



## Inflamação do parênquima pulmonar na asma e sua relação com as vias aéreas\*

### *Pulmonary Parenchyma inflammation in asthma*

Simões SM, Santos MA, Ferbezlians, Garippo AL, Oliveira MS, Fontes ES, Castro I, Castro FFM, Martins MA, Saldera PHN, Mauadt, Dolnikoff M

#### Resumo

A inflamação na asma não está limitada às vias aéreas e pode comprometer também o parênquima pulmonar periférico, no entanto, não há estudos na literatura que enfoquem a participação do parênquima pulmonar na asma.

**Objetivo:** Caracterizar o infiltrado inflamatório do parênquima peribronquiolar e distal em vítimas de asma fatal, comparando-o ao de outras regiões de vias aéreas e a de tecido pulmonar de não asmáticos.

Fragmentos de tecido pulmonar obtidos de 20 pacientes com asma fatal e 10 controles, necropsiados no Serviço de verificação de óbito da capital – São Paulo, foram submetidos a estudo de imuno-histoquímica e marcados com anticorpos anti-proteína básica principal (eosinófilos), anti-triptase (mastócitos), anti-elastase neutrofílica (neutrófilos) e anti-marcadores de superfície de linfócitos (CD3, CD8, CD45 e CD20). Foram determinadas as densidades celulares no parênquima pulmonar periférico peribronquiolar e distal e nas áreas interna e externa das vias aéreas de grande e de pequeno calibre.

**Resultados:** A densidade de eosinófilos foi significativamente maior nas duas regiões do parênquima pulmonar de asmáticos comparados aos controles, bem como nas vias aéreas ( $p < 0,02$ ). Nos pacientes asmáticos a densidade eosinofílica se mostrou menos no parênquima distal em relação à da área interna da via aérea grande apenas ( $p < 0,01$ ). A densidade dos mastócitos foi maior no parênquima peribronquiolar, bem como na área externa das vias aéreas de grande e de pequeno calibre de asmáticos comparados aos controles ( $p < 0,04$ ). Diferenças significativas quanto à densidade de linfócitos se restringiram às vias aéreas de asmáticos comparadas as de controles. Maior densidade de neutrófilos foi observada apenas no parênquima peribronquiolar de asmáticos ( $p = 0,029$ ).

**Conclusões:** O parênquima pulmonar participa do processo inflamatório na asma fatal com aumento de células efetoras (mastócitos, neutrófilos e eosinófilos). A área externa da via aérea foi a região que melhor diferenciou o asmático do controle e com o maior número de diferenças significativas. A inflamação do parênquima peribronquiolar, associado ao da área externa da via aérea pequena, reforça o papel do pulmão distal na patofisiologia da asma.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(1):26-31 asma, inflamação, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos.

#### Introdução

Estudos sugerem que a resposta inflamatória na asma não esteja limitada às vias aéreas, mas comprometa também o parênquima pulmonar periférico<sup>1-3</sup>. A participação do pa-

#### Abstract

It has been demonstrated that distal lung inflammation in asthma may significantly contribute to the pathophysiology of the disease. Although it is now accepted that lung inflammation in asthma is not restricted to the intrapulmonary airways, little is known about cell distribution in lung parenchyma and its relation to the intrapulmonary airways.

**Objective:** The purpose of this study was characterize the cellular content in the lung parenchyma of fatal asthma as compared to controls and to compare the alveolar tissue infiltrate in fatal asthma with different regions of large and small airways.

**Methods:** Pulmonary tissue fragments were obtained during autopsy procedure from 20 subjects with fatal asthma and 10 controls. Immunohistochemical staining, image analysis and morphometric analysis were used to determine cellular density in inner and outer areas of large and small airways and in parenchyma (peribronchiolar and distal). Eosinophil, neutrophil, mast cell and lymphocyte content was determined in these regions.

