

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PREDITORES CLÍNICOS E LABORATORIAIS PARA DISPLASIA  
BRONCOPULMONAR EM RECÉM- NASCIDOS PRÉ-TERMO DE  
MUITO BAIXO PESO AO NASCER**

**CAMILA PIQUI NASCIMENTO**

**UBERLÂNDIA**

**2018**

**CAMILA PIQUI NASCIMENTO**

**PREDITORES CLÍNICOS E LABORATORIAIS PARA DISPLASIA  
BRONCOPULMONAR EM RECÉM- NASCIDOS PRÉ-TERMO DE  
MUITO BAIXO PESO AO NASCER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Área de concentração:** Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo

**Co-orientadores:** Dr<sup>a</sup>. Vania Olivetti Steffen Abdallah e Dr. Luiz Ricardo Goulart

**UBERLÂNDIA**

**2018**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

N244 2018	<p>Nascimento, Camila Piqui, 1989- Preditores clínicos e laboratoriais para displasia broncopulmonar em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer [recurso eletrônico] / Camila Piqui Nascimento. - 2018.</p> <p>Orientadora: Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo. Coorientadora: Vania Olivetti Steffen Abdallah. Coorientador: Luiz Ricardo Goulart. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2134">http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di. 2019.2134</a> Inclui bibliografia.</p> <p>1. Ciências médicas. I. Azevedo, Vivian Mara Gonçalves de Oliveira , 1981-, (Orient.). II. Abdallah, Vania Olivetti Steffen , , (Coorient.). III. Goulart, Luiz Ricardo, , (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. V. Título.</p>	CDU: 61
--------------	---	---------

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Camila Piqui Nascimento.

**Preditores clínicos e laboratoriais para displasia broncopulmonar em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso ao nascer.**

**Presidente da banca (orientador):** Profa. Dra. Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

### **Banca Examinadora**

**Titular:** Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

**Instituição:** Universidade Federal de Uberlândia

**Titular:** Prof. Dra. Magda Regina Silva Moura

**Instituição:** Faculdade Medicina IMEPAC, Araguari

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela oportunidade da vida e do aprendizado diário.

A **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vivian Mara Gonçalves de Oliveira Azevedo**, pelo suporte e orientação durante toda essa caminhada, por confiar na minha capacidade, pela amizade, pelo cuidado e, sobretudo, sua paciência em todos os momentos.

A **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vânia Olivetti Steffen Abdallah** e o **Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart**, pela oportunidade e pelo aprendizado adquirido em cada encontro.

Aos colegas do Laboratório Nanobiotecnologia, **Aline Teodoro de Paula, Patrícia Terra e Larissa Prado Maia**, pelo apoio e auxílio nas análises, pelo amparo e paciência nos momentos de dúvidas.

Aos meus amigos do Núcleo de Pesquisa e Prevenção do Hospital do Câncer (NUPPEC), **Eduarda, Etelvina, Felipe, Patrícia e Thais**, que me apoiaram, incentivaram e encorajaram em todos os momentos, que tiveram paciência com as minhas ausências, que me auxiliarem nos momentos de dúvidas e se alegraram com a minha conquista.

Aos meus pais, **Agmar e Lucivânia**, por toda a dedicação a minha formação profissional, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu irmão, **Eduardo**, pela torcida e apoio para que este momento acontecesse.

Ao **Tarcio e a Meg**, pela compreensão devido a minha ausência em vários momentos, por me fortalecer nos momentos de dificuldades, por serem o meu consolo nos momentos de desespero e a minha alegria nos momentos de tristeza.

Às agências brasileiras de financiamento, **CNPq, CAPES e FAPEMIG**, por fornecer apoio financeiro ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Teranótics e Nanobiotecnologia - INCT-TeraNano (CNPq / CAPES / FAPEMIG, números de Subsídios CNPq-465669 / 2014-0 E FAPEMIG-CBB-APQ-03613-17).

A todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

## RESUMO

**Introdução:** A displasia broncopulmonar (DBP) é uma doença multifatorial que possui características clínicas, radiológicas e histológicas específicas, definida como a dependência de oxigênio em concentrações acima de 21% por um período  $\geq 28$  dias e/ou nas 36 semanas de idade pós-menstrual. Atualmente, não existem parâmetros clínicos ou biomarcadores para a sua predição. **Objetivo:** Identificar biomarcadores clínicos e laboratoriais preditivos para displasia broncopulmonar em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso. **Material e Métodos:** Analisamos uma coorte prospectiva de 40 neonatos com idade gestacional  $<34$  semanas, com peso  $<1.500$  g e que não apresentavam malformações congênitas. Os prematuros foram divididos em dois grupos: 19 sem DBP e 21 com DBP. Uma análise das variáveis clínicas, coleta de sangue entre 36 e 48 horas de vida e quantificação de duas citocinas (GM-CSF e eotaxina) foram realizadas através de um sistema multiplex. **Resultados:** As características maternas foram homogêneas, e entre as características neonatais, o tempo de ventilação mecânica foi fundamental para o desenvolvimento da doença. As duas citocinas foram altamente significativas no segundo dia de vida. Os níveis de GM-CSF apresentaram valores significativamente maiores no grupo com DBP ( $p = 0,002$ ), enquanto a eotaxina apresentou níveis mais elevados no grupo sem DBP ( $p = 0,02$ ). A relação entre GM-CSF e eotaxina determinou 100% de sensibilidade e 80% de especificidade para VMI (área ROC = 0,9013, IC = 0,7791-1,024,  $p < 0,0001$ ). **Conclusões:** O tempo de duração da VMI realizado nas primeiras 48 horas de vida nos recém-nascidos com baixo peso ao nascer é um preditor clínico significativo da DBP. O uso de VMI contínua está associado ao aumento da razão entre GM-CSF e eotaxina, sugerindo aumento da lesão pulmonar e consequente progressão da doença.

**Palavras-chave:** Displasia Broncopulmonar, Biomarcadores, Recém-Nascido de muito Baixo Peso, Recém-Nascido Prematuro.

## ABSTRACT

**Background:** Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a multifactorial disease that has specific clinical, radiological and histological features, defined as the oxygen dependence at concentrations above 21% for a period  $\geq 28$  days and / or at 36 weeks post- menstrual. Currently, there are no clinical parameters or biomarkers for its prediction. **Objective:** To identify clinical and laboratory biomarkers predictive of bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight preterm infants. **Methods:** We analyzed a prospective cohort of 40 neonates with gestational age  $<34$  weeks, weighing  $<1500$  g, and who did not present congenital malformations. Preterm infants were divided into two groups: 19 without BPD and 21 with BPD. An analysis of the clinical variables, blood collection between 36 and 48 h of life, and quantification of two cytokines (GM-CSF and eotaxin) were performed through a multiplex system. **Results:** Maternal characteristics were homogeneous, and among neonatal characteristics, the time of mechanical ventilation was critical for development of the disease. The two cytokines were highly significant on the second day of life; GM-CSF levels presented a significantly higher values in the BPD group ( $p = 0.002$ ), while eotaxin presented higher levels in the group without BPD ( $p = 0.02$ ). The ratio between GM-CSF and eotaxin determined 100% sensitivity and 80% specificity for IMV (ROC area = 0.9013, CI = 0.7791–1.024,  $p < 0.0001$ ). **Conclusions:** The IMV duration time performed in the first 48 hours of life in the low birth weight neonates is a significant clinical predictor of BPD. The use of continuous IMV is associated with increased ratios between GM-CSF and eotaxin, suggesting increased lung injury and consequently progression of the disease.

**Key-words:** Bronchopulmonary Dysplasia, Biomarkers, Infant, Very Low Birth Weight, Infant, Premature.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAP	Canal Arterial Persistente
CPAP	Pressão Positiva Contínua nas Vias Aéreas
DBP	Displasia Broncopulmonar
FiO <sub>2</sub>	Fração Inspirada de Oxigênio
GM-CSF	Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos-Macrófagos
IL-1 $\beta$	Interleucina-1beta
IL-1RA	Antagonista do Receptor de IL-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
MBP	Muito Baixo Peso ao Nascer
NHLBI	Instituto Nacional do Sangue, Pulmão e Coração
NICHD	Instituto Nacional de Saúde Da Criança E Desenvolvimento Humano
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORD	Departamento de Doenças Raras
RCIU	Restrição do Crescimento Intrauterino
RNMBP	Recém-Nascidos de Muito Baixo Peso
RNPT	Recém-Nascidos Pré-Termo
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformador Beta
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VMI	Ventilação Mecânica Invasiva
VNI	Ventilação Não-Invasiva

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Considerações Iniciais .....	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	13
2.1 Prematuridade .....	13
2.2 Displasia Broncopulmonar .....	14
2.2.1 Definição .....	14
2.2.2 Patogenia e fatores predisponentes .....	16
2.2.2.1 Fatores pré-natais .....	16
2.2.2.2 Fatores pós-natais .....	18
2.2.3 Medidas preventivas .....	19
2.2.4 Tratamento .....	20
2.3 Biomarcadores .....	21
3. OBJETIVOS .....	24
3.1 Geral .....	24
3.2 Específicos .....	24
4. ARTIGO 1 .....	25
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	43
6. CONCLUSÃO .....	46
7. PERSPECTIVA .....	47
REFERÊNCIAS .....	48
ANEXO .....	55
APÊNDICE .....	63

## 1. Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano nascem cerca de 15 milhões de recém-nascidos pré-termo (RNPT) e a mortalidade no período neonatal é a maior causa das mortes nos primeiros 5 anos de vida. O Brasil encontra-se no grupo dos 10 países com o maior número de nascimentos prematuros (LIU et al., 2016; WHO, 2018).

A implementação de novas terapias, como corticoide antenatal, o surfactante e a ventilação não invasiva no cuidado ao RNPT de muito baixo peso ao nascer (MBP), vem aumentando a sobrevivência destes. No entanto, o manejo inadequado desses recursos aumenta as morbidades decorrentes da internação, principalmente a displasia broncopulmonar (DBP) (STROUSTRUP; TRASANDE, 2010; WHO, 2015).

A DBP é uma doença multifatorial que possui características clínicas, radiológicas e histológicas específicas, definida como a dependência de oxigênio em concentrações acima de 21% por um período  $\geq 28$  dias e/ou nas 36 semanas de idade pós-menstrual (EHRENKRANZ et al., 2005; NORTHWAY; ROSAN; PORTER, 1967; STROUSTRUP; TRASANDE, 2010).

Nos últimos anos, foram identificadas mudanças nas características clínicas da doença, o que tem levado os pesquisadores a reconhecerem a necessidade de redefini-las para o contexto atual (BANCALARI; JAIN, 2018; JOBE; STEINHORN, 2017). A ocorrência de DBP em RNPT com extremo baixo peso ao nascer (<1000g) varia de 30 a 75%, e a agressão ao tecido pulmonar em desenvolvimento resulta em desorganização do processo maturativo normal. As consequências desta desorganização, a longo prazo, incluem a doença pulmonar crônica, asma, hipertensão pulmonar, hospitalizações frequentes, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e também no aumento da mortalidade. Todos estes fatores exercem um impacto econômico significativo no sistema de saúde (CARVALHO; SILVEIRA; PROCIANOY, 2013).

Mesmo com as alterações das características da doença e o avanço tecnológico, a incidência da DBP continua alta (ÁLVAREZ-FUENTE et al., 2017; STROUSTRUP; TRASANDE, 2010). A maior ocorrência de DBP acontece quando a suplementação de oxigênio é realizada por longos períodos, uma vez que esta provoca lesões na estrutura pulmonar (CIUFFINI; ROBERTSON; TINGAY, 2018; KJELLBERG et al., 2013).

Algumas estratégias apresentam-se efetivas na redução da DBP, como a utilização da ventilação não-invasiva (VNI) (WHO, 2015). Neste sentido, a descoberta de biomarcadores que caracterizam o perfil inflamatório que antecede a doença e a associação destes com indicadores clínicos e o tempo de ventilação mecânica invasiva (VMI) poderiam minimizar os riscos e as consequências da DBP.

### 1.1. Considerações Iniciais

A formatação desta dissertação segue o modelo alternativo proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Uberlândia que especifica a necessidade de inclusão de artigos científicos.

Primeiramente, será apresentada uma fundamentação teórica como forma de revisão da literatura sobre os temas abordados na tese. Posteriormente, será apresentado um manuscrito elaborado a partir dos dados obtidos neste estudo.

O primeiro manuscrito intitulado “**Clinical and laboratory predictors for bronchopulmonary dysplasia in preterm infants**” refere-se à avaliação de 2 biomarcadores no sangue periférico no segundo dia de vida e evolução clínicas de RNPT MBP. Os 40 RN foram divididos em 2 grupos (19 sem DBP e 21 com DBP) e foi identificado a ventilação mecânica invasiva como um possível marcador e o aumento da razão entre GM-CSF (Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos-Macrófagos) e Eotaxina, sugere um aumento da lesão pulmonar e

consequente progressão da doença. Esse artigo foi submetido para a revista Pediatrics e encontra-se em avaliação.

## 2. Fundamentação Teórica

### 2.1. Prematuridade

Considera-se como RNPT, todo aquele que nasce antes das 37 semanas de gestação. De acordo com a idade gestacional, classifica-se como: prematuro extremo (< 28 semanas), muito prematuro (28 a 32 semanas) e prematuro moderado a tardio (32 a 37 semanas) (WHO, 2018). Quanto ao peso de nascimento, classifica-se como: extremo baixo peso (> 1000g), muito baixo peso (1500 a 1000 g) e baixo peso (2500 a 1500 g) (BRASIL, DATASUS, [s.d.]).

