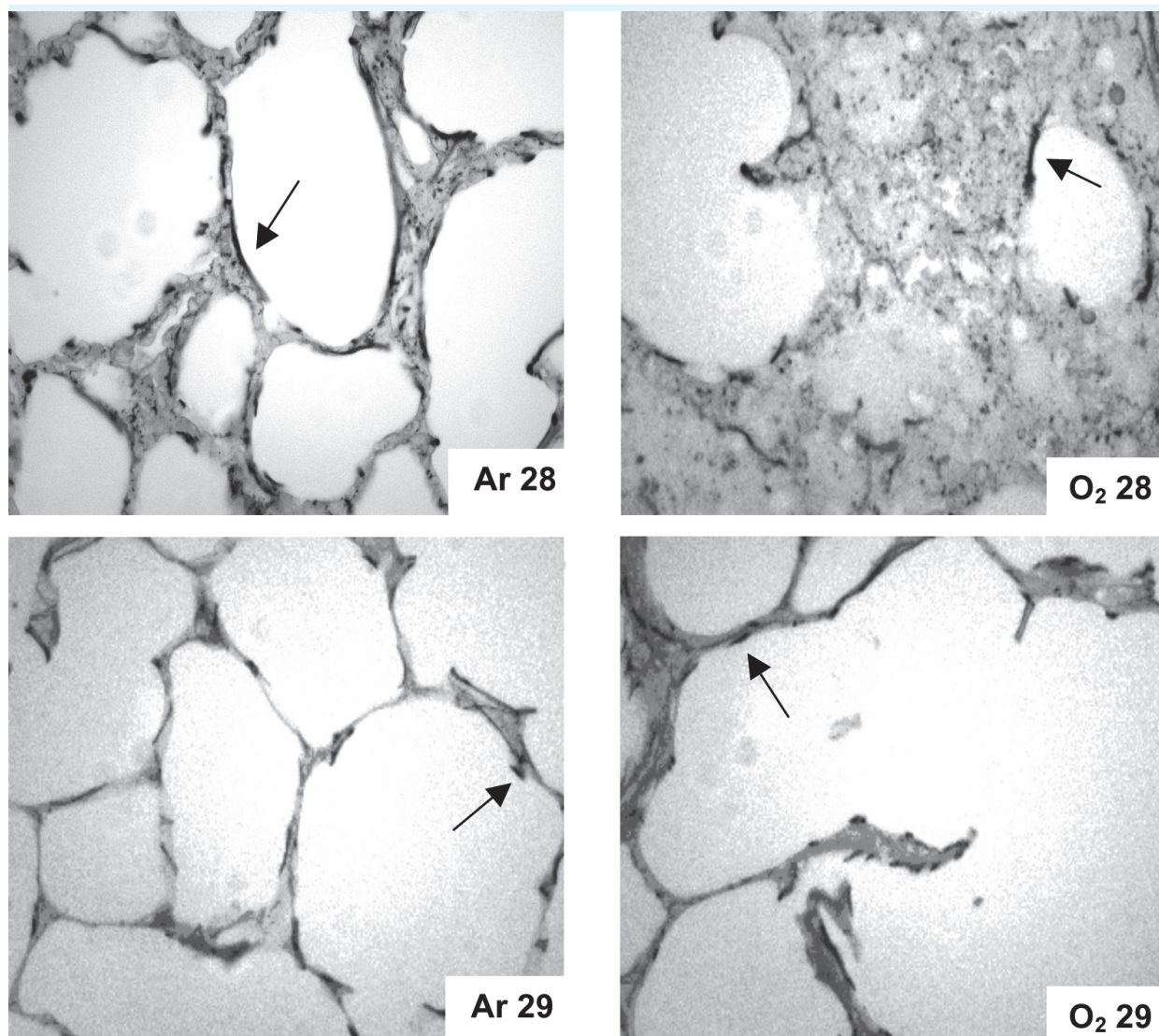


Figura 3: Fotomicrografia das fibras elásticas (setas) nos grupos de estudo, coloração resorçina-orseína, aumento 200x

tivo na elastina de ratos prematuros submetidos a uma $FiO_2 > 95\%$, quando comparados com ratos expostos ao ar ambiente. Coalson²², Coalson et al.²³ e Bland et al.²⁴ descreveram, por intermédio de microscopia, um aumento na deposição de fibras elásticas nas paredes alveolares, além de um aumento e distribuição anormal de elastina nas unidades respiratórias terminais, nos achados patológicos de DBP em crianças. No trabalho aqui apresentado, quando as fibras elásticas foram analisadas pelo programa de análise de imagem, houve um aumento em sua proporção nos animais do grupo O_2 28, com relação ao Ar 28. Referente aos grupos 29 dias (Ar e Oxigênio), a

proporção de fibras elásticas aumentou no grupo O_2 29, comparado ao Ar 29, nas análises realizadas no microscópio e no programa.