**Results:** Eosinophil density was higher in all studied areas in fatal asthma compared with controls ( $p < 0,02$ ), but, in asthmatics, it was significantly decreased in distal parenchyma only when compared to inner wall of large airways ( $p < 0,01$ ). Mast cell content was higher in peribronchiolar and in the outer area of large and small airways of fatal asthma compared with controls ( $p < 0,04$ ). Lymphocytes showed increased content only in fatal asthma intrapulmonary airways compared with controls ( $p < 0,05$ ). Increased neutrophil content was observed only in peribronchiolar parenchyma of fatal asthma ( $p = 0,029$ ).

**Conclusions:** There is a localized distribution of alveolar inflammation at the peribronchiolar region for eosinophils, mast cells and neutrophils and at distal parenchyma for eosinophils. The outer wall of airways is the main site of inflammatory changes in fatal asthma. Our findings provide further evidence of the importance of the lung periphery in the pathophysiology of asthma.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(1):26-31 asthma, inflammation. T lymphocytes, eosinophils, neutrophils, mast cells.

renquima alveolar na patofisiologia da asma tem sido alvo de interesse, uma vez que o tecido pulmonar periférico responde a estímulos broncoconstritores mesmo na ausência de vias aéreas, com diversos mecanismos sendo propostos<sup>4,5</sup>.

\*Trabalho agraciado com o Prêmio Antônio Oliveira Lima no 31º Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia Universidade de São Paulo

Infiltrado eosinofílico predominantemente alveolar foi encontrado em paciente com asma noturna, correlacionando-se à queda da função pulmonar<sup>1</sup>. Além disso maior expressão de IL-5 e aumento significativo no número de eosinófilos foi encontrado na parede dos alvéolos de indivíduos asmáticos comparados a controles<sup>3,6</sup>. Esses estudos foram realizados com amostras de tecido pulmonar obtidas através de biópsias endobrônquica e transbrônquica e da ressecção de tecido pulmonar peribrônquico não permitindo análise minuciosa do parênquima pulmonar devido à quantidade de material disponível. A maior quantidade de material obtido através de autópsia permite o estudo dos diferentes segmentos da árvore brônquica, inclusive do parênquima pulmonar periférico.

Considerando que não há na literatura mundial, até o momento, trabalhos que enfoquem a participação do parênquima pulmonar na asma, o objetivo de nosso estudo foi caracterizar o infiltrado inflamatório do parênquima pulmonar peribrônquilar e distal dos indivíduos que morreram por asma, comparando-o com o conteúdo inflamatório das vias aéreas e com o tecido pulmonar de controles não asmáticos.

## Pacientes e métodos

Foram estudados fragmentos de tecido pulmonar obtidos de 20 pacientes que morreram por asma, autopsiados no Serviço de verificação de óbito da capital (SVOC) da FMUSP, de 1996 a 2000. Seis fragmentos de tecido pulmonar de regiões proximais e distais dos pulmões foram coletados no momento da autópsia. Amostra de tecidos de outros órgãos (fígado, baço, rim e miocárdio), obtidas como procedimento de rotina, foram também estudadas.

Critérios de inclusão: 1. História prévia de asma e morte por asma; 2. Alterações patológicas compatíveis com asma fatal (hipersecreção e hiperinsulfilação pulmonar; descamação do epitélio, espessamento da membrana basal, hipertrofia de glândulas submucosas, hipertrofia de músculo liso, inflamação de mucosa com ou sem eosinófilos). Foram excluídos indivíduos com sinais de qualquer outra doença pulmonar não diagnosticada previamente.

Questionário aplicado a familiares por assistentes sociais foi realizado para obtenção de informações clínicas adicionais sobre tabagismo, tempo de doença e tratamento de asma.

Dez pacientes que morreram de causas não pulmonares, sem doenças pulmonares prévias, não fumantes, foram aleatoriamente selecionados como controles. Pulmões utilizados como controles apresentavam exame macroscópico e microscópico sem alterações.

Os fragmentos de tecido foram fixados e emblocados em parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram realizados para coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) e realização de imuno-histoquímica, utilizando a técnica de imuno-peroxidase.