O Brasil encontra-se no grupo dos 10 países com o maior número de nascimentos prematuros (WHO, 2018). Segundo o relatório anual de 2016 da rede brasileira de pesquisas neonatais, cerca de 99,4% dos nascimentos com peso abaixo de 1500g eram de RNPT, 55,6% receberam surfactante durante a internação, 12,6% estavam em uso de oxigênio com 36 semanas de idade corrigida e a sobrevida média foi de 74,7% (“Relatórios Anuais”, [s.d.]).

Em 2005, estima-se que no mundo houve 12,8 milhões de nascimentos prematuros, uma taxa equivalente a 9,6% dos nascimentos. As maiores taxas de nascimentos prematuros encontram-se na África com 11,9% (4 milhões) e na América do Norte com 10,6% (0,48 milhões), enquanto na Europa houve 6,2% (0,47 milhões), na Ásia 9,1% (6,9 milhões) e América do Sul e Caribe com 8,1% (0,93 milhões) (BECK et al., 2010).

Em 2010, o índice de prematuridade mantém-se similar a 2005, pois os países de baixa e média renda apresentaram cerca de 13,7 milhões de nascimentos prematuros, o que equivale a um percentual de 11,3% dos nascimentos. Os maiores percentuais de nascimentos precoces se encontram na Ásia e África Subsaariana. Já na América Latina e Caribe houve cerca de 929 mil nascimentos prematuros, o que equivale 8,6% dos nascimentos deste período (LEE et al., 2013).

Nos Estados Unidos a mortalidade, sobrevivência com morbidades e sobrevivência sem morbidade dos recém-nascidos de muito baixo peso (RNMBP), no decorrer dos anos não apresentaram mudanças significativas (FANAROFF et al., 2007). No entanto, nos últimos 10 anos, foram identificados que os fatores de risco para esses nascimentos estão relacionados a idade materna, raça e etnia, nível educacional, tabagismo durante a gestação e paridade (RATNASIRI et al., 2018).

Muitos dos nascimentos de RNMBP que acontecem na África e na Ásia, foram de recém-nascidos a termo, o que não diminuiu o risco da mortalidade nos primeiros dias de vida e atraso no desenvolvimento dos mesmos. Já na América Latina, a maioria dos nascimentos de RNMBP foram prematuros, o que mantém o risco elevado de mortalidade e morbidade (KATZ et al., 2013).

A mortalidade dos RNPT em países de baixa renda é maior devido falta de estrutura para lidar com as medidas de controle de temperatura e de incentivo ao aleitamento materno. Já nos países de maior renda, a mortalidade é muito baixa, uma vez que estes possuem tecnologia e recursos humanos de excelência. Por este motivo, a OMS formulou as recomendações sobre as intervenções para melhorar os desfechos clínicos nos partos prematuros (Anexo A), sendo elas, medidas de baixo custo mas que diminuem a mortalidade e a morbidade dos nascimentos precoces (WHO, 2015).

## **2. 2. Displasia broncopulmonar**

### **2.2.1. Definição**

A displasia broncopulmonar é uma doença pulmonar crônica com características clínicas, radiológicas e histológicas próprias (MONTE et al., 2005). É definida clinicamente como a necessidade de oxigênio suplementar às 36 semanas de idade pós-menstrual, fator que pode interferir na saúde pulmonar

principalmente dos RNPT extremos (MCEVOY et al., 2014). Outra definição clínica usualmente utilizada é o uso de oxigênio suplementar aos 28 dias de vida com alterações radiográficas (BANCALARI; JOBE, 2000).

A definição fisiológica de DBP é avaliada com 36 semana de idade pós-menstrual, momento em que são retirados os dispositivos ventilatórios e a criança se mantém, por um período de 30 minutos, em ar ambiente. Segundo a classificação, aquelas sem DBP manteriam a saturação  $\geq 90\%$  e as com DBP, saturação  $< 90\%$  (WALSH et al., 2004).

Na conferência, realizada nos Estados Unidos, em 2000, organizada pelo Instituto Nacional de Saúde da Criança e Desenvolvimento Humano (NICHD) e Instituto Nacional do Sangue, Pulmão e Coração (NHLBI) em conjunto com o Departamento de Doenças Raras (ORD), foi criado um consenso com a definição da DBP e os graus de gravidade da doença (BANCALARI; JOBE, 2000; MONTE et al., 2005; SÁNCHEZ LUNA et al., 2013).

Durante este Workshop, classificou-se a DBP como: leve, moderada e grave. O grau leve é considerado quando há necessidade de oxigênio suplementar por um período  $\geq 28$  dias após o nascimento, estando o RN em respiração espontânea e em ar ambiente nas 36 semanas pós-menstrual, ou nas 32 de idade gestacional ou com 56 dias após o nascimento. Considerou-se como grau moderado a necessidade oxigênio suplementar por um período  $\geq 28$  dias após o nascimento e uma fração inspirada de oxigênio ( $FiO_2$ )  $< 30\%$  nas 36 semanas pós-menstrual, ou nas 32 de idade gestacional ou com 56 dias após o nascimento. O grau grave foi considerado quando há necessidade de oxigênio por um período  $\geq 28$  dias e  $FiO_2 > 30\%$  e/ou pressão positiva contínua nas vias aéreas (CPAP nasal) ou VMI nas 36 semanas pós-menstrual, ou nas 32 de idade gestacional ou com 56 dias após o nascimento (BANCALARI; JOBE, 2000; MONTE et al., 2005; SÁNCHEZ LUNA et al., 2013).

A DBP é uma das poucas doenças em que a definição se dá de acordo com o tratamento e não pela fisiopatologia ou quadro clínico (BANCALARI; JAIN,

2018). Neste sentido, atualmente, a definição doença gera várias confusões no momento de sua classificação, pois neonatos não recebem o diagnóstico no momento adequado. Exemplos destes casos são evidenciados quando o RNPT vai a óbito antes das 36 semanas, ou recebe o diagnóstico, mas não o tem, nos casos de RNPT que estão em uso do oxigênio, mas a causa que gerou a necessidade desta terapêutica não é respiratória. Por esta falta de precisão, a gravidade da doença muitas vezes não é avaliada ou ainda, não há valores preditivos fidedignos para resultados pulmonares e de desenvolvimento neurológico posteriores (BANCALARI; JAIN, 2018; JOBE; BANCALARI, 2017; JOBE; STEINHORN, 2017).

### **2.2.2. Patogenia e fatores predisponentes**

São multifatoriais os fatores envolvidos na patogênese da DBP e podem ser pré-natais (intrínsecos) e pós-natais (extrínsecos). A prematuridade é a principal causa para o desenvolvimento da DBP (SOLA et al., 2018), decorrente da interrupção do crescimento pulmonar adequado devido ao nascimento prematuro (JOBE, 2012).

A idade gestacional do nascimento determina em qual período do desenvolvimento pulmonar fetal o recém-nascido se encontra, uma vez que o desenvolvimento inicia nas primeiras semanas de gestação e finaliza na primeira infância. Os estágios de maturação pulmonar são: embrionário (4 a 7 semanas), pseudoglandular (7 a 17 semanas), canalicular (17 a 25 semanas), sacular (24 a 36 semanas) e alveolar (36 semanas a 3 anos). Por isso, quanto menor a idade gestacional de nascimento, mais imaturo se encontra a estrutura pulmonar (BAKER; ALVIRA, 2014; MCEVOY et al., 2014).

#### **2.2.2.1. Fatores pré-natais**

Há estudos que indicam que algumas crianças possuem uma susceptibilidade genética para o desenvolvimento de DBP. Entretanto, ainda há necessidade de mais estudo para definir a via de sinalização específica para a doença (AMBALAVANAN et al., 2015; JOBE, 2012; THEKKEVEEDU; GUAMAN; SHIVANNA, 2017).

Corioamnionite, inflamação das membranas placentárias córion e âmnio, foi considerada como um dos fatores de risco para DBP, mas verificou-se que a corioamnionite clinicamente diagnosticada possui uma baixa ligação com os resultados patológicos da corioamnionite. Portanto, estudos que incluíram pacientes com diagnóstico clínico sem confirmação patológica podem não refletir uma verdadeira associação entre a corioamnionite e a DBP. Além disso, estudos demonstraram que a inflamação intrauterina não é um fator de risco independente para a DBP, mas sim as sequelas associadas como a sepse neonatal, que aumentam as chances de desenvolver DBP (BALLARD et al., 2016; HARTLING; LIANG; LACAZE-MASMONTEIL, 2012; THEKKEVEEDU; GUAMAN; SHIVANNA, 2017; TORCHIN et al., 2017).

A corticoterapia antenatal tem o objetivo de acelerar a maturação pulmonar e reduzir as síndromes do desconforto respiratório (CROWLEY; CHALMERS; KEIRSE, 1990; NIH, 1995). A exposição a corticosteróides no período pré-natal foi associada com menores taxas de mortalidade e morbidades hospitalares, principalmente, quando administrados em mulheres com trabalho de parto prematuro entre 23 a 34 semanas de gestação (TRAVERS et al., 2017).

A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) indica uma desregulação no processo de início e fim da alveolarização pulmonar, e, conseqüentemente, risco aumentado para DBP. Em modelos animais, foi observado alterações em miRNA de camundongos com RCIU e distúrbio da alveolarização pulmonar (DRAVET-GOUNOT et al., 2017; ZANA-TAIEB et al., 2013, 2015).

Os distúrbios hipertensivos maternos, como a hipertensão gestacional e a pré eclampsia, isoladamente não são fatores predisponentes a DBP, porém em

conjunto com a RCIU ou o tabagismo materno, podem estar relacionados a doença (MORROW et al., 2017; TORCHIN et al., 2016).

A exposição fetal ao tabaco gera hipoalveolarização, diminuição da angiogênese e produção de proteína tensoativo, o que predispõe DBP e doenças obstrutivas crônicas (SINGH et al., 2013). Além disso, o hábito tabagista materno está relacionado a necessidade de VMI por tempo prolongado e doenças respiratórias tardia durante a infância (MORROW et al., 2017).

#### **2.2.2.2. Fatores pós-natais**

O uso oxigênio suplementar é essencial para evitar a hipóxia em RNPT com insuficiência respiratória, porém, o seu uso desmedido pode gerar lesões causadas pelo estresse oxidativo. O aumento da produção de metabólitos reativos e/ ou radicais livres ao oxigênio que são tóxicos e danificam ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e carboidratos e induz a alteração e remodelamento estrutural pulmonar (SOLA et al., 2018).

Sabe-se que a VMI induz lesões pulmonares como a necrose, apoptose e inflamação, o que compromete as células epiteliais alveolares I e II, fibroblastos, células endoteliais e altera a barreira alvéolo-capilar (BHANDARI, 2016; KROON et al., 2013; KUHN et al., 2017; SUTHERASAN; VARGAS; PELOSI, 2014). Estudos prévios demonstraram que o aumento do tempo de VMI causam deformidade estrutural pulmonar e, conseqüentemente, prejuízo na ventilação/perfusão e maior dependência do oxigênio (CIUFFINI; ROBERTSON; TINGAY, 2018; KJELLBERG et al., 2013). Neste sentido, reforça a indicação da utilização da VNI na condução da síndrome do desconforto respiratório em prematuros de muito baixo peso ao nascer, na tentativa de evitar efeitos prejudiciais da VMI (AFJEH et al., 2017; DAVIS; HENDERSON-SMART, 2003; KÖNIG; GUY, 2014; KUHN et al., 2017; MILLER; CARLO, 2008; SWEET et al., 2017).

A sepse precoce e tardia desencadeia respostas inflamatórias que predis põe o desenvolvimento de DBP. Essa condição pode estar relacionada com a presença do canal arterial persistente (CAP), aumentando a incidência de DBP. O excesso de líquido ou a diurese inadequada nos primeiros dias de vida, favorece a persistência ou a reabertura do canal arterial, aumentando o fluxo sanguíneo pulmonar que induz o surgimento de edema pulmonar, estes fatores aumentam a incidência de DBP (SOLA et al., 2018).

A nutrição inadequada no primeiro mês de internação influencia no crescimento corporal, maturação e reparação de lesões pulmonares, aumenta o efeito deletério do oxigênio e está associado com a ruptura alveolar (SOLA et al., 2018).

### **2.2.3. Medidas Preventivas**

Tem se optado pela ventilação não invasiva (VNI), incluindo ventilação com pressão positiva contínua nasal, ventilação com pressão positiva de dois níveis (biPAP) e cânulas nasais de alto fluxo, no manuseio da síndrome do desconforto respiratório. A combinação profilática de surfactante exógeno e ventilação por pressão positiva mostraram redução no desfecho de morte e DBP, o que reforça as recomendações de estratégias menos invasivas no tratamento de RNPT. Outra técnica que tem sido usada é a administração de surfactante profilático seguido de extubação rápida (INSURE ou INTubate, SURfactant, Extubate) (DAVIDSON; BERKELHAMER, 2017; PRINCIPI; DI PIETRO; ESPOSITO, 2018). E o método que tem sido considerado mais eficaz é o "LIST", significa terapia com surfactante menos invasivo. No RNPT que respira espontaneamente, o surfactante é instilado através de um cateter intratraqueal fino, há estudos que mostram uma menor prevalência de DBP (SOLA et al., 2018).

Finalmente, para os recém-nascidos que necessitam de intubação, um teste de extubação precoce é incentivado para reduzir potencialmente os riscos de lesão pulmonar induzida pelo ventilador (DAVIDSON; BERKELHAMER, 2017; PRINCIPI; DI PIETRO; ESPOSITO, 2018).

#### **2.2.4. Tratamento**

A vitamina A tem sido utilizada como uma forma de tratamento na tentativa de evitar lesões pulmonares. Esta vitamina desempenha um papel importante no crescimento, diferenciação e manutenção de células epiteliais das vias aéreas. Com o nascimento prematuro, os RNPT nascem com baixos níveis de vitamina A, pois o maior acúmulo acontece no terceiro trimestre de gestação. Estudos evidenciaram a redução da dependência de oxigênio em RNMBP após as 36 semanas pós menstruais e uma pequena queda no risco de morte com o uso de vitamina A. Ainda estão sendo testados a melhor forma de apresentação da medicação para o tratamento da DBP, se na forma de injeção intramuscular, via oral ou via endovenosa (ARAKI et al., 2018; DARLOW; GRAHAM; ROJAS-REYES, 2016).