Em necropsia de crianças com e sem displasia broncopulmonar usando um microscópio óptico, foi encontrado um aumento na espessura, tortuosidade e distribuição irregular nas fibras elásticas²⁵. Em um estudo, foram analisados cortes histológicos de coelhos prematuros, submetidos à hiperóxia e à restrição nutricional, por meio de um microscópio e não foi detectada a diminuição de fibras elásticas; entretanto, notou-se um aspecto grosseiro das fibras no grupo exposto à restrição nutricional³.

Mascaretti et al.¹³ avaliaram cortes histológicos de coelhos prematuros submetidos à hiperóxia usando um microscópio, sendo detectado espessamento e desorganização nas fibras elásticas.

Por outro lado, Bruce et al.²⁶, utilizando um modelo de hiperóxia em ratos, encontraram, pela análise microscópica, um desarranjo estrutural das fibras elásticas com redução no seu comprimento, porém sem diferença na sua concentração²⁶.

Albertine et al.²⁷ encontraram redução no conteúdo de fibras elásticas, analisadas por programa de análise de imagem, em cordeiros prematuros, após ventilação mecânica prolongada. Eles estudaram ovelhas prematuras ventiladas mecanicamente por três ou quatro semanas e compararam com animais ventilados de forma mecânica, após o nascimento a termo. Para análise das fibras elásticas, foi utilizado o *Bioquant True Color Windows Image Analysis System*, e por meio desse programa eles selecionaram a área de fibras elásticas (roxo) e a área do parênquima (amarelo). A área de fibras elásticas foi dividida pela área do parênquima para calcular a porcentagem da extensão ocupada pelas fibras elásticas. Verificaram ainda os resultados pela contagem de pontos no microscópio, mas esses dados não foram mostrados no artigo²⁷.

Foi descrito em outro trabalho que em pulmões com doença pulmonar crônica, o desenvolvimento das fibras elásticas é retardado, ocorrendo uma diminuição na quantidade das fibras nas paredes dos alvéolos com irregularidade na sua distribuição. Essa análise foi realizada por microscópio óptico e eletrônico²⁸. Nesta pesquisa, as lâminas analisadas pelo microscópio apresentaram uma diminuição na proporção de fibras elásticas nos animais do grupo O₂ 28, o que corrobora os dados de Nakamura et al.²⁸ e Albertine et al.²⁷. No entanto, quando esse mesmo grupo foi analisado pelo programa de análise de imagem, a proporção de fibras elásticas aumentou.

Wu et al.²⁹ analisaram fibras elásticas em ratos prematuros, com idade pós-natal de 6 e

14 dias, pelo programa de análise de imagem *MetaMorph Imaging System* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e encontraram deposição anormal das fibras elásticas no septo alveolar.

Okamoto et al.³⁰ também utilizaram o analisador de imagem (Image-Pro Plus), contudo, avaliaram número, tamanho e área de alvéolos.

A maior limitação deste estudo foi a dificuldade em encontrar artigos que comparem as duas formas de análise.

Conclusões

As duas formas de análise de fibras elásticas – contagem manual realizada no microscópio e contagem efetuada pelo programa de análise de imagem – levam a resultados diferentes, com diferença significativa. No entanto, elas se comportaram da mesma forma, exceto no grupo O₂ 28, pois quando a análise foi feita pelo microscópio a proporção de fibras elásticas diminuiu, mas, quando realizada pelo programa de análise de imagem, a proporção aumentou. Estudos adicionais com uma amostra maior e que comparem ambas as técnicas de análise de fibras elásticas são necessários.