Para imuno-histoquímica os cortes foram submetidos à desparafinização e inibição da peroxidase endógena. A exposição dos epitopos dos marcadores celulares foi feita com pré-tratamento com tripsina a 0,1% ou aquecimento em panela de pressão. Solução de avidina e timidina foram aplicadas em todos os cortes para diminuir a interação inespecífica, com posterior drenagem da solução.

Os tipos celulares estudados foram identificados pelos anticorpos: Linfócitos T CD3+ (Anti-CD3, Rabbit Anti-Human T cell CD3 PC3/188 A, DAKO); Linfócito T CD8 + (Anti-CD8, Mouse anti-Human CD8, T cell, DAKO); Linfócito T CD4 + (Anti-CD4, Mouse anti-Human CD4, clone IF6, SERO); Linfócito B (Anti-CD20, Mouse anti-Human CD20 B-cell, L26, DAKO); Neutrófilos (Anti-elastase neutrofílica, Mouse anti-Human Neutrophil elastase, DAKO), Eosinófilos (Anti-Major Basic Protein/MBP, BMK13, Guinea pig anti-Hu-

man, Accurate Chemical) e Mastócitos (anti-tryptase, Mouse anti-Human Mast Cell, DAKO), sendo utilizados conforme orientação dos fabricantes. As lâminas de tecidos marcadas foram contra-coradas com hematoxilina. Para a marcação do eosinófilo foi necessária a utilização de um sistema de amplificação de sinal (DAKO® Catalyzed Signal Amplification – CSA – System, Peroxidase; Carpinteria, CA, USA).

## Quantificação celular

Foram analisados em cada caso, dez campos na área de acoplamento alveolar e dez campos ao longo do parênquima distal, com aumento de 400X, com técnicas de morfometria. Os acoplamentos alveolares foram definidos com os septos alveolares que se estendem radialmente a partir da parede das pequenas vias aéreas ( $\leq 2,0$  mm de perímetro)<sup>7</sup>. O parênquima distal foi definido como aquele distando pelo menos um campo (aumento de 100x) da parede das pequenas vias aéreas. Utilizando-se um retículo de 100 pontos acoplados à ocular do microscópio, foram computados em cada campo o número de células inflamatórias e o número de pontos que incidiam no septo alveolar correspondente ao número de células por área de tecido alveolar<sup>8</sup>. Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado ( $\text{cel}/\text{mm}^2$ ), equivalente à densidade celular.

A quantificação do infiltrado inflamatório das vias aéreas foi realizada com uso de um Sistema de Análise de Imagens – Software Image-Pro® Plus 4.1 para Windows® (Media Cybernetics – Silver Spring, MD, USA), instalado em um microcomputador PC, conectado a uma câmera digital (JVC TK-C1380 Color Vídeo Câmera, Victor Company of Japan Limited, Japan), acoplada a microscópio óptico (leica DMR, Leica Microsystems, Wetzlar GmbH, Germany).

Diferentes células inflamatórias foram quantificadas em uma área de interesse localizada em duas regiões específicas da parede das vias aéreas: 1) área interna, localizada entre a membrana basal e o limite interno da musculatura lisa, e 2) área externa, localizada entre o limite externo da musculatura lisa da via aérea e a cartilagem, glândulas ou alvéolos. Em cada caso, foram medidos em cada área de interesse dez campos com aumento de 400x em grandes vias aéreas (perímetro  $>2$  mm) e toda a circunferência de duas vias aéreas pequenas (perímetro  $\leq 2$  mm). Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado ( $\text{cel}/\text{mm}^2$ ).

Assim, foram estudadas seis regiões pulmonares em cada paciente: área interna de vias aéreas de grande calibre (IG), área externa de via aérea de grande calibre (EG), área interna de via aérea de pequeno calibre (IP), área externa de via aérea de pequeno calibre (EP), parênquima peribrônquilar (PBq) e parênquima distal (PD).

## Análise Estatística

Comparações das densidades, celulares entre asmáticos e controles foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. Entre as diversas regiões foram feitas por "análise de variância para medidas repetidas de Friedmanb" com "pós-teste de Dunnett" e correlação de Spearman. Os resultados foram expressos em medianas e limites superiores e inferiores.

Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos para todas as análises estatísticas.

## Resultados

### Caracterização dos Pacientes

A idade dos pacientes asmáticos variou de 15 a 67 anos (mediana de 39 anos) e onze eram do sexo feminino. Cinco pacientes tinham história de tabagismo. A maioria tinha asma de longa duração ou de início da infância. Apenas

quatro pacientes usavam corticosteróides: dois recebiam corticosteróides orais nas crises, um dos quais utilizava também medicação inalatória (Beclometasona) regularmente; os outros dois pacientes usavam Beclometasona diariamente, sendo um deles usuário contínuo de corticosteróide oral associado agonistas B2 nas crises eram a única droga utilizada por todos pacientes, sem exceção. Em dez pacientes, familiares referiram uso associado de aminofilina.

A idade dos pacientes controles variou de 20 a 74 anos (mediana de 50 anos), sendo oito de sexo feminino. As causas de óbito foram: acidente vascular cerebral, choque hipovolêmico, infarto agudo do miocárdio, valvulopatia mitral e causa indeterminada.

Não houve diferença significativa quanto a idade entre os pacientes asmáticos e controles ( $p=0,005$ ).

**Densidade Inflamatória Eosinófilos**

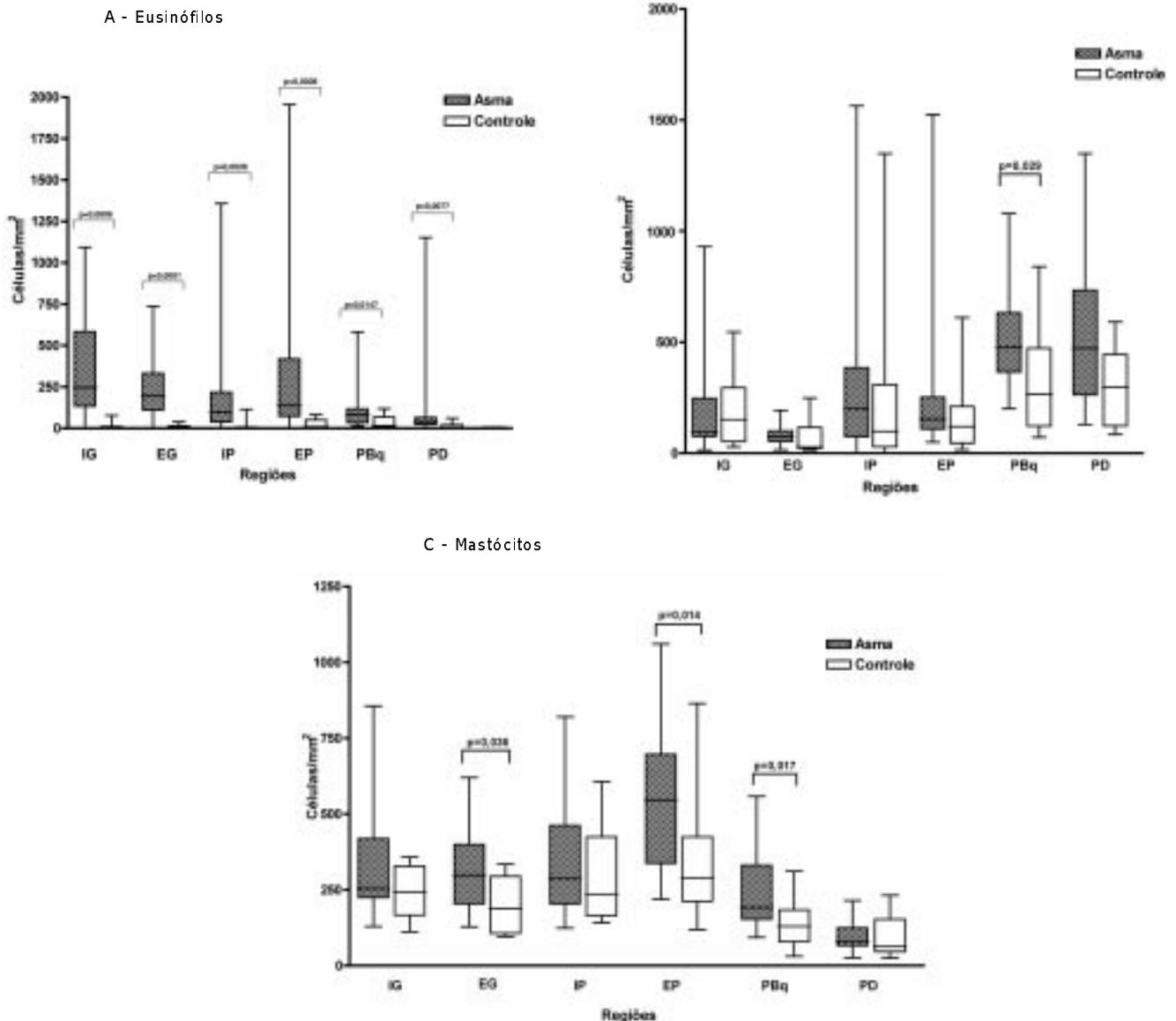
A densidade de eosinófilos foi significativamente maior em todas as regiões do parênquima pulmonar e das aéreas de asmáticos comparados as dos ( $p<0,02$ ) (figura 1A). A figura 2 mostra o infiltrado eosinofílico no parênquima distal no asmático e no controle.