A Cafeína também tem sido usada pra evitar a apneia da prematuridade. O início precoce da cafeína resulta em menor incidência de DBP e menor tempo de suporte respiratório (SCHMIDT et al., 2006). O mecanismo específico pelo qual a cafeína protege a lesão pulmonar ainda não está claro, e melhores resultados podem ter sido causados pela diminuição da duração da VMI (DAVIDSON; BERKELHAMER, 2017).

A terapia inovadora e promissora para DBP é o uso de células mesenquimais estromais derivadas do cordão umbilical. Evidências mostram que estas exercem forte atividade antiinflamatória, antifibróticas, antiapoptóticas, antioxidativas e proangiogênicas (GUILLOT et al., 2018; THÉBAUD; KOUREMBANAS, 2017). No Canadá iniciou-se recentemente um estudo

experimental no qual os pesquisadores irão avaliar a dose, via e o momento a ser administrado destas células. Ainda não há estudos de acompanhamento e avaliação dos possíveis efeitos a curto e a longo prazo desta terapia (GUILLOT et al., 2018).

### **2.3. Biomarcadores**

Biomarcadores são quaisquer características clínicas, radiológicas, achados ou marcadores de testes laboratoriais que caracterizam a atividade da doença. Estes são úteis para o diagnóstico precoce, a predição da gravidade da doença e a monitorização da evolução e respostas à terapia (LAL; AMBALAVANAN, 2015). É possível a detecção de DBP por meio de biomarcadores em uma fase anterior aos 28 dias, o que poderia prevenir e iniciar precocemente o tratamento. Além disso, há também a possibilidade de se detectar a ausência de risco para o desenvolvimento da DBP, o que evita uso de terapias desnecessárias (LAL; AMBALAVANAN, 2015).

A grande maioria dos biomarcadores relacionados à DBP identificados no sangue são de natureza proteica, estando associados à imunidade, inflamação e estresse oxidativo (RIVERA et al., 2016).

A inflamação é um dos principais fatores para o surgimento da DBP, uma vez que pode ser iniciada por uma resposta inflamatória fetal ou por inflamação pulmonar exacerbada devido ao uso de VMI ou à exposição ao oxigênio suplementar. Em resposta a estas lesões, ocorre uma interação entre proteínas que atraem células inflamatórias (quimiocinas), proteínas que facilitam a migração transendotelial de células inflamatórias dos vasos sanguíneos (moléculas de adesão), proteínas que promovem danos nos tecidos (citocinas e proteases pró-inflamatórias) e proteínas que modulam o processo (citocinas anti-inflamatórias, proteínas de ligação e antagonistas de receptores). Além disso, durante a recuperação da lesão inflamatória, fatores de crescimento e outras substâncias que

controlam o crescimento pulmonar normal e intermedeiam o reparo, influenciam a estrutura pulmonar subsequente (BOSE; DAMMANN; LAUGHON, 2008).

Dentre as várias pesquisas realizadas com biomarcadores sanguíneos, urinários e aspirado brônquico, os pesquisadores tem buscado encontrar algum sinalizador capaz de indicar um diagnóstico e/ou prognóstico para a DBP. Neste sentido, inúmeras substâncias são investigadas. Dentre as citocinas estudadas, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), Interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), interleucina-10 (IL-10), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) tem sido mencionados como indicativos de injuria pulmonar (AMBALAVANAN et al., 2009; BOSE; DAMMANN; LAUGHON, 2008; D'ANGIO et al., 2016; RIVERA et al., 2016).

O fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) é um importante fator de crescimento hematopoiético e modulador imunológico. É produzido por uma variedade de tipos de células, incluindo células T, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos ao receber estímulos imunológicos. Embora o GM-CSF seja produzido localmente, ele pode agir de forma parácrina para recrutar neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes para melhorar suas funções na defesa do hospedeiro (SHI et al., 2006).

O GM-CSF é extremamente importante na maturação dos macrófagos alveolares (HAMILTON; ACHUTHAN, 2013), o que faz com que este exerça dentro do pulmão infectado, a diferenciação, o acúmulo, ativação e localização dos alvéolos infectados pelas células dendríticas e macrófagos alveolares (CHEN et al., 2016).

Um aumento significativo de GM-CSF pode ser encontrado em tecidos locais, como a pele de pacientes alérgicos com reações cutâneas e no pulmão asmático. Suspeita-se que o GM-CSF possui um papel na sensibilização de alérgenos em ar poluído, pois há uma eosinofilia grave, aumento de macrófagos e reações fibróticas quando a transferência de gene GM-CSF é mediada por

adenovírus no pulmão (SHI et al., 2006). Ainda não há estudos que investigaram a associação desta citocina com o surgimento da DBP, no entanto, como esta pode estar relacionada a lesões pulmonares, faz-se necessário avaliar a relação do GM-CSF com a VMI e o eotaxin.

O eotaxina é da família das quimiocinas CC ou beta quimiocinas que possuem a função de estimular os monócitos, mas também os basófilos, eosinófilos, linfócitos-T e as células natural killer. Esta citocina, especificamente, é responsável pela migração dos eosinófilos e basófilos. Existem indícios em que na presença de eosinófilos acumulados em reações alérgicas inflamatórias, como na asma, há ativação dessas células, o que pode gerar lesão tecidual e disfunção pulmonar (PALOMINO et al., 2015).

Sabe-se que há uma tendência dos RNPT desenvolverem eosinofilia após o nascimento, principalmente, devido aos procedimentos e intervenções sofridos durante a internação (YEN et al., 2010). Há relatos de que em RNPT de extremo baixo peso ao nascer e naqueles com DBP, os níveis de eotaxina são mais elevados (KANDASAMY et al., 2015; YEN et al., 2010).

Estudos avaliaram a função pulmonar de crianças, adolescentes e adultos jovens que nasceram prematuramente e desenvolveram DBP, e observaram a persistência de doenças pulmonares, devido a persistência na distorção da arquitetura pulmonar e no comprometimento da função pulmonar. Além disso, uma parte desta população poderá desenvolver asma ou apresentar espirometria anormal. Embora as crianças com DBP tenham sintomas semelhantes aos da asma, é menos provável que demonstrem uma hiperresponsividade das vias aéreas ou resposta aos broncodilatadores, uma vez que podem sofrer estreitamento fixo das vias aéreas periféricas (DAVIDSON; BERKELHAMER, 2017).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Geral**

Identificar biomarcadores clínicos e laboratoriais preditivos para displasia broncopulmonar em recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso.

#### **3.2. Específicos**

- a. Correlacionar biomarcadores sanguíneos de recém-nascidos pré-termo de muito baixo peso com a displasia broncopulmonar;
- b. Avaliar o impacto da ventilação mecânica invasiva, associado a citocinas inflamatórias séricas e indicadores clínicos, no segundo dia de vida.

## 4. Artigo 1

### Clinical and laboratory predictors for bronchopulmonary dysplasia in preterm infants

Camila P. Nascimento, PNP<sup>c</sup>, Larissa P. Maia, PhD<sup>a</sup>, Patrícia T. Alves, PhD<sup>a</sup>, Aline T. Paula, PhD<sup>a</sup>, Jair P. Cunha-Junior, PhD<sup>c</sup>, Vânia O. S. Abdallah, MD, PhD<sup>b,e</sup>, Daniela M. L. M. Ferreira, MD, PhD<sup>b</sup>, Luiz R. Goulart, PhD<sup>a,e</sup>, Vivian M. G. O. Azevedo, RPT, PhD<sup>d,e</sup>

<sup>a</sup>National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology – INCT-TeraNano, Laboratory of Nanobiotechnology, Federal University of Uberlândia; <sup>b</sup>Neonatology Department, Uberlândia University Hospital, Federal University of Uberlândia; <sup>c</sup>Laboratory of Immunochemistry and Immunotechnology, Department of Immunology; <sup>d</sup>Faculty of Physical Education and Physiotherapy of the Federal University of Uberlândia; and <sup>e</sup>Postgraduate Program in Health Sciences of the Federal University of Uberlândia.

#### Abstract

**Background:** Currently, there are no clinical parameters or biomarkers for prediction of BPD. The objective of this study was to evaluate the impact of IMV associated with serum inflammatory cytokines and clinical indicators on the second day of life as predictors of BPD.

**Methods:** We analyzed a prospective cohort of 40 neonates with gestational age <34 weeks, weighing <1500 g, and who did not present congenital malformations. Preterm infants were divided into two groups: 19 without BPD and 21 with BPD. An analysis of the clinical variables, blood collection between 36 and 48 h of life, and quantification of two cytokines (GM-CSF and eotaxin) were performed through a multiplex system.

**Results:** Maternal characteristics were homogeneous, and among neonatal characteristics, the time of mechanical ventilation was critical for development of the disease. The two cytokines were highly significant on the second day of life; GM-CSF levels presented a significantly higher values in the BPD group ( $p = 0.002$ ), while eotaxin presented higher levels in the group without BPD ( $p = 0.02$ ). The ratio between GM-CSF and eotaxin determined 100% sensitivity and 80% specificity for IMV (ROC area = 0.9013, CI = 0.7791–1.024,  $p < 0.0001$ ).

**Conclusions:** The IMV duration time performed in the first 48 hours of life in the low birth weight neonates is a significant clinical predictor of BPD. The use of continuous IMV is associated with increased ratios between GM-CSF and eotaxin, suggesting increased lung injury and consequently progression of the disease.

#### Introduction

The implementation of new therapies, such as antenatal corticosteroid, surfactant, and non-invasive ventilation, in the care of preterm infant with very low birth weight (VLBW) has increased overall survival. However, the inadequate management of these resources increases morbidity due to hospitalization, especially respiratory diseases, such as bronchopulmonary dysplasia (BPD), and child mortality up to 5 years of age (1-3). BPD is a multifactorial disease

that has specific clinical, radiological, and histological characteristics, and is defined as oxygen dependence at concentrations above 21% for a period  $\geq 28$  days and/or at 36 weeks postmenstrual age (2,4,5). There is a higher occurrence of BPD when oxygen supplementation is performed by long periods of invasive mechanical ventilation (IMV), since this causes lesions in pulmonary structure (6,7).

The clinical characteristics of BPD have begun to change, which has led researchers to recognize the need to redefine the disease in the current context (8-10). However, even with changes in disease characteristics and technological advances, the incidence of BDP remains high, which has considerable economic impact on health service (2,11). The discovery of biomarkers associated with BPD could delimit new immunomodulators associated with this disease, facilitating its definition, pathophysiology, and, consequently, diagnosis (8). Therefore, it is still necessary to investigate new biomarkers that will be useful in the prediction, diagnosis, and prognosis of BPD. The objective of this study was to evaluate the impact of IMV, which is associated with serum inflammatory cytokines and clinical indicators, on the second day of life, as a predictor of BPD in preterm VLBW infants. Our hypothesis is that the use of IMV in the first hours of life is associated with biomarkers that may predict the chances of MBP infants in developing BPD.

### **Patients and methods**

This study is a secondary analysis of data from a prospective cohort ("Development and Evaluation of Biomarker Associated with Pathologies in the Neonatal Period and Diagnostic and Prognostic Implications"). A longitudinal descriptive study was carried out from September 2015 to April 2016 in a neonatology department of a reference university hospital in Brazil. The study was approved by the Institution's Ethics and Research Committee (no. 2360814) and

the Free and Informed Consent Form was signed by the parents who agreed to the participation of their children.

Considering the total number of eligible patients in the analyzed period ( $n = 60$ ), the unidirectional odds ratio of the standard normal distribution ( $\alpha = 5\%$ ),  $p = 0.12$  (based on the incidence used in the ongoing cohort), and sample error = 0.05, the sample for this study was defined with 40 newborns.

We selected neonates hospitalized at the neonatal intensive care unit of both sexes, of all racial/ethnic groups, with gestational age less than 34 weeks, birth weight less than 1500 g, and who did not present congenital malformations. Those who died at less than 28 days old were excluded.

Maternal clinical data (chronic and/or gestational hypertension, diabetes, chorioamnionitis, antenatal steroid, peripartum hemorrhage, premature rupture of membranes > 18 h, and preeclampsia) and neonatal gestational age, sex, birth weight, apgar 5 (nCPAP) in the delivery room, birth diagnosis, intrauterine growth restriction, infectious risk, days of hospitalization, use of mechanical ventilation on day 2, use of antibiotics on day 2, surfactant performance, presence of pulmonary hypertension, early sepsis, persistent ductus arteriosus, and the Score for Neonatal Acute Physiology with Perinatal Extension-II (SNAPPE II) were obtained.

Blood collection was performed between 36 and 48 h of life of the newborn in a tube with clot activator plus gel, which is a routine procedure. The blood was centrifuged and the serum stored in a 0.5 mL Safe-Lock Tube; 25  $\mu$ L of serum was used to quantify levels of the cytokines eotaxin and granulocyte and macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) by a multiplex system in a BioPlex Magpix analyzer (Bio-Rad). The assay was performed in 86-well plates according to the manufacturer's instructions, similar to the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. During the procedure, capture antibodies against the cytokines were

coupled to magnetic microspheres, which were reacted with the sample containing the cytokines of interest. After several washes to remove proteins that did not bind the magnetic microspheres, a biotinylated detection antibody was added to create the sandwich complex. To obtain the result, the streptavidin-phycoerythrin conjugate was added to the reaction. After several washes, the median fluorescence intensity of each sample was recorded. Data analysis was performed using Bio-Plex Magpix equipment software (Bio-Rad) and concentration of the cytokines in the samples was determined by comparison with standard curves equivalent to each cytokine. Values were expressed in pg/ml.