Referências

1. Souza AB, Santos FB, Negri EM, Araújo W, Rocco PRM. Remodelamento do tecido pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo. *J Pneumol.* 2003;29(4):235-45.
2. Rades E, Bittar RE, Zugaib M. Determinantes diretos do parto prematuro eletivo e os resultados neonatais. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004;26(8):655-62.
3. Mataloun MMGB, Rebello CM, Mascaretti RS, Dohlnikoff M, Leone CR. Pulmonary responses to nutritional restriction and hyperoxia in premature rabbits. *J Pediatr.* 2006;82:179-85.
4. Monte LFV, Silva Filho LVF da, Miyoshi MH, Rozov T. Displasia broncopulmonar. *J Pediatr.* 2005;81:99-110.

5. Cunha GS, Mezzacappa Filho F, Ribeiro JD. Fatores maternos e neonatais na incidência de displasia broncopulmonar em recém-nascidos de muito baixo peso. *J Pediatr (Rio J)*. 2003;79(6):550-6.
6. Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol*. 2003;8(1):39-49.
7. Saugstad OD. Oxygen and oxidative stress in bronchopulmonary dysplasia. *J Perinat Med*. 2010;38:571-7.
8. Auten RL Jr, Mason N, Tanaka DT, Welty-Wolf K, Whorton M. Anti-neutrophil chemokine preserves alveolar development in hyperoxia-exposed newborn rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol*. 2001;281:336-44.
9. Bhering CA, Mochdece CC, Moreira MEL, Rocco JR, Sant'Anna GM. Bronchopulmonary dysplasia prediction model for 7-day-old infants. *J Pediatr*. 2007;83(2).
10. Crapo JD, Barry BE, Foscue HA, Shelburne J. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses oxygen. *Am Rev Respir Dis*. 1980;122:123-43.
11. Suguihara C, Lessa AC. Como minimizar a lesão pulmonar no prematuro extremo: propostas. *J Pediatr*. 2005;81(1):69-78.
12. Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, Maniscalco WM. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinato*. 2006;30:171-8.
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. Haafte 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.
15. Deakins KM. Bronchopulmonary dysplasia. *Respiratory Care*. 2009;54(9):1252-62.
16. Vadivel A, Abozaid S, Van Haafte T, Sawicka M, Eaton F, Chen M, Thébaud B. Adrenomedullin promotes lung angiogenesis, alveolar development, and repair. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43:152-60.
17. Glerean A. Manual de histologia: texto e atlas para os estudantes da área da saúde. São Paulo: Atheneu; 2003.
18. Shah M, Bry K, Hallman M. Protective effect of transferring against hyperoxia: a study on premature rabbits. *Pediatr Pulmonol*. 1997;24:429-37.
19. Sogorb F, Damy Sb, Rodrigues Up, Chaguri Icaq. Variação na composição do leite de coelha. *Mem Inst Butantan*. 1991;53:175-80.
20. Ogden BE, Murphy SA, Saunders GC, Pathak D, Johnson JD. Neonatal lung neutrophils and elastase/proteinase inhibitor imbalance. *Am Rev Respir Dis*. 1984;130(5):817-21.
21. Chen Y, Martinez MA, Frank L. Prenatal dexamethasone administration to premature rats exposed to prolonged hyperoxia: a new rat model of pulmonary fibrosis (bronchopulmonary dysplasia). *J Pediatr*. 1997;130(3):409-16.
22. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Seminars in Neonatology*. 2003;8:73-81.
23. Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, Yoder BA. Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(4):1333-46.
24. Bland RD, Albertine KH, Pierce RA, Starcher BC. Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: potential benefits of retinol treatment. *Biol Neonate*. 2003;84:101-2.
25. Margraf LR, Tomashefski JF Jr, Bruce MC, Dahms BB. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(2):391-400.
26. Bruce MC, Pawlowski R, Tomashefski JF Jr. Changes in lung elastic fiber structure and concentration associated with hyperoxic exposure in the developing rat lung. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140:1067-74.
27. Albertine KH, Jones GP, Starcher BC, Bohnsack JF, Davis PL, Cho SC, et al. Chronic lung injury in preterm lambs. Disordered respiratory tract development. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(3):945-58.
28. Nakamura Y, Fukuda S, Hashimoto T. Pulmonary elastic fibers in normal human development and in pathological conditions. *Pediatr Pathol*. 1990;10(5):689-706.
29. Wu S, Platteau A, Chen S, McNamara G, Whitsett J, Bancalari E. Conditional overexpression of connective tissue growth factor disrupts postnatal lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42:552-63.
30. 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.