A densidade eosinofílica na asma fatal nas duas regiões do parênquima se mostrou menos do que a das vias aéreas, porém somente encontramos diferença significativa entre a área interna da via aérea grande e o parênquima distal ( $p<0,01$ ). Não foram observadas diferenças significativas na densidade de eosinófilos entre vias aéreas centrais e periféricas.

Não foram observadas diferenças significativas entre as diversas regiões estudadas nos controles.

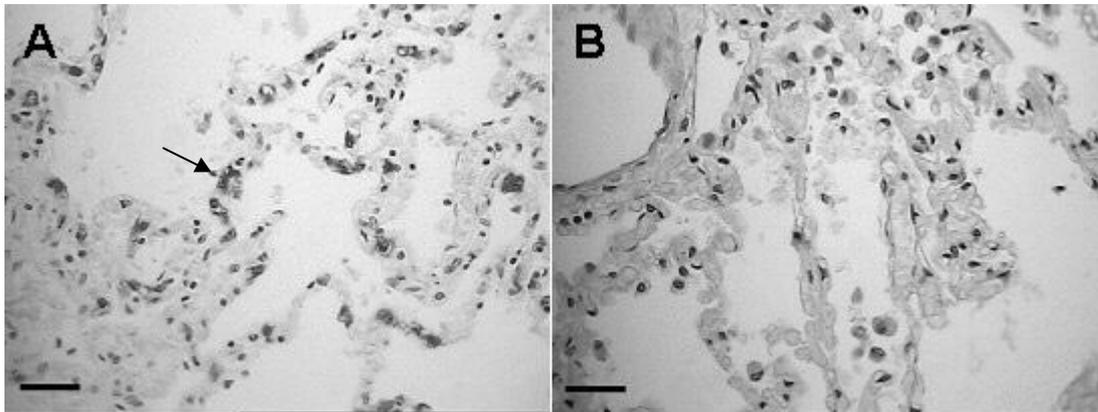
**Figura 1** –Densidade celular nos compartimentos pulmonares em asmáticos e controles

B - Neutrófilos



Nota: IG= área interna de vias aéreas grandes; EG= área externa de vias aéreas grandes; IP= área interna de vias aéreas pequenas; EPO= área externa de vias aéreas pequenas; PBq= parênquima peribronquiolar; PD= parênquima distal.

**Figura 2** – Corte histológico do parênquima distal com infiltrado eosinofílico (seta) de paciente asmático (A) e controle (B). Imuno-histoquímica marcada com anti-proteína básica principal. Escala: 25µm.