Preterm newborns have a predisposition toward eosinophilia after birth, especially those with BPD, which is why eotaxin was chosen (12-16). To identify the impact of IMV on pulmonary structure, GM-CSF was evaluated because it is important in the maturation of alveolar macrophages (17) and is present in bronchial aspirates of newborns under invasive ventilatory support. DBP was defined as the need for supplemental oxygen at 28 days and/or at 36 weeks postmenstrual age (2,3).

The Shapiro–Wilk test was used to evaluate the normality of the data; Mann–Whitney, *t*-, or Chi-Square tests were used to compare study groups, cytokines, and clinical data, respectively. Odds ratios were used to determine the odds of developing the disease, considering the type and time of ventilatory support used in the first 48 h. Binary logistic regression with stepwise forward was used to identify clinical variables strongly related to BPD. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **Characterization of the sample**

Of the 60 preterm infants born at the study reference hospital, only 43 were considered eligible and three were excluded because they had died before 28 days of life. In total, 40

VLBW infants were divided into two groups: newborns who did not develop BPD (n = 19); and newborns who developed BPD (n = 21). The groups were homogeneous in terms of maternal characteristics (Table 1).

**Table 1.** Maternal characterization.

Variable	Without BPD (n = 19)	BPD (n = 21)	P value
Chronic and/or gestational hypertension	63%	33%	0.11
Diabetes	10%	14%	> 0.99
Chorioamnionitis	0%	19%	0.10
Steroid antenatal	78%	80%	> 0.99
Peripartum hemorrhage	26%	19%	0.71
Premature rupture of membranes > 18 h	36%	28%	0.73
Preeclampsia	21%	9%	0.39

\*Chi-Square test.

The neonatal characteristics with the greatest clinical relevance for the development of BPD were selected, as observed in Table 2.

**Table 2.** Clinical characteristics of the neonates included in the study.

Variable	Without BPD (n = 19)	BPD (n = 21)	OR	P value
----------	-------------------------	-----------------	----	---------

---

Gestational age (weeks) – mean (error measures)	29.84 (0.3767)	27 (0.53)	-	< 0.001
Gender - Female	53%	38%	1.806	0.52
Birth weight (g) – mean (error measures)	1195 (37.49)	907.4 (68.15)	-	< 0.001
Length of birth (cm) – mean (error measures)	37.34 (0.4957)	34.13 (0.764)	-	0.001
Apgar 5 min – mean (error measures)	8.789 ± 0.224	7.381 (0.4805)	-	0.01
Resuscitation childbirth room	63%	81%	0.403	0.29
nCPAP in childbirth room	53%	47%	1.463	0.74
Respiratory distress syndrome	52%	100%	0	< 0.001
Intrauterine growth restriction	31%	9%	4.385	0.12
Infectious risk	42%	66%	0.363	0.20
Days of hospitalization – mean (error measures)	55.63 (3.417)	86.24 (8.138)	-	0.001
Invasive mechanical ventilation on day 2	21%	85%	0.044	< 0.001
Use of antibiotics on day 2	47%	81%	0.211	0.04
Surfactant	10%	90%	0.012	< 0.001
Pulmonary hypertension	10%	14%	0.705	> 0.99
Sepsis early	15%	23%	0.6	0.69
SNAPPE II – mean (error measures)	36 (3.734)	45.38 (4.625)	-	0.12
Persistent artery canal	26%	66%	0.178	0.01

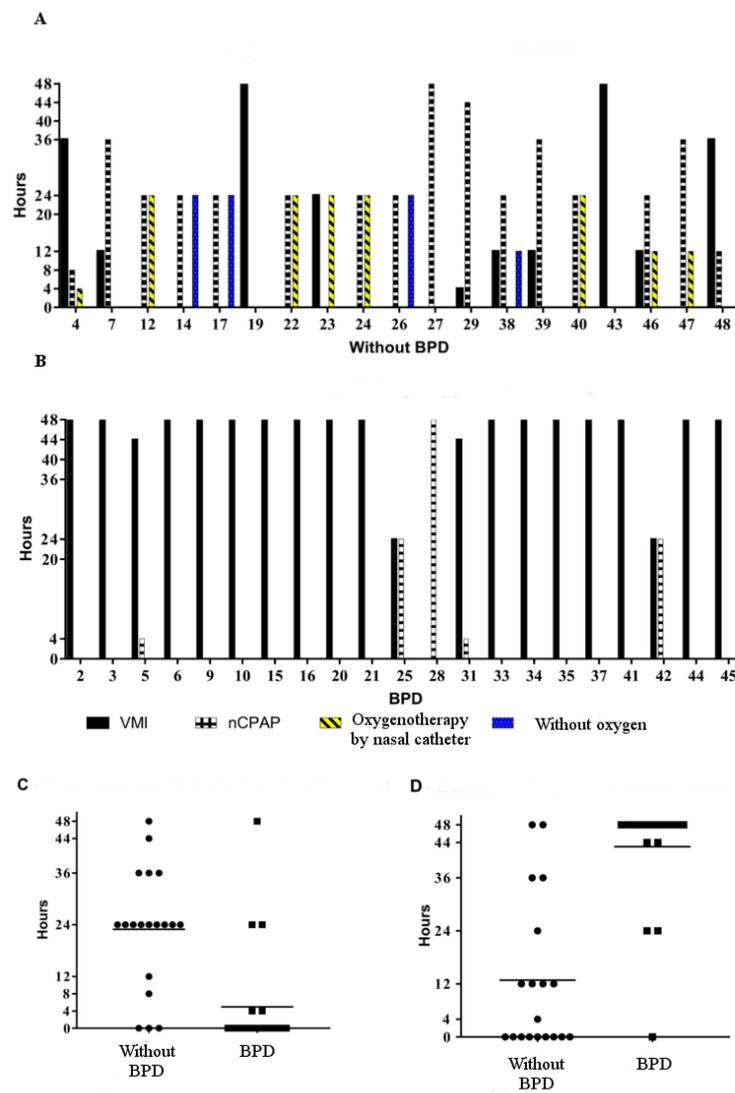
---

nCPAP: nasal continuous positive airway pressure; SNAPPE: Score for Neonatal Acute Physiology with Perinatal Extension-II.

\*Shapiro–Wilk, Mann–Whitney, Teste t e Qui–Quadrado.

**Ventilation stands**

All of the preterm neonates included in this study used some ventilatory support in the first 48 h, with a predominance of IMV in the group with BPD and ventilation with continuous positive pressure in the nostrils (nCPAP) or oxygenation of the nasal catheter in the group without BPD (Figure 1).



**Figure 1.** Characterization of the types of ventilatory support used in the first 48 h of life of very low weight preterm infants., and duration of treatments (nCPAP, nasal continuous positive airway pressure; IMV, invasive mechanical ventilation) of preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia (BPD). Types of ventilatory support used of preterm infants without BPD in the first 48 h of live (A), types of ventilatory support used of preterm infants with BPD in the first 48 h of live (B), duration of nCPAP in first 48 h of life of preterm infants with or without BPD (C), duration of IMV in first 48 h of life of preterm infants with or without BPD (D).

Preterm infants who used more than 40 continuous hours of IMV and less than 6 continuous hours of nCPAP had an increased chance of developing BPD (Table 3).

**Table 3.** Time of use of IMV and nCPAP in the first 48 h of life versus onset of BPD.

Ventilatory type	Hours	OR	CI	P value	Sensitivity	CI	Specificity	CI
IMV	> 40	51	6.786	<	0.8947	0.6861	0.8571	0.6536
		–	–	0.0001	–	–	–	–
			262.2			0.9813		0.9502
nCPAP	< 6	32	5.255	<	0.8421	0.6243	0.8571	0.6536
		–	–	0.0001	–	–	–	–
			137.4			0.9448		0.9502

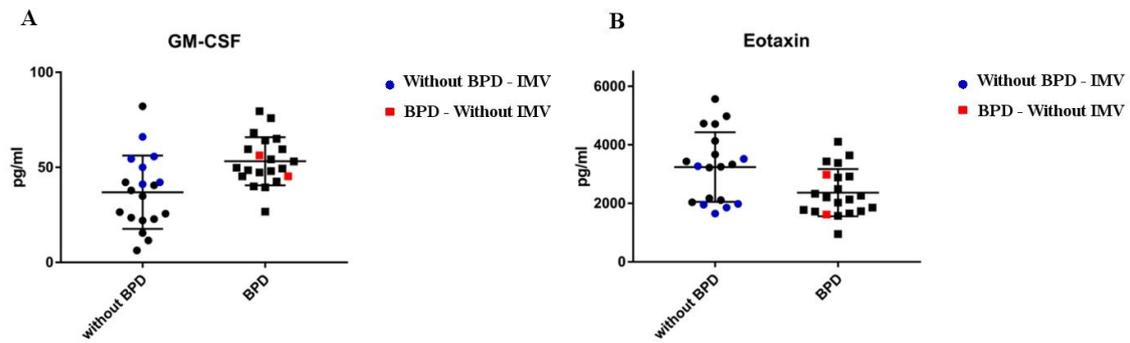
IMV, invasive mechanical ventilation; nCPAP, nasal continuous positive pressure ventilation;

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

\*ROC curve, Chi-square test, and odds ratio.

### Cytokines analyzed in peripheral blood

GM-CSF and eotaxin presented a statistically significant difference between the groups (Figure 2). Serum levels of GM-CSF were higher in the DBP group and eotaxin levels were higher in the non-BPD group.



**Figure 2.** Serum levels of GM-CSF and Eotaxin in the first 48 hours of life in the groups with and without bronchopulmonary dysplasia (BPD). IMV = invasive mechanical ventilation.

### Predictors of BPD

It was possible to observe that the time in IMV hours was determinant for the development of BPD (Table 4).

**Table 4.** Stepwise binary logistic regression with the clinical and laboratory variables of the neonates inserted in the study.

Variable	B	P value	Exp (B)	95% CI para EXP(B)	
				Lower	Higher
Step 1					
IMV hours	0.098	< 0.001	1.103	1.047	1.161
Constant	-2.819	0.004	0.060		

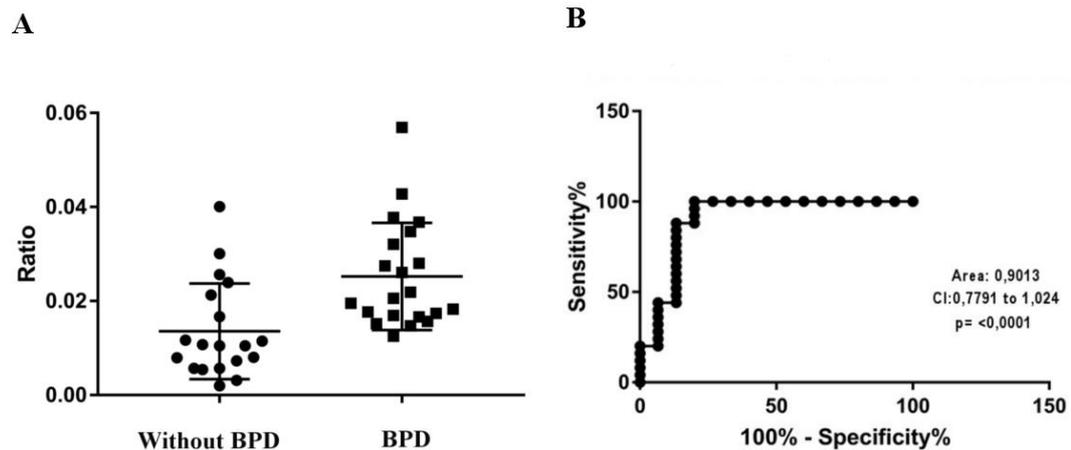
IMV, invasive mechanical ventilation;

\*Stepwise binary logistic regression.

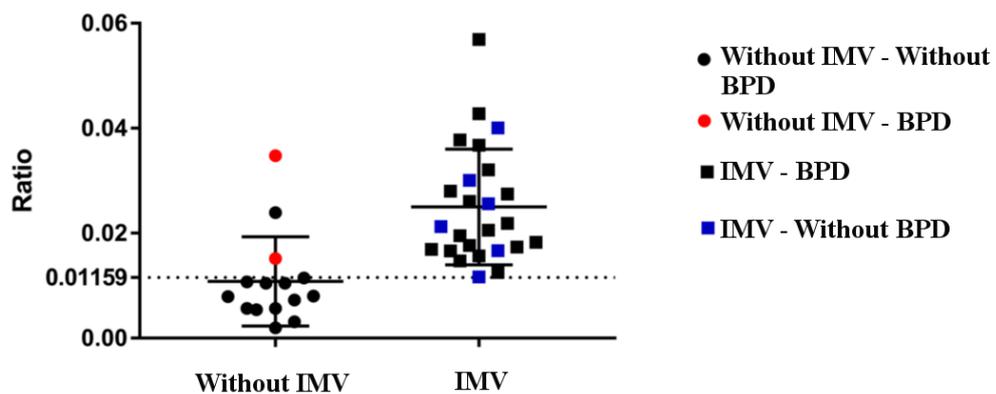
### GM-CSF and eotaxin

The ratio between GM-CSF and eotaxin was used in an attempt to understand the underlying immune mechanism related to BPD, which allowed for a significant differentiation between groups (Figure 3).

When analyzing the groups according to the use of IMV during the first 36 and 48 h of life, regardless of whether or not they developed BPD, it was possible to visualize how many newborns were using IMV at the time of collection using the ROC curve (Figure 3) when the cut off value was defined as 0.01159 (Figure 4).



