

Artigo original

Modelo experimental de silicose pulmonar em camundongos.

Experimental model of pulmonary silicosis in mice.

Januário Gomes Mourão e Lima¹, Luis Felipe da Fonseca Reis¹, Tatiana Paula Ferreira³, Franklin Mendes Moura¹, Carla Peixoto Vinha de Souza¹, Evelyn Mendes Walchan¹, Luanda Dias da Silva¹, Mônica Medeiros da Silva¹, Fernando Guimarães², Sara Lúcia Menezes².

RESUMO

Introdução: a silicose é uma doença crônica e difusa do pulmão, desenvolvida por trabalhadores expostos a inalação de partículas minerais de sílica cristalina. Depois da inalação, as partículas de sílica são fagocitadas por macrófagos alveolares (MA) que, quando ativados, irão liberar mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, ácido aracônico, quimiocinas e citocinas. Outros tipos celulares também participam da patogênese da silicose, tais como, as células epiteliais bronquiolares e alveolares e os fibroblastos. Os modelos experimentais têm ajudado a elucidar as alterações celulares, moleculares e funcionais no pulmão. Nosso objetivo é mostrar os aspectos celulares da silicose, para ajudar no melhor entendimento dessa doença, utilizando um modelo experimental de silicose pulmonar em camundongos. **Metodologia:** foram utilizados 20 camundongos Swiss, levemente anestesiados, que receberam 50µl de salina (grupo salina) ou 20mg de sílica, diluídos em 50µl de salina estéril intratraqueal. Trinta dias após a instilação, os animais foram sacrificados, foi realizado o lavado broncoalveolar (LBA) e os pulmões foram retirados para análise histopatológica. **Resultados:** na coloração por Hematoxilina e Eosina, observamos um aumento no infiltrado inflamatório, com a formação de granulomas no parênquima pulmonar. Observamos, também, com a coloração por Picro-sírius, que houve um aumento significativo de colágeno nos animais silicóticos. No LBA, os animais do grupo silicose apresentaram aumento significativo de leucócitos totais, monócitos e neutrófilos. **Conclusão:** nossos resultados mostram que o modelo de silicose pulmonar em camundongos pode ser utilizado para o melhor entendimento dessa enfermidade e em futuros estudos de tratamentos.

Descritores: silicose; modelo experimental; fibrose pulmonar; macrófago; camundongo.

ABSTRACT

Introduction: the Silicosis is a chronic and diffuse interstitial lung disease, developing in workers exposed to the inhalation of respirable crystalline silica mineral particles. After the inhalation, silica particles are ingested by pulmonary alveolar macrophages (AM), which become activated and release inflammatory mediators, such as reactive oxygen intermediates, arachidonic acid metabolites, chemokines, and cytokines. Other cell types participate of the pathogenesis of silicosis, such as bronchiolar and alveolar epithelial cells, neutrophils, lymphocytes and fibroblasts. This experimental animal model has allowed elucidation of many cellular, molecular and functional changes in the lung. **Methodology:** twenty Swiss mice, lightly anesthetized received 50µl of sterile saline solution or 20mg of silica particles suspended in 50µl of saline intratracheal. Thirty days after the silica instillation, we made the broncoalveolar lavage (BAL) and the lungs were prepared for histopathological analysis. **Results:** we observed an increased of inflammatory influx and the formation of granuloma in the pulmonary parenchyma. Picro-sirius slices showed an increased of collagen fibers in silicosis group. Silicotic animals, showed an increased number of leucocytes, monocytes and neutrophils. **Conclusion:** our results suggest that this model of pulmonary silicosis in mice can be used for a better understanding of silicosis and futures treatment studies.

Keywords: silicosis; experimental model; pulmonary fibrosis; alveolar macrophage; mouse.

1. Laboratório de Morfologia do Centro Universitário Augusto Motta (LABMORF/UNISUAM).

2. Laboratório de Fisioterapia do Centro Universitário Augusto Motta (LABFISIO/UNISUAM).

3. Laboratório de Inflamação da Fundação Oswaldo Cruz (DFF/IOC/FIOCRUZ).

Apoio financiamento da Universidade Augusto Motta (UNISUAM).

Endereço para correspondência: Januário Gomes Mourão e Lima. Rua Francisco Otaviano, 55/302, Copacabana, CEP 22.080-040, Rio de Janeiro, RJ. Tel: (21) 2521-2443, e-mail: januario@unisuam.edu.br

Recebido em 23/05/2006 e aceito em 25/06/2006, após revisão.