### Neutrófilos

De todas as regiões estudadas, somente o parênquima peribronquiolar dos asmáticos mostrou aumento significativo da densidade de neutrófilos em relação aos controles ( $p=0,029$ ) (figura 1B). As duas regiões de parênquima pulmonar exibiram densidade significativamente maior de neutrófilos quando comparadas às vias aéreas grandes e área interna de vias aéreas pequenas ( $p<0,05$ ). Este resultado foi observado tanto em asmáticos como nos controles, sendo que nos controles a diferença ocorreu entre as duas regiões do parênquima e a área externa de vias aéreas grandes.

### Mastócitos

A densidade de mastócitos foi significativamente maior no parênquima peribronquiolar ( $p=0,017$ ) e nas áreas externas de grandes e pequenas vias aéreas dos asmáticos comparados aos controles ( $p=0,036$  e  $p=0,014$  respectivamente) (figura 1C). A área externa da via aérea pequena dos casos de asma fatal foi a região mais rica em mastócitos, sendo a densidade celular significativamente maior quando comparada à área externa de grandes vias aéreas ( $p<0,01$ ) e às duas regiões do parênquima pulmonar periférico ( $p<0,001$ ). Observou-se também número significativamente menor de mastócitos no parênquima distal ( $p<0,01$ ) de asmáticos em relação às quatro regiões das vias aéreas. De forma semelhante aos asmáticos, a menor densidade de mastócitos nos controles foi observada no parênquima distal, sendo significativamente menor quando comparada à área interna de via aérea de grande calibre e às duas regiões da via aérea pequena ( $p<0,01$ ).

### Linfócitos

Não houve diferenças significativas quanto à densidade de linfócitos no parênquima pulmonar de asmáticos comparados a controles. A comparação entre os grupos mostrou maior quantidade de células CD3+ e CD20+ nas áreas interna e externa das vias aéreas grandes ( $p<0,02$ ) e na área externa da via aérea pequena dos asmáticos ( $p < 0,009$ ). Somente a área externa das vias aéreas grandes e pequenas revelou maior densidade de linfócitos T CD4+ na asma fatal quando comparado aos controles ( $p=0,045$  e  $p=0,01$  respectivamente). Não houve diferença significativa entre os grupos na densidade de linfócitos T CD8+.

Comparando-se a densidade de linfócitos nas duas regiões do parênquima com as diferentes camadas das vias aéreas nos indivíduos asmáticos, observamos diferenças na

densidade de linfócitos apenas no parênquima distal. Notamos diminuição significativa da densidade de linfócitos CD4+ ( $p<0,01$ ) e CD20+ ( $p<0,01$ ) no parênquima distal em relação à área externa das vias aéreas grandes e pequenas. A densidade de linfócitos CD3+ no parênquima distal foi menor quando comparada às duas regiões das vias aéreas grandes e à área externa da via aérea pequena ( $p<0,001$ ). Observou-se ainda menor densidade de linfócitos CD8+ no parênquima distal comparado à área externa da via aérea pequena ( $p<0,05$ ).

Pacientes controles não apresentaram diferenças significativas na densidade de linfócitos nas diferentes regiões estudadas, exceto na densidade de linfócito T CD4+, que mostrou diminuição significativa no parênquima distal quando comparado à área externa das vias aéreas grandes ( $p<0,01$ ).

### Correlações

Nos pacientes com asma fatal, não foram observadas correlações significativas entre vias aéreas e parênquima pulmonar. Não se observaram correlações significativas entre os diferentes tipos celulares estudados.

### Análise de tecidos extra-pulmonares

Análise de cortes representativos de fígado, baço, rim e miocárdio corados por hematoxilina-eosina (HE) não mostrou alterações microscópicas importantes ou presença de infiltrado eosinofílico em asmáticos ou em controles.

### Discussão

Os principais achados desse estudo foram: 1) aumento significativo de eosinófilos em todo o parênquima pulmonar dos asmáticos; 2) maior densidade de mastócitos, neutrófilos e eosinófilos em parênquima peribronquiolar nos pacientes asmáticos e 3) a presença de infiltrado linfócitos restrito às vias aéreas na asma fatal.