**Figure 3.** GM-CSF and Eotaxin ratio analysis of preterm infants of very low birth weight in the first 48 hours of life, with and without bronchopulmonary dysplasia (BPD) (A), and ROC curve analysis (B).



**Figure 4.** GM-CSF/Eotaxin ratio related to the use of mechanical ventilation during the first 36 to 48 hours of life, and stratification of patients with and without bronchopulmonary dysplasia (BPD). IMV = invasive mechanical ventilation. Sensitivity = 100% and specificity = 80%.

## Discussion

This investigation shows for the first time that the type and duration of invasive ventilatory support in the first 48 hours of life of preterm infants with very low weight is critical for BPD development. We have revealed that during the first 48 h of life the time under continuous IMV was the only predictive variable for BPD, and the longer the use of continuous IMV, the greater the chances of BPD development. We have also shown for the first time that the GM-CSF and eotaxin levels were associated with BPD due to the duration of ventilation in first 48 hours of life. Interestingly, the two markers presented opposite levels, and higher ratios between GM-CSF and eotaxin were able to predict aggression of the pulmonary structure generated by IMV with 100% sensitivity.

It is known that IMV induces pulmonary lesions as a result of necrosis, apoptosis, and inflammation that compromise alveolar epithelial cells I and II, fibroblasts, and endothelial cells, and alter the alveolar-capillary barrier. These changes lead to the release of pro-inflammatory cytokines, increased permeability, and influx of neutrophils and macrophages into the lung (19-22).

We also observed that during the first 2 days of life, infants who did not develop BPD used predominantly nCPAP and nasal prongs. This result reinforces indication of the use of non-invasive ventilation in the conduction of respiratory distress syndrome in VLBW preterm infants in an attempt to avoid the harmful effects of IMV (23-27). Since previous studies have shown that increased IMV time causes pulmonary structural deformity and, consequently, ventilation/perfusion impairment and increased oxygen dependence (6,7).

In recent years, there has been a significant increase in the use of non-invasive ventilatory support. However, this did not reduce oxygen dependence at 36 weeks and no improvement in lung function was observed in childhood (28). Therefore, an alternative would be to associate the use of biomarkers in clinical management to identify early neonates at risk for developing

BPD. Many studies have evaluated biomarkers in bronchial aspirate fluids, which cannot be performed in preterm infants who are not using IMV (29), so we analyzed blood samples for the levels of GM-CSF and eotaxin. Some studies have reported similar methodologies with blood samples, but have not analyzed eotaxin levels (30,31).

The levels of GM-CSF in the BPD group presented higher values compared to the control group, which may suggest macrophage stimulation and increase by GM-CSF, in an attempt to control the aggression suffered by the lung. GM-CSF is important in the maturation of alveolar macrophages (17), and thus exerts a beneficial effect in the infected lung, promoting the differentiation, accumulation, activation, and localization of alveoli infected by dendritic cells and alveolar macrophages (32).

Eotaxin presented high levels in the group without BPD, which suggests that these VLBW preterm infants were more sensitive to eosinophilic changes. There is a tendency for preterm newborns to develop eosinophilia after birth due to procedures and interventions during hospitalization (12). However, high levels are common in newborns with BPD and in extremely low birth weight preterm infants (12,16), which differs from the data found in this study. This result can be explained by the attempt to create a compensatory mechanism, since the concomitant overexpression of macrophages and eosinophils generates irreversible fibrosis (18).

Another relevant result observed in this study was the analysis of the GM-CSF and eotaxin ratios, in an attempt to evaluate the behavior of the underlying immunity, as well as to verify the balance of T helper (Th) cells during the first days of life (33). Th1 cells form a heterogeneous set of protective cells, which are responsible for the activation of phagocytes and protection against intracellular microorganisms. Th2 cells protect the body mainly from parasites, and Th17 cells protect against fungi and extracellular bacteria (34,35).

Zielinski (2014), in a study with mice, observed that GM-CSF had a Th17 function related to autoimmune or chronic diseases, but when evaluated in human cells, expressed Th1 characteristics (36). In neuroinflammatory autoimmune diseases affecting children, GM-CSF has a different signaling pathway than Th1 and Th17, which raises the possibility of an alternative pathway for GM-CSF stimulation (37-39).

Eotaxin is a member of the Th2 cytokine family (16) and binds CCR3 in the lungs, which, in turn, has a profibrinogenic capacity and may lead to pulmonary remodeling (16,40). On the second day investigated, there was a balance between the Th cells triggered by GM-CSF and Th2 cells, which suggests that when there is an increase in GM-CSF levels there is a decrease in eotaxin, and vice versa. This may be a result of the body's attempt to avoid definitive fibrosis (18).

When we associated the use of IMV in both groups between 36 and 48 h with the GM-CSF/eotaxin ratio, it was possible to see how the cytokines reacted to the use of IMV, since the use of IMV resulted in higher values. With this result, it is possible to affirm that short periods of IMV activate a pro-inflammatory cascade (22,41).

Despite the differences between groups, cytokines alone did not show a prediction for the diagnosis of BPD; they only tended to indicate the influence of IMV on the body of VLBW preterm infants. Further studies are needed to expand the investigation of the role of serum inflammatory cytokines, clinical variables, and IMV associated with the prediction and diagnosis of BPD.

## **Conclusions**

After monitoring the second day of life, the number of hours of IMV was considered a predictive factor for BPD, since the longer its continuous use, the greater the chances of preterm infants developing the disease. The GM-CSF and eotaxin ratios were also able to predict BPD,

because they were highly associated with IMV aggression onto the pulmonary structure of preterm infants. Future research is needed not only to validate the use of both markers as predictors, but also whether they are potential therapeutic targets for BPD.

## References

- AFJEH, S. A. et al. Evaluation of Initial Respiratory Support Strategies in VLBW Neonates with RDS. **Archives of Iranian Medicine**, v. 20, n. 3, p. 158–164, mar. 2017.
- ÁLVAREZ-FUENTE, M. et al. The economic impact of prematurity and bronchopulmonary dysplasia. **European Journal of Pediatrics**, v. 176, n. 12, p. 1587–1593, dez. 2017.
- AMBALAVANAN, N. et al. Cytokines Associated with Bronchopulmonary Dysplasia or Death in Extremely Low Birth Weight Infants. **Pediatrics**, v. 123, n. 4, p. 1132–1141, abr. 2009.
- AMBALAVANAN, N. et al. Integrated Genomic Analyses in Bronchopulmonary Dysplasia. **The Journal of pediatrics**, v. 166, n. 3, p. 531–537.e13, mar. 2015.
- ARAKI, S. et al. Vitamin A to prevent bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants: a systematic review and meta-analysis. **PloS One**, v. 13, n. 11, p. e0207730, 2018.
- BAKER, C. D.; ALVIRA, C. M. Disrupted Lung Development and Bronchopulmonary Dysplasia: Opportunities for Lung Repair and Regeneration. **Current opinion in pediatrics**, v. 26, n. 3, p. 306–314, jun. 2014.
- BALLARD, A. R. et al. Chorioamnionitis and subsequent bronchopulmonary dysplasia in very-low-birth weight infants: a 25-year cohort. **Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association**, v. 36, n. 12, p. 1045–1048, 2016.
- BANCALARI, E.; JAIN, D. Bronchopulmonary Dysplasia: Can We Agree on a Definition? **American Journal of Perinatology**, v. 35, n. 6, p. 537–540, maio 2018.
- BANCALARI, E.; JOBE, A. H. **Workshop on Bronchopulmonary Dysplasia (BPD) - Office of Rare Diseases**. Disponível em: <<https://rarediseases.info.nih.gov/asp/html/conferences/conferences/broncho20000601.html>>. Acesso em: 28 nov. 2018.
- BECK, S. et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 88, n. 1, p. 31–38, jan. 2010.
- BHANDARI, V. **Bronchopulmonary Dysplasia**. [s.l.] Humana Press, 2016.
- BOSE, C. L.; DAMMANN, C. E. L.; LAUGHON, M. M. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 93, n. 6, p. F455–461, nov. 2008.
- BRASIL, DATASUS. **Definições**. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/cid10/V2008/WebHelp/definicoes.htm>>. Acesso em: 17 set. 2018.

CARVALHO, C. G.; SILVEIRA, R. C.; PROCIANOY, R. S. Lesão pulmonar induzida pela ventilação em recém-nascidos prematuros. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 25, n. 4, p. 319–326, dez. 2013.

CHEN, G.-H. et al. Local GM-CSF-Dependent Differentiation and Activation of Pulmonary Dendritic Cells and Macrophages Protect against Progressive Cryptococcal Lung Infection in Mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 196, n. 4, p. 1810–1821, 15 fev. 2016.

CIUFFINI, F.; ROBERTSON, C. F.; TINGAY, D. G. How best to capture the respiratory consequences of prematurity? **European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society**, v. 27, n. 147, 31 mar. 2018.

CROWLEY, P.; CHALMERS, I.; KEIRSE, M. J. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 97, n. 1, p. 11–25, jan. 1990.

D'ANGIO, C. T. et al. Blood Cytokine Profiles Associated with Distinct Patterns of Bronchopulmonary Dysplasia among Extremely Low Birth Weight Infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 174, p. 45–51.e5, jul. 2016.

DARLOW, B. A.; GRAHAM, P. J.; ROJAS-REYES, M. X. Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long-term morbidity in very low birth weight infants. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 8, p. CD000501, 22 ago. 2016.

DAVIDSON, L. M.; BERKELHAMER, S. K. Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 1, 6 jan. 2017.

DAVIS, P. G.; HENDERSON-SMART, D. J. Nasal continuous positive airways pressure immediately after extubation for preventing morbidity in preterm infants. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. CD000143, 2003.

DRAVET-GOUNOT, P. et al. Lung microRNA deregulation associated with impaired alveolarization in rats after intrauterine growth restriction. **PloS One**, v. 12, n. 12, p. e0190445, 2017.

EHRENKRANZ, R. A. et al. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. **Pediatrics**, v. 116, n. 6, p. 1353–1360, dez. 2005.

FANAROFF, A. A. et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 196, n. 2, p. 147.e1-8, fev. 2007.

GUILLOT, M. et al. Cell-Based Therapy for Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants: Workshop report. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 5 out. 2018.

HAMILTON, J. A.; ACHUTHAN, A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 2, p. 81–89, fev. 2013.

HARTLING, L.; LIANG, Y.; LACAZE-MASMONTEIL, T. Chorioamnionitis as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 97, n. 1, p. F8–F17, jan. 2012.

JOBE, A. H. What is BPD in 2012 and what will BPD become? **Early Human Development**, v. 88 Suppl 2, p. S27-28, maio 2012.

JOBE, A. H.; BANCALARI, E. H. Controversies about the definition of bronchopulmonary dysplasia at 50 years. **Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)**, v. 106, n. 5, p. 692–693, maio 2017.

JOBE, A. H.; STEINHORN, R. Can We Define Bronchopulmonary Dysplasia? **The Journal of Pediatrics**, v. 188, p. 19–23, set. 2017.

KANDASAMY, J. et al. Serum eotaxin-1 is increased in extremely-low-birth-weight infants with bronchopulmonary dysplasia or death. **Pediatric Research**, v. 78, n. 5, p. 498–504, nov. 2015.

KATZ, J. et al. Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis. **Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 417–425, 3 ago. 2013.

KJELLBERG, M. et al. Bronchopulmonary dysplasia: clinical grading in relation to ventilation/perfusion mismatch measured by single photon emission computed tomography. **Pediatric Pulmonology**, v. 48, n. 12, p. 1206–1213, dez. 2013.

KÖNIG, K.; GUY, K. J. Bronchopulmonary dysplasia in preterm infants managed with non-invasive ventilation or surfactant and a brief period of mechanical ventilation: a 6-year cohort study. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, v. 27, n. 6, p. 608–611, abr. 2014.

KROON, A. A. et al. Mechanical ventilation-induced apoptosis in newborn rat lung is mediated via FasL/Fas pathway. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 11, p. L795-804, dez. 2013.

KUHN, H. et al. Stretch-induced apoptosis in rat alveolar epithelial cells is mediated by the intrinsic mitochondrial pathway. **Experimental Lung Research**, v. 43, n. 1, p. 49–56, 2017.

LAL, C. V.; AMBALAVANAN, N. Biomarkers, Early Diagnosis, and Clinical Predictors of Bronchopulmonary Dysplasia. **Clinics in Perinatology**, v. 42, n. 4, p. 739–754, dez. 2015.

LEE, A. C. et al. National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. **The Lancet. Global Health**, v. 1, n. 1, p. e26–e36, jul. 2013.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **Lancet (London, England)**, v. 388, n. 10063, p. 3027–3035, 17 2016.

MCEVOY, C. T. et al. Bronchopulmonary dysplasia: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11 Suppl 3, p. S146-153, abr. 2014.

MILLER, J. D.; CARLO, W. A. Pulmonary complications of mechanical ventilation in neonates. **Clinics in Perinatology**, v. 35, n. 1, p. 273–281, x–xi, mar. 2008.

MONTE, L. F. V. et al. Bronchopulmonary dysplasia. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 2, p. 99–110, abr. 2005.

MORROW, L. A. et al. Antenatal Determinants of Bronchopulmonary Dysplasia and Late Respiratory Disease in Preterm Infants. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 196, n. 3, p. 364–374, 1 ago. 2017.

NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON THE EFFECT OF CORTICOSTEROIDS FOR FETAL MATURATION ON PERINATAL OUTCOMES. Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. **JAMA**, v. 273, n. 5, p. 413–418, 1 fev. 1995.

NORTHWAY, W. H.; ROSAN, R. C.; PORTER, D. Y. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. **The New England Journal of Medicine**, v. 276, n. 7, p. 357–368, 16 fev. 1967.

PALOMINO, D. C. T. et al. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, set. 2015.

PRINCIPI, N.; DI PIETRO, G. M.; ESPOSITO, S. Bronchopulmonary dysplasia: clinical aspects and preventive and therapeutic strategies. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, 20 fev. 2018.

RATNASIRI, A. W. G. et al. Recent trends, risk factors, and disparities in low birth weight in California, 2005-2014: a retrospective study. **Maternal Health, Neonatology and Perinatology**, v. 4, p. 15, 2018.

**Relatórios Anuais**. Disponível em: <<http://www.redeneonatal.fiocruz.br/index.php/10-destaque/29-relatoriosanuais>>. Acesso em: 24 fev. 2018.

RIVERA, L. et al. Biomarkers for Bronchopulmonary Dysplasia in the Preterm Infant. **Frontiers in Pediatrics**, v. 4, 31 mar. 2016.

SÁNCHEZ LUNA, M. et al. [Bronchopulmonary dysplasia: definitions and classifications]. **Anales De Pediatría (Barcelona, Spain: 2003)**, v. 79, n. 4, p. 262.e1-6, out. 2013.

SCHMIDT, B. et al. Caffeine therapy for apnea of prematurity. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 20, p. 2112–2121, 18 maio 2006.

SHI, Y. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. **Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 126–133, fev. 2006.

SINGH, S. P. et al. Gestational Exposure of Mice to Secondhand Cigarette Smoke Causes Bronchopulmonary Dysplasia Blocked by the Nicotinic Receptor Antagonist Mecamylamine. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 8, p. 957–964, ago. 2013.

SOLA, A. et al. Recomendaciones del VIII Consenso Clínico de SIBEN para la Displasia Broncopulmonar. **NeoReviews**, v. 19, n. 11, p. e712–e734, 1 nov. 2018.

STROUSTRUP, A.; TRASANDE, L. Epidemiological characteristics and resource use in neonates with bronchopulmonary dysplasia: 1993-2006. **Pediatrics**, v. 126, n. 2, p. 291–297, ago. 2010.

SUTHERASAN, Y.; VARGAS, M.; PELOSI, P. Protective mechanical ventilation in the non-injured lung: review and meta-analysis. **Critical Care**, v. 18, n. 2, p. 211, 2014.

SWEET, D. G. et al. European Consensus Guidelines on the Management of Respiratory Distress Syndrome - 2016 Update. **Neonatology**, v. 111, n. 2, p. 107–125, 2017.

THÉBAUD, B.; KOUREMBANAS, S. Can We Cure Bronchopulmonary Dysplasia? **The Journal of Pediatrics**, v. 191, p. 12–14, 1 dez. 2017.

THEKKEVEEDU, R. K.; GUAMAN, M. C.; SHIVANNA, B. Bronchopulmonary dysplasia: A Review of Pathogenesis and Pathophysiology. **Respiratory medicine**, v. 132, p. 170–177, nov. 2017.

TORCHIN, H. et al. Placental Complications and Bronchopulmonary Dysplasia: EPIPAGE-2 Cohort Study. **Pediatrics**, v. 137, n. 3, mar. 2016.

TORCHIN, H. et al. Histologic Chorioamnionitis and Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants: The Epidemiologic Study on Low Gestational Ages 2 Cohort. **The Journal of Pediatrics**, v. 187, p. 98–104.e3, ago. 2017.

TRAVERS, C. P. et al. Exposure to any antenatal corticosteroids and outcomes in preterm infants by gestational age: prospective cohort study. **The BMJ**, v. 356, 29 mar. 2017.

WALSH, M. C. et al. Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates. **Pediatrics**, v. 114, n. 5, p. 1305–1311, nov. 2004.

**WHO Recommendations on Interventions to Improve Preterm Birth Outcomes**. Geneva: World Health Organization, 2015.

(WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Preterm birth**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>>. Acesso em: 17 set. 2018.

YEN, J.-M. et al. Eosinophilia in very low birth weight infants. **Pediatrics and Neonatology**, v. 51, n. 2, p. 116–123, abr. 2010.

ZANA-TAIEB, E. et al. Effect of two models of intrauterine growth restriction on alveolarization in rat lungs: morphometric and gene expression analysis. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e78326, 2013.

ZANA-TAIEB, E. et al. Impaired alveolarization and intra-uterine growth restriction in rats: a postnatal genome-wide analysis. **The Journal of Pathology**, v. 235, n. 3, p. 420–430, fev. 2015.

## **5. MATERIAL E MÉTODO**

### **5.1. Aspectos Éticos**

Este estudo é uma análise secundária de dados de uma coorte prospectiva que está sendo realizado no Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HCU-UFU) e no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia-MG, nº 2.360.814, por um período de 10 anos (2015 a 2024) para avaliação dos dados da evolução e desenvolvimento de patologias durante a internação, como a presença de sepse, enterocolite necrosante, hemorragia periintraventricular, retinopatia da prematuridade e displasia broncopulmonar.

As mães dos recém-nascidos foram previamente informadas e consultadas sobre sua participação e de seus filhos no estudo e as que concordaram foram solicitadas a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **5.2. Participantes ou Caracterização da Amostra**

Foram incluídos na pesquisa os Recém-Nascidos Pré-termos (RNPT) com idade gestacional menor que 34 semanas e peso de nascimento menor que 1.500g nascidos no HCU-UFU durante o período de setembro de 2015 a abril de 2016, em que as mães concordaram com a participação de seu filho e não possuíam malformação congênita. Foram excluídos os RNPT os que foram a óbito antes de 28 dias de vida.

### **5.3. Instrumentos de Coleta de Dados**

As informações referentes ao histórico materno e neonatal foram coletadas dos registros hospitalares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU).

### **5.3.1. Fatores de Investigação das Causas do Trabalho de Parto Prematuro**

Fatores Clínicos Maternos: infecção urinária, corioamnionite, sofrimento fetal agudo, pré-eclâmpsia, sífilis, ruprema, restrição de crescimento intra útero, oligodrâmnio, anormalidade congênita, diabetes, drogas ilícitas, toxoplasmose, HIV, HBsAg.

### **5.3.2. Fatores para Investigação relacionados à Internação e a DBP**

Fatores Maternos: Esteroide antenar, antibióticos profiláticos e tempo de bolsa rota.

Fatores Neonatais: Idade gestacional, sexo, peso de nascimento, apgar 5º minuto, diagnósticos de nascimento, SNAPPE II, risco infeccioso, sepsis precoce e tardia, dias e desfecho da internação, tipo e tempo de suporte ventilatório durante a internação, uso de antibióticos, uso de surfactante e canal arterial persistente.

### **5.3.3. Análise do Perfil Inflamatório aos 2 dias**

Coleta de sangue para a diferenciação da resposta imunológica entre os grupos mediante aos fatores enfrentados durante a internação. Possibilitando caracterizar melhor a DBP e propor um algoritmo de predição e diagnóstico. Citocinas que foram dosadas: Eotaxin e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF).

## **5.4. Procedimentos**

#### **5.4.1. Procedimentos de Coleta**

A coleta de sangue foi realizada entre 36 e 48 horas de vida, à beira leito, após admissão destes RNPT na Unidade de Terapia Intensiva neonatal.

#### **5.4.2. Método de Coleta**

Foram coletados 200  $\mu$ L de sangue periférico em um tubo com ativador de coágulo mais gel, em seguida será centrifugado. O soro será armazenado em Safe-Lock Tube 0,5 ml e congelado.

#### **5.4.3. Fluxo de Análise dos biofluidos pela Sistema Multiplex**

O material será quantificado por sistema multiplex em um analisador Bio-Plex Magpix (Bio-Rad). Serão utilizados 25  $\mu$ L para quantificação. O ensaio será realizado em placas de 86 poços, seguindo instruções do fabricante, semelhante ao ELISA sanduíche. Durante o procedimento, anticorpos de captura contra as citocinas serão acoplados a microesferas magnéticas e estas reagiram com a amostra contendo as citocinas de interesse. Depois de lavagens para a remoção das proteínas que não se ligaram as microesferas magnéticas, um anticorpo de detecção biotilado será adicionado para criar o complexo sanduíche. Para a revelação, o conjugado estreptavidina-ficoeritrina será adicionado a reação. Após novo ciclo de lavagem a intensidade mediana de fluorescência de cada amostra será registrada. A análise dos dados será feita por meio do software do equipamento Bio-Plex Magpix (Bio-Rad) e a concentração das citocinas nas amostras será determinada por meio da comparação com as curvas padrão equivalente a cada citocina. Os valores serão expressos em pg/ml.

## 6. CONCLUSÃO

Após o monitoramento do segundo dia de vida, o número de horas de VMI foi considerado um fator preditivo para a DBP, uma vez que quanto maior o seu uso contínuo, maiores as chances de os prematuros desenvolverem a doença. As razões GM-CSF e eotaxina também foram capazes de predizer a DBP, por estarem altamente associadas à agressão da VMI na estrutura pulmonar dos prematuros. Pesquisas futuras são necessárias não apenas para validar o uso de ambos os marcadores como preditores, mas também se eles são potenciais alvos terapêuticos para a DBP.

## 7. PERSPECTIVA

A presente estudo originou duas dissertações de mestrado do Programa de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia avaliando biomarcadores em urina do RN, das alunas Daniela Silva Rodrigues da Costa e Aive Oliveira Santos, intitulados “Preditores urinários de sepse neonatal tardia” e “IL-1 $\beta$  urinário como biomarcador preditivo de sepse neonatal em pré-termos”, respectivamente. Ambos tiveram o objetivo de avaliar o risco de desenvolvimento de sepse neonatal em RNPT MBP, por meio da dosagem de biomarcadores urinários no 2º dia de vida. Foram submetidos para publicação nas revistas **Clinical Immunology** e **Intensive Medicine Care**.

Ainda, com o banco de dado, está sendo analisado biomarcadores no sangue do cordão umbilical do RNPT MBP pela aluna Lídia Mayrink de Barros em sua tese de doutorado, com o artigo intitulado “Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) como um marcador preditivo para sepse neonatal no sangue de cordão umbilical e periférico”. Submetido a revista **Pediatric Critical Care** e encontra-se em avaliação.

Está em curso novas coletas de material para maior número de pacientes e análise desses biomarcadores para a investigação de Hemorragia Peri intraventricular, na tese de doutorado da aluna Mariana Tivolone, dentro do Programa Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Por fim, estamos realizando novas coletas de amostras, iremos realizar dosagem dos biomarcadores no segundo e sétimo dia de vida, em sangue periférico do RN e a ampliaremos as análises do sangue periférico investigando proteínas e metabólitos relacionados a Displasia Broncopulmonar.

## REFERÊNCIAS

AFJEH, S. A. et al. Evaluation of Initial Respiratory Support Strategies in VLBW Neonates with RDS. *Archives of Iranian Medicine*, v. 20, n. 3, p. 158-164, mar. 2017.

ÁLVAREZ-FUENTE, M. et al. The economic impact of prematurity and bronchopulmonary dysplasia. *European Journal of Pediatrics*, v. 176, n. 12, p. 1587-1593, dez. 2017.

<https://doi.org/10.1007/s00431-017-3009-6>

AMBALAVANAN, N. et al. Cytokines Associated with Bronchopulmonary Dysplasia or Death in Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics*, v. 123, n. 4, p. 1132-1141, abr. 2009.

<https://doi.org/10.1542/peds.2008-0526>

AMBALAVANAN, N. et al. Integrated Genomic Analyses in Bronchopulmonary Dysplasia. *The Journal of pediatrics*, v. 166, n. 3, p. 531-537.e13, mar. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.09.052>

ARAKI, S. et al. Vitamin A to prevent bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*, v. 13, n. 11, p. e0207730, 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207730>

BAKER, C. D.; ALVIRA, C. M. Disrupted Lung Development and Bronchopulmonary Dysplasia: Opportunities for Lung Repair and Regeneration. *Current opinion in pediatrics*, v. 26, n. 3, p. 306-314, jun. 2014.

<https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000095>

BALLARD, A. R. et al. Chorioamnionitis and subsequent bronchopulmonary dysplasia in very-low-birth weight infants: a 25-year cohort. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, v. 36, n. 12, p. 1045-1048, 2016.

<https://doi.org/10.1038/jp.2016.138>

BANCALARI, E.; JAIN, D. Bronchopulmonary Dysplasia: Can We Agree on a Definition? *American Journal of Perinatology*, v. 35, n. 6, p. 537-540, maio 2018.

<https://doi.org/10.1055/s-0038-1637761>

BANCALARI, E.; JOBE, A. H. Workshop on Bronchopulmonary Dysplasia (BPD) - Office of Rare Diseases. Disponível em:

<<https://rarediseases.info.nih.gov/asp/html/conferences/conferences/broncho2000601.html>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

BECK, S. et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 88, n. 1, p. 31-38, jan. 2010.

<https://doi.org/10.2471/BLT.08.062554>

BHANDARI, V. *Bronchopulmonary Dysplasia*. [s.l.] Humana Press, 2016.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-28486-6>

BOSE, C. L.; DAMMANN, C. E. L.; LAUGHON, M. M. Bronchopulmonary dysplasia and inflammatory biomarkers in the premature neonate. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, v. 93, n. 6, p. F455-461, nov. 2008.

<https://doi.org/10.1136/adc.2007.121327>

BRASIL, DATASUS. Definições. Disponível em:

<<http://www.datasus.gov.br/cid10/V2008/WebHelp/definicoes.htm>>. Acesso em: 17 set. 2018.

CARVALHO, C. G.; SILVEIRA, R. C.; PROCIANOY, R. S. Lesão pulmonar induzida pela ventilação em recém-nascidos prematuros. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 25, n. 4, p. 319-326, dez. 2013.