O eosinófilo foi a única célula encontrada em maior densidade tanto no parênquima peribronquiolar como no distal dos asmáticos comparados aos controles. Esse achado é compatível com relatos prévios<sup>1,3</sup>. Esses estudos, entretanto, não definiram regiões específicas de parênquima pulmonar analisado, impossibilitando a comparação precisa com nossos resultados.

O papel dos eosinófilos no parênquima pulmonar na asma não está esclarecido.

Estudos *in vitro* mostram que fatias de tecido pulmonar periférico de animais e de humanos respondem a substâncias broncoconstrictoras liberadas pelo eosinófilos poderiam, assim, estar envolvidas em uma resposta alveolar.

A análise de outros tecidos (rim, miocárdio, baço e fígado) não mostrou presença significativa de eosinófilos, descartando a hipótese de que a presença dessas células no parênquima pulmonar fosse apenas o reflexo da eosinofilia sangüínea. Esse achado sugere que o infiltrado eosinofílico observado no parênquima seja resultante de uma mecanismo de endereçamento para o tecido pulmonar.

Considerando-se apenas os pacientes asmáticos, o parênquima distal mostrou a menor densidade de eosinófilos, sendo que a diferença se revelou apenas quando for comparado à área interna das grandes vias aéreas. Diferenças em relação ao tipo de irrigação sangüínea e ao grau de exposição antigênica entre esses compartimentos podem contribuir para o padrão inflamatório observado em cada região.

Não foram evidenciadas correlações significantes entre o infiltrado eosinofílico das vias aéreas e do parênquima pulmonar, o que sugere que a análise das aéreas de pacientes asmáticos não permite prever o estado inflamatório na periferia do pulmão. Assim, o estudo da inflamação de compartimentos pulmonares periféricos na asma necessita de procedimentos que permitam a obtenção direta de fragmentos correspondentes a vias aéreas pequenas e tecido alveolar.

Ao contrário dos eosinófilos, nos pacientes estudados linfócitos se restringiram às vias aéreas. É possível que linfócitos residentes no parênquima pulmonar possam estar ativados liberando citocinas, como IL-5, capazes de favorecer a vinda de eosinófilos para esse compartimento pulmonar<sup>6</sup>.

O nosso estudo mostrou aumento de mastócitos, eosinófilos e neutrófilos no parênquima peribronquiolar dos asmáticos. A presença dessas células nas áreas de acoplamento dos septos alveolares com as vias aéreas periféricas, poderia ter repercussões clínicas e funcionais. Enzimas liberadas como triptase, quimase, elastase, metaloproteinases, collagenases, bem como radicais livres de oxigênio poderiam danificar septos alveolares comprometendo o acoplamento das vias aéreas mais distais ao parênquima pulmonar e conseqüentemente aumentando a resistência dessas vias aéreas. A ruptura de septos alveolares peribronquiolares na asma fatal foi documentado recentemente por Mauad et al<sup>11</sup>.

A densidade de neutrófilos foi significativamente maior no parênquima pulmonar periférico comparado às vias aéreas, assim como a densidade de mastócitos foi menor no parênquima distal em relação às vias aéreas tanto em asmáticos como em controles. Esses achados poderiam resultar da marginação de neutrófilos no leito vascular pulmonar em decorrência do óbito e do padrão normal de distribuição mastocitária no organismo<sup>12</sup>.

Além da inflamação do parênquima pulmonar, esse estudo mostrou que a área externa das vias aéreas grandes e pequenas foi a região que melhor diferenciou asmáticos de controles, mostrando o maior número de diferenças significativas entre os dois grupos (mastócitos, eosinófilos e linfócitos CD3+, CD4+ e CD20+). Essas diferenças foram mais acentuadas nas vias aéreas pequenas que apresentaram diferenças mais significativas do que nas vias aéreas grandes. Haley et al<sup>13</sup> analisaram pulmões obtidos por autópsia de asmáticos e de indivíduos com fibrose cística, concluindo que, nos asmáticos, a densidade do infiltrado celular nas vias aéreas pequenas era maior na área externa do que na área interna.