<https://doi.org/10.5935/0103-507X.20130054>

CHEN, G.-H. et al. Local GM-CSF-Dependent Differentiation and Activation of Pulmonary Dendritic Cells and Macrophages Protect against Progressive Cryptococcal Lung Infection in Mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 196, n. 4, p. 1810-1821, 15 fev. 2016.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501512>

CIUFFINI, F.; ROBERTSON, C. F.; TINGAY, D. G. How best to capture the respiratory consequences of prematurity? *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, v. 27, n. 147, 31 mar. 2018.

<https://doi.org/10.1183/16000617.0108-2017>

CROWLEY, P.; CHALMERS, I.; KEIRSE, M. J. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 97, n. 1, p. 11-25, jan. 1990.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1990.tb01711.x>

D'ANGIO, C. T. et al. Blood Cytokine Profiles Associated with Distinct Patterns of Bronchopulmonary Dysplasia among Extremely Low Birth Weight Infants. *The Journal of Pediatrics*, v. 174, p. 45-51.e5, jul. 2016.

DARLOW, B. A.; GRAHAM, P. J.; ROJAS-REYES, M. X. Vitamin A supplementation to prevent mortality and short- and long-term morbidity in very low birth weight infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 8, p. CD000501, 22 ago. 2016.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD000501.pub4>

DAVIDSON, L. M.; BERKELHAMER, S. K. Bronchopulmonary Dysplasia: Chronic Lung Disease of Infancy and Long-Term Pulmonary Outcomes. *Journal of Clinical Medicine*, v. 6, n. 1, 6 jan. 2017.

<https://doi.org/10.3390/jcm6010004>

DAVIS, P. G.; HENDERSON-SMART, D. J. Nasal continuous positive airways pressure immediately after extubation for preventing morbidity in preterm infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 2, p. CD000143, 2003.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD000143>

DRAVET-GOUNOT, P. et al. Lung microRNA deregulation associated with impaired alveolarization in rats after intrauterine growth restriction. *PloS One*, v. 12, n. 12, p. e0190445, 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190445>

EHRENKRANZ, R. A. et al. Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*, v. 116, n. 6, p. 1353-1360, dez. 2005.

<https://doi.org/10.1542/peds.2005-0249>

FANAROFF, A. A. et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 196, n. 2, p. 147.e1-8, fev. 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.09.014>

GUILLOT, M. et al. Cell-Based Therapy for Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants: Workshop report. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 5 out. 2018.

HAMILTON, J. A.; ACHUTHAN, A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends in Immunology*, v. 34, n. 2, p. 81-89, fev. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2012.08.006>

HARTLING, L.; LIANG, Y.; LACAZE-MASMONTEIL, T. Chorioamnionitis as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, v. 97, n. 1, p. F8-F17, jan. 2012.

<https://doi.org/10.1136/adc.2010.210187>

JOBE, A. H. What is BPD in 2012 and what will BPD become? *Early Human Development*, v. 88 Suppl 2, p. S27-28, maio 2012.

[https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(12\)70009-9](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(12)70009-9)

JOBE, A. H.; BANCALARI, E. H. Controversies about the definition of bronchopulmonary dysplasia at 50 years. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, v. 106, n. 5, p. 692-693, maio 2017.

<https://doi.org/10.1111/apa.13775>

JOBE, A. H.; STEINHORN, R. Can We Define Bronchopulmonary Dysplasia? *The Journal of Pediatrics*, v. 188, p. 19-23, set. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.06.064>

KANDASAMY, J. et al. Serum eotaxin-1 is increased in extremely-low-birth-weight infants with bronchopulmonary dysplasia or death. *Pediatric Research*, v. 78, n. 5, p. 498-504, nov. 2015.

<https://doi.org/10.1038/pr.2015.152>

KATZ, J. et al. Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis. *Lancet*, v. 382, n. 9890, p. 417-425, 3 ago. 2013.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60993-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60993-9)

KJELLBERG, M. et al. Bronchopulmonary dysplasia: clinical grading in relation to ventilation/perfusion mismatch measured by single photon emission

computed tomography. *Pediatric Pulmonology*, v. 48, n. 12, p. 1206-1213, dez. 2013.

<https://doi.org/10.1002/ppul.22751>

KÖNIG, K.; GUY, K. J. Bronchopulmonary dysplasia in preterm infants managed with non-invasive ventilation or surfactant and a brief period of mechanical ventilation: a 6-year cohort study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, v. 27, n. 6, p. 608-611, abr. 2014.

<https://doi.org/10.3109/14767058.2013.821976>

KROON, A. A. et al. Mechanical ventilation-induced apoptosis in newborn rat lung is mediated via FasL/Fas pathway. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 305, n. 11, p. L795-804, dez. 2013.

<https://doi.org/10.1152/ajplung.00048.2013>

KUHN, H. et al. Stretch-induced apoptosis in rat alveolar epithelial cells is mediated by the intrinsic mitochondrial pathway. *Experimental Lung Research*, v. 43, n. 1, p. 49-56, 2017.

<https://doi.org/10.1080/01902148.2017.1287228>

LAL, C. V.; AMBALAVANAN, N. Biomarkers, Early Diagnosis, and Clinical Predictors of Bronchopulmonary Dysplasia. *Clinics in Perinatology*, v. 42, n. 4, p. 739-754, dez. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.clp.2015.08.004>

LEE, A. C. et al. National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010. *The Lancet. Global Health*, v. 1, n. 1, p. e26-e36, jul. 2013.

[https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70006-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70006-8)

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet (London, England)*, v. 388, n. 10063, p. 3027-3035, 17 2016.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8)

MCEVOY, C. T. et al. Bronchopulmonary dysplasia: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases. *Annals of the American*

Thoracic Society, v. 11 Suppl 3, p. S146-153, abr. 2014.

<https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201312-424LD>

MILLER, J. D.; CARLO, W. A. Pulmonary complications of mechanical ventilation in neonates. *Clinics in Perinatology*, v. 35, n. 1, p. 273-281, x-xi, mar. 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.clp.2007.11.004>

MONTE, L. F. V. et al. Bronchopulmonary dysplasia. *Jornal de Pediatria*, v. 81, n. 2, p. 99-110, abr. 2005.

<https://doi.org/10.2223/1314>

MORROW, L. A. et al. Antenatal Determinants of Bronchopulmonary Dysplasia and Late Respiratory Disease in Preterm Infants. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 196, n. 3, p. 364-374, 1 ago. 2017.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201612-2414OC>

NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON THE EFFECT OF CORTICOSTEROIDS FOR FETAL MATURATION ON PERINATAL OUTCOMES. Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. *JAMA*, v. 273, n. 5, p. 413-418, 1 fev. 1995.

<https://doi.org/10.1001/jama.273.5.413>

NORTHWAY, W. H.; ROSAN, R. C.; PORTER, D. Y. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *The New England Journal of Medicine*, v. 276, n. 7, p. 357-368, 16 fev. 1967.

<https://doi.org/10.1056/NEJM196702162760701>

PALOMINO, D. C. T. et al. Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo)*, v. 13, n. 3, p. 469-473, set. 2015.

<https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>

PRINCIPI, N.; DI PIETRO, G. M.; ESPOSITO, S. Bronchopulmonary dysplasia: clinical aspects and preventive and therapeutic strategies. *Journal of Translational Medicine*, v. 16, 20 fev. 2018.

<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1417-7>

RATNASIRI, A. W. G. et al. Recent trends, risk factors, and disparities in low birth weight in California, 2005-2014: a retrospective study. *Maternal Health*,

Neonatology and Perinatology, v. 4, p. 15, 2018.

<https://doi.org/10.1186/s40748-018-0084-2>

Relatórios Anuais. Disponível em:

<<http://www.redeneonatal.fiocruz.br/index.php/10-destaque/29-relatoriosanuais>>. Acesso em: 24 fev. 2018.

RIVERA, L. et al. Biomarkers for Bronchopulmonary Dysplasia in the Preterm Infant. *Frontiers in Pediatrics*, v. 4, 31 mar. 2016.

<https://doi.org/10.3389/fped.2016.00033>

SÁNCHEZ LUNA, M. et al. [Bronchopulmonary dysplasia: definitions and classifications]. *Anales De Pediatría (Barcelona, Spain: 2003)*, v. 79, n. 4, p. 262.e1-6, out. 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2013.02.003>

SCHMIDT, B. et al. Caffeine therapy for apnea of prematurity. *The New England Journal of Medicine*, v. 354, n. 20, p. 2112-2121, 18 maio 2006.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa054065>

SHI, Y. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research*, v. 16, n. 2, p. 126-133, fev. 2006.

<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310017>

SINGH, S. P. et al. Gestational Exposure of Mice to Secondhand Cigarette Smoke Causes Bronchopulmonary Dysplasia Blocked by the Nicotinic Receptor Antagonist Mecamylamine. *Environmental Health Perspectives*, v. 121, n. 8, p. 957-964, ago. 2013.

<https://doi.org/10.1289/ehp.1306611>

SOLA, A. et al. Recomendaciones del VIII Consenso Clínico de SIBEN para la Displasia Broncopulmonar. *NeoReviews*, v. 19, n. 11, p. e712-e734, 1 nov. 2018.

<https://doi.org/10.1542/neo.19-11-e712>

STROUSTRUP, A.; TRASANDE, L. Epidemiological characteristics and resource use in neonates with bronchopulmonary dysplasia: 1993-2006. *Pediatrics*, v. 126, n. 2, p. 291-297, ago. 2010.

<https://doi.org/10.1542/peds.2009-3456>

SUTHERASAN, Y.; VARGAS, M.; PELOSI, P. Protective mechanical ventilation in the non-injured lung: review and meta-analysis. *Critical Care*, v. 18, n. 2, p. 211, 2014.

<https://doi.org/10.1186/cc13778>

SWEET, D. G. et al. European Consensus Guidelines on the Management of Respiratory Distress Syndrome - 2016 Update. *Neonatology*, v. 111, n. 2, p. 107-125, 2017.

<https://doi.org/10.1159/000448985>

THÉBAUD, B.; KOUREMBANAS, S. Can We Cure Bronchopulmonary Dysplasia? *The Journal of Pediatrics*, v. 191, p. 12-14, 1 dez. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.07.028>

THEKKEVEEDU, R. K.; GUAMAN, M. C.; SHIVANNA, B. Bronchopulmonary dysplasia: A Review of Pathogenesis and Pathophysiology. *Respiratory medicine*, v. 132, p. 170-177, nov. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.10.014>

TORCHIN, H. et al. Placental Complications and Bronchopulmonary Dysplasia: EPIPAGE-2 Cohort Study. *Pediatrics*, v. 137, n. 3, mar. 2016.

<https://doi.org/10.1542/peds.2015-2163>

TORCHIN, H. et al. Histologic Chorioamnionitis and Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants: The Epidemiologic Study on Low Gestational Ages 2 Cohort. *The Journal of Pediatrics*, v. 187, p. 98-104.e3, ago. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.05.019>

TRAVERS, C. P. et al. Exposure to any antenatal corticosteroids and outcomes in preterm infants by gestational age: prospective cohort study. *The BMJ*, v. 356, 29 mar. 2017.

<https://doi.org/10.1136/bmj.j1039>

WALSH, M. C. et al. Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates. *Pediatrics*, v. 114, n. 5, p. 1305-1311, nov. 2004.

<https://doi.org/10.1542/peds.2004-0204>

WHO Recommendations on Interventions to Improve Preterm Birth Outcomes. Geneva: World Health Organization, 2015.

(WORLD HEALTH ORGANIZATION). Preterm birth. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>>. Acesso em: 17 set. 2018.

YEN, J.-M. et al. Eosinophilia in very low birth weight infants. *Pediatrics and Neonatology*, v. 51, n. 2, p. 116-123, abr. 2010.  
[https://doi.org/10.1016/S1875-9572\(10\)60021-6](https://doi.org/10.1016/S1875-9572(10)60021-6)

ZANA-TAIEB, E. et al. Effect of two models of intrauterine growth restriction on alveolarization in rat lungs: morphometric and gene expression analysis. *PloS One*, v. 8, n. 11, p. e78326, 2013.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078326>

ZANA-TAIEB, E. et al. Impaired alveolarization and intra-uterine growth restriction in rats: a postnatal genome-wide analysis. *The Journal of Pathology*, v. 235, n. 3, p. 420-430, fev. 2015.  
<https://doi.org/10.1002/path.4470>

## ANEXOS

### Anexo A – Lista resumida das recomendações da OMS sobre intervenções para melhorar os desfechos clínicos nos partos prematuros

Intervenções Maternas	Recomendações
Administração antenatal de corticoides para melhorar desfechos clínicos nos prematuros	<p>1.0. A corticoterapia antenatal é recomendada nas mulheres entre 24 e 34 semanas de gestação com risco de parto prematuro, desde que as seguintes condições estejam presentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• a avaliação da idade gestacional pode ser feita com precisão;</li> <li>• o parto prematuro é considerado iminente nos próximos sete dias;</li> <li>• não há evidência clínica de infecção materna;</li> <li>• é possível oferecer assistência adequada ao parto (incluindo a capacidade de diagnosticar e assistir com segurança o trabalho de parto e o parto prematuro);</li> <li>• é possível oferecer cuidados adequados ao recém-nascido prematuro, caso sejam necessários (incluindo reanimação, controle térmico, suporte nutricional, tratamento de infecção e administração segura de oxigênio).</li> </ul> <p>1.1. O corticoide deve ser administrado às mulheres elegíveis quando o parto prematuro é considerado iminente nos próximos 7 dias do início do tratamento, inclusive nas próximas 24 horas.</p>

1.2. A corticoterapia antenatal é recomendada nas mulheres com risco de parto prematuro com um ou com mais de um feto (gestação múltipla).

1.3. A corticoterapia antenatal é recomendada nas mulheres com rotura prematura das membranas sem sinais clínicos de infecção.

1.4. A corticoterapia antenatal não é recomendada nas mulheres com corioamnionite em risco de parto prematuro.

1.5. A corticoterapia antenatal não é recomendada nas mulheres que serão submetidas a cesariana eletiva entre 34-36+ 6 semanas (fase da prematuridade tardia).