Considerando seu potencial de determinar alterações funcionais, a inflamação do pulmão distal-termo utilizado

para definir a região compreendida entre vias aéreas menores que 2 mm de diâmetro e todo o parênquima pulmonar periférico<sup>14</sup> - aponta para a necessidade de que esse compartimento pulmonar seja alvo de tratamento antiinflamatório. Corticosteróides inalatórios, atualmente utilizados como terapia de escolha para o controle da asma<sup>15</sup> e tradicionalmente administrado por meio de aerossóis, se depositam predominantemente em vias aéreas centrais devido ao tamanho da partícula inalada<sup>16</sup>. Estudos têm mostrado que propelente alternativo (hidrofluoroalcano, HFA) combinado ao corticosteróide reduz o tamanho da partícula permitindo que maior percentagem da droga se deposite nas vias aéreas de pequeno calibre.

## Conclusão

Esse estudo demonstrou o comprometimento do parênquima pulmonar periférico que, combinado ao das vias aéreas periféricas, caracteriza a inflamação do pulmão distal acometendo pacientes asmáticos que foram a óbito durante a exacerbação da doença. A importância desses achados se reflete na terapêutica antiinflamatória inalatória atualmente instituída para pacientes asmáticos que não possui potencial de alcance periférico. Tornar o pulmão distal um alvo de tratamento antiinflamatório pode contribuir para melhor controle da doença.

## Referências

1. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(5): 1505-10.
2. Kraft M, Martin RJ, Wilson S, Djukanovic R, Holgate ST. Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(1): 228-34.
3. Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG et al. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100(1): 44-51
4. Dolhnikoff M, Morin J, Ludwig MS. Human lung parenchyma responds to contractile stimulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(5 pt 1): 1607-12.
5. Ludwig MS. Role of Lung Parenchyma. In A.J. Woolcocks, Asthma. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997, p. 1319-1334.
6. Minshall EM, Hogg JC, Hamid QA. Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(3): 386-90.
7. Saetta M, Ghezzi H, Kim WD, King M, Angus GE, Wang NS et al. Loss of alveolar attachments in smoker. A morphometric correlate of function impairment. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132(4): 894-900.
8. Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology: three-dimensional measurement in microscopy. *Microscopy Handbooks*. Vol. 41. 1998, New York: Springer-Verlag & BIOS Scientific Publishers Ltd. 246.
9. Bertram JF, Goldie RG, Papadimitriou JM, Paterson JW. Correlations between pharmacological responses and structure of human lung parenchyma strips. *Br J Pharmacol* 1983; 80(1): 107-14.
10. Ludwig MS, Dallaire MJ. Structural composition of lung parenchymal strip and mechanical behavior during sinusoidal oscillation [published errata appear in *J Appl Physiol* 1995 Mar; 78(3): following table of contents and 1995 Jun; 78(6): following table of contents]. *J Appl Physiol* 1994; 77(4):2029-35.
11. Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins Md M et al. Abnormal Alveolar Attachments with Decreased Elastic Fiber Content in Distal Lung in Fatal Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004.
12. Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. New insights into the role of the mast cell in asthma. *Clin Exp. Allergy* 2003;33(5): 550-6.
13. Haley KJ, Sunday ME, Wiggs BR, Kozakewich HP, Reilly JJ, Mentzer SJ et al. Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(2): 565-72.
14. Sutherland ER, Martin RJ. Distal lung inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89(2): 119-24; quiz 124-5,211.

15. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel 2: Guidelines for the diagnosis and management of asthma. NIH Publication No. 97-4051. 1997, National Institute of Health Bethesda, MD.
16. Leach C. Targeting inhaled steroids. Int J Clin Practic Suppl 1998; 96:23-7.

Correspondência:  
Sílvia de Magalhães Simões  
Rua Rio de São Pedro, 80, apto 901 – Graça  
40150-350 - Salvador - BA