1.6. A corticoterapia antenatal é recomendada para mulheres com síndromes hipertensivas da gravidez em risco iminente de parto prematuro.

1.7. A corticoterapia antenatal é recomendada para mulheres em risco iminente do parto prematuro de um feto com restrição do crescimento.

1.8. A corticoterapia antenatal é recomendada para mulheres com diabetes pré-gestacional e gestacional que estão em risco iminente de parto prematuro. Essa conduta deve ser associada a intervenções para otimizar o controle glicêmico dessas mulheres.

1.9. Quando o parto prematuro é iminente, os corticoides recomendados são a dexametasona intramuscular (IM) ou a betametasona IM (total 24 mg, em doses divididas).

1.10. É recomendável fazer um novo ciclo de corticoide

	antenatal se o parto prematuro não ocorrer no prazo de 7 dias após a dose inicial, e uma nova avaliação clínica indicar que há um alto risco de parto prematuro nos próximos 7 dias.
Uso de tocolíticos para inibição do trabalho de parto prematuro	2.0. O uso de tocolíticos (tratamento agudo e de manutenção) não é recomendado para as mulheres em risco iminente de parto prematuro, para melhorar os desfechos neonatais.
Uso do sulfato de magnésio para prevenção de complicações neurológicas no feto	3.0. O uso de sulfato de magnésio é recomendado para mulheres em risco iminente de parto prematuro antes da 32ª semana de gestação, para a prevenção da paralisia cerebral no nascituro.
Uso de antibióticos para o trabalho de parto prematuro	4.0. A administração rotineira de antibióticos não é recomendada para mulheres em trabalho de parto prematuro com membranas amnióticas intactas e sem sinais clínicos de infecção. 5.0. A administração de antibióticos é recomendada para mulheres com rotura prematura das membranas antes do início do trabalho de parto. 5.1. Nos casos de rotura prematura das membranas antes do início do trabalho de parto, a eritromicina é recomendada como o antibiótico profilático de escolha. 5.2. O uso da combinação de amoxicilina e ácido clavulânico ("co-amoxiclav") não é recomendado para mulheres com rotura prematura das membranas antes do início do trabalho de parto.

Via de parto	6.0. Não se recomenda a realização rotineira de cesariana com a finalidade de melhorar os desfechos neonatais do prematuro, independentemente de o feto estar em apresentação cefálica ou pélvica.
Cuidados térmicos para os recém-nascidos prematuros	<p>7.0. O método canguru é recomendado como cuidado de rotina para os bebês com peso ao nascer menor ou igual a 2 Kg. O método deve ser iniciado assim que os recém-nascidos estiverem clinicamente estáveis.</p> <p>7.1. Sempre que possível, o método canguru deve ser oferecido de forma contínua aos bebês com peso ao nascer menor ou igual a 2 kg.</p> <p>7.2. Se não for possível usar o método canguru de forma contínua para os bebês com peso ao nascer menor ou igual a 2 Kg, recomenda-se o uso do método canguru de forma intermitente ao invés dos cuidados convencionais.</p> <p>7.3. Os recém-nascidos instáveis com peso ao nascer menor ou igual a 2Kg ou os recém-nascidos estáveis com peso inferior a 2Kg que não podem participar do método canguru, devem ser cuidados em um ambiente térmico neutro, ou seja sob aquecedores radiantes ou em incubadoras.</p> <p>7.4. Não há evidência suficiente sobre a eficácia dos envoltórios de filme plástico no cuidado térmico dos prematuros imediatamente após o parto. No entanto, durante a estabilização e transferência do prematuro para o berçário, o uso desses envoltórios pode ser</p>

	considerado como uma alternativa para evitar a hipotermia.
Pressão positiva contínua nas vias aéreas em recém-nascidos com síndrome do desconforto respiratório	<p>8.0. O uso de pressão positiva contínua nas vias aéreas é recomendado para o tratamento dos recém-nascidos prematuros com síndrome do desconforto respiratório</p> <p>8.1. A pressão positiva contínua nas vias aéreas em recém-nascidos com síndrome do desconforto respiratório deve ser iniciada assim que o diagnóstico for feito.</p>
Uso de surfactante em recém-nascidos com síndrome do desconforto respiratório	<p>9.0. O uso de surfactante exógeno é recomendado para os recém-nascidos com síndrome do desconforto respiratório que estejam intubados e em ventilação mecânica.</p> <p>9.1. Tanto o surfactante de origem animal como o sintético podem ser utilizados em recém-nascidos prematuros com síndrome do desconforto respiratório e que estejam em ventilação mecânica.</p> <p>9.2. Não é recomendado o uso profilático de surfactante em recém-nascidos prematuros antes do início da síndrome do desconforto respiratório.</p> <p>9.3. Em recém-nascidos prematuros intubados com síndrome do desconforto respiratório, o surfactante deve ser usado precocemente (nas primeiras 2 horas após o nascimento), ao invés de esperar a piora dos sintomas antes de iniciar o tratamento.</p>
Uso e dosagem de oxigênio para os	10.0. Para a ventilação dos prematuros que nasceram com idade gestacional menor ou igual a 32 semanas, recomenda-se iniciar oxigenioterapia com 30% de

recém-nascidos prematuros	<p>oxigênio ou com ar ambiente (se não houver essa concentração de oxigênio disponível), e não com oxigênio a 100%.</p> <p>10.1. O uso de concentrações crescentes de oxigênio só deve ser considerado para os prematuros em oxigenioterapia com frequência cardíaca menor que 60 batimentos por minuto, após 30 segundos de ventilação adequada com 30% de oxigênio ou com ar ambiente.</p>
------------------------------	--

## Anexo B – Comprovante de submissão do projeto de pesquisa e aprovação pelo comitê de ética em pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento e Avaliação de Biomarcadores Associados à Patologias no Período Neonatal e Implicações Diagnósticas e Prognósticas

**Pesquisador:** VÂNIA OLIVETTI STEFFEN ABDALLAH

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 36471314.5.0000.5152

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.360.814

## Anexo C - Comprovante de submissão do artigo

# Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

**Submitted to** Pediatrics

**Manuscript ID** 2018-3745

**Title** Clinical and laboratory predictors for bronchopulmonary dysplasia in preterm infants

**Authors** Nascimento, Camila  
Maia, Larissa  
Alves, Patricia  
Cunha-Junior, Jair  
Abdallah, Vânia  
Ferreira, Daniela  
Goulart, Luiz Ricardo  
Azevedo, Vivian

**Date Submitted** 22-Nov-2018

[Author Dashboard](#)

## APÊNDICES

### Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Recém-nascido

Prezada senhora, o(a) menor (a), pelo qual a senhora é responsável, está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada “**Avaliação de biomarcadores no período neonatal**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Daniela Marques de L. M. Ferreira, Patrícia Terra Alves, Lídia Mayrink de Barros, Heloísio dos Reis, Aive Oliva Santos, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa, Andréia de Albuquerque Freitas, Angela Maria Oliveira e Larissa Prado Maia.

Neste pesquisa nós estamos buscando novos exames que possam nos mostrar mais precocemente se o bebê recém-nascido está com infecção.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido por um destes pesquisadores: Daniela Marques de L. M. Ferreira, Lídia Mayrink de Barros, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa ou Andréia de Albuquerque Freitas, após o nascimento do seu bebê, durante a sua internação hospitalar na Maternidade do Hospital das Clínicas da UFU.

A participação do(a) seu(sua) filho (o) será autorizando a utilização de uma amostra do sangue e urina dele que já é colhido para exames de rotina referentes aos cuidados médicos. Se o seu filho tiver nascido prematuro e adoecer com suspeita que esteja com infecção será autorizando também a utilização de uma amostra do líquido e secreção traqueal (que apenas será colhido para fazer o diagnóstico desta infecção, se houver necessidade, por decisão da equipe médica

que está cuidando do seu bebê). Em nenhum momento o(a) menor será identificado(a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a identidade dele(a) será preservada.

O(A) menor não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos consistem no incômodo que ele(a) poderá sentir com a coleta do sangue e urina, porém estes materiais já serão coletados rotineiramente para os cuidados dele(a) durante a internação e no incômodo que ele(a) poderá sentir com a coleta de secreção traqueal e líquido, que também serão colhidos rotineiramente no caso dele ter suspeita de infecção. Os benefícios que haverão, mesmo que não diretamente, são o avanço no diagnóstico mais cedo das infecções nos bebês possibilitando início do tratamento mais rápido e contribuindo para diminuir a mortalidade dos bebês.

O(A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com a senhora.

Se houver qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores Profa. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah, Dra. Daniela Marques de L. M. Ferreira, Lídia Mayrink de Barros, Maria Carolina Martins, Daniela Silva Rodrigues da Costa ou Andréia de Albuquerque Freitas - Hospital das Clínicas, Serviço de Neonatologia - Av. Pará, 1720. Bairro Umuarama - Telefones: 3218-2112 / 3218-2454.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia – A. João Naves de Ávila, 2121 bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG – CEP: 38408-100

– Telefone: 3239-4131.

Uberlândia, ..... de ..... de 20....

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu, responsável legal pelo(a) menor \_\_\_\_\_  
consinto na participação dele no projeto citado acima, após ter sido devidamente  
esclarecida.

---

Responsável pelo(a) menor participante da pesquisa

## Apêndice B – Instrumento de Coleta de Dados

### INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

#### IDENTIFICAÇÃO

Nº sujeito pesquisa \_\_\_\_\_ Nº prontuário mãe \_\_\_\_\_ Nº prontuário

RN \_\_\_\_\_

Nome

RN \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### DADOS MATERNOS, PRÉ-NATAL E PARTO

Idade Materna: \_\_\_\_\_

Estado Civil: ( ) Solteira ( ) Casada ( ) Amasiada ( ) Viúva ( ) Divorciada

Escolaridade: ( ) 1a 3 anos ( ) 4 a 7 anos ( ) 8 a 11 anos ( ) 12 ou + ( )  
ignorado

Nº gestações (filhos vivos) \_\_\_\_\_ Nº abortos \_\_\_\_\_ Nº consultas pré-  
natal: \_\_\_\_\_

Corticoide antenatal: ( ) Não ( ) Sim, 1 dose ( ) Sim, 2 doses ( )  
Sim, ≥ 3 doses

Anormalidades do pré-natal:

- |   |   |  |
|---|---|--|
| <input type="checkbox"/> Infecção urinária fetal agudo  | <input type="checkbox"/> Corioamnionite | <input type="checkbox"/> Sofrimento      |
| <input type="checkbox"/> Pré-eclâmpsia quantas horas?__ | <input type="checkbox"/> Sífilis        | <input type="checkbox"/> Ruprema,        |
| <input type="checkbox"/> RCIU                           | <input type="checkbox"/> TPP            | <input type="checkbox"/> Oligodrâmnio    |
| <input type="checkbox"/> Anormalidade congênita         | <input type="checkbox"/> Diabetes       | <input type="checkbox"/> Drogas ilícitas |
| <input type="checkbox"/> Toxoplasmose                   | <input type="checkbox"/> HIV            | <input type="checkbox"/> HBsAg           |
| <input type="checkbox"/> DPP                            |   |  |

Uso de ATB:

Não  Sim. Quando?  1° trim.  2° trim.  3° trim.  48 horas antes parto

Qual ATB? \_\_\_\_\_

Tipo de parto:  Vaginal  Cesariana

### DADOS DO RECÉM-NASCIDO

Data nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo:  Masc.  Fem.

Indeterminado

Gemelaridade:  Sim  Não Boletim de Apgar 1° min \_\_\_\_\_ 5° min \_\_\_\_\_

Peso nascimento: \_\_\_\_\_ Idade Gestacional Clínica:

\_\_\_\_\_

Classificação do RN:  PIG  AIG  GIG SNAPPE II:

\_\_\_\_\_

Surfactante: ( ) Sim ( ) Não      Uso de  $\beta$ -bloqueadores: ( ) Sim ( ) Não

Hemotransfusão: ( ) Não ( ) Sim Idade: \_\_\_\_\_ Hemocomponente:

\_\_\_\_\_

Canal Arterial Persistente: ( ) Não ( ) Sim

Infecções:

( ) diarreia                      ( ) meningite                      ( ) onfalite                      ( )  
 conjuntivite                      ( ) HIV                      ( ) infecções cutânea ( )  
 ) sífilis                      ( ) CMV  
 ( ) risco infeccioso                      ( ) toxoplasmose                      ( ) sepse precoce                      ( )  
 sepse tardia

Dispositivos e Procedimentos:

V.M. \_\_\_\_\_ dias

VM no 2º dia: ( ) Não ( ) Sim,

FiO2: \_\_\_\_\_ CPAP nasal \_\_\_\_\_ dias      CPAP nasal no 2º

dia: ( ) Não ( ) Sim, FiO2: \_\_\_\_\_

Prongra nasal \_\_\_\_\_ dias      Prongra nasal no 2º dia: ( ) Não ( ) Sim,

FiO2: \_\_\_\_\_

Ar ambiente \_\_\_\_\_ dias      Ar ambiente no 2º dia: ( ) Não ( ) Sim,

FiO2: \_\_\_\_\_      PICC \_\_\_\_\_ dias      Cat. Umb.( )

nao ( ) sim (arterial, venoso) \_\_\_\_\_ dias      CVC \_\_\_\_\_ dias

NPP \_\_\_\_\_ dias

SVD \_\_\_\_\_ dias

Drenos \_\_\_\_\_ dia

Procedimento Cirúrgico: ( ) Não ( ) Sim. Quantos dias de vida, \_\_\_\_\_.

Qual? \_\_\_\_\_

( ) Alta hospitalar

( ) Transferência

( ) Óbito

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Diagnósticos: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_