INTRODUÇÃO

A silicose é uma doença crônica e difusa do parênquima pulmonar, que resulta da exposição prolongada a poeiras inaladas que contenham partículas de sílica cristalina.¹ Nos humanos é caracterizada por nódulos fibróticos, causados por uma inflamação persistente, que leva à proliferação de fibroblastos e acúmulo exagerado de colágeno.² O infiltrado inflamatório mononuclear e neutrofilico, e a fibrose subsequente, ocorrem nos locais de deposição da partícula mineral. O macrófago alveolar é a principal célula na resposta tecidual à sílica, uma vez que após a ingestão da partícula desenvolve-se uma série de eventos dependentes da sua ativação. Os macrófagos ativados produzem uma série de citocinas e quimiocinas, que promovem o recrutamento e a ativação de neutrófilos e linfócitos, a proliferação fibroblástica e a deposição excessiva de proteínas da matriz extracelular.^{3,4}

A silicose pulmonar, apesar de bastante estudada, ainda necessita de algumas elucidações sobre sua fisiopatologia. Este trabalho tem o objetivo de avaliar um modelo experimental, para melhor entendimento dessa patologia, por meio do estudo da resposta inflamatória do tecido pulmonar e da participação de células inflamatórias no processo fibrogênico, com ênfase sobre a população de neutrófilos circulantes e macrófagos alveolares.

METODOLOGIA

Animais:

Neste estudo foram utilizados 20 camundongos SWISS (n=10 por grupo), de ambos os sexos, com oito semanas de idade (20-25g de peso corporal), criados e mantidos no biotério do CECAL/FIOCRUZ.

Instilação de sílica ou salina:

Os procedimentos foram realizados com os animais anestesiados com sevoflurano. Vinte miligramas de sílica (SiO₂, S-5631 Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA, tamanho de partícula: 0,5-10µm, cerca de 80% entre 1 a 5µm) foram diluídas em 50µl de salina estéril e instilada por via intratraqueal (dose única), após a dissecação da traquéia. Os animais do grupo controle foram tratados apenas com salina estéril, no mesmo volume e forma de administração dos animais do grupo sílica.

Preparação do tecido para estudo histopatológico:

Os animais foram sacrificados, trinta dias após a instilação de sílica, com uma dose letal de tiopental (i.p.). Os animais foram perfundidos, por meio de uma cânula intracardíaca com solução de salina e heparina (1:10), para a retirada do sangue. Posteriormente, os animais foram fixados, através da mesma cânula, com paraformaldeído (PFA) tamponado a 4%. Cortes histológicos, de 5µm de espessura, foram realizados nos blocos de parafina do tecido pulmonar e submetidos às seguintes colorações: hematoxilina-eosina e picro-sírius.

Estudo dos Macrófagos alveolares:

Para identificação dos macrófagos alveolares foi utilizada lectina BSL-1 biotinilada (Vector Laboratories,

Inc., Burlingame, CA, USA). Os macrófagos alveolares adjacentes aos nódulos silicóticos foram observados nos cortes corados para BSL-1. As imagens foram obtidas no microscópio de luz Olympus BX51, com lente objetiva de 40X, e digitalizadas através da câmara digital Olympus C7070.

Quantificação do colágeno:

Para a quantificação da fibrose, utilizamos os cortes histológicos corados pela técnica do ácido foscímbico-Sirius Red (PMA-SR) e observados em microscópio de luz Olympus BX51. Foram obtidas dez imagens, contendo áreas adjacentes aos bronquíolos respiratórios com lesões nodulares, induzidas pela sílica, no aumento de 20X. As imagens foram processadas e o colágeno foi quantificado, através do programa de análise de imagens Image Pro Plus 4.0, considerando-se a área total estimada em µm².

Contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA):

A medida deste parâmetro foi realizada em cinco animais de cada grupo, selecionados ao acaso. Uma cânula de polietileno foi inserida na traquéia e um total de 1,5ml de solução salina tamponada (PBS) heparinizada (10UI/ml) foi instilado e aspirado, em 2 lavagens sucessivas de 0,75ml. O fluido do LBA foi recolhido em seringa graduada e o volume foi medido.

A contagem dos leucócitos totais do LBA foi realizada em câmara de Neubauer e microscópio de luz (lente objetiva 10x; ocular 10X), após diluição das alíquotas em líquido de Türk (1:40).

As contagens diferenciais foram realizadas em citoesfregaços, centrifugados a uma rotação de 47 x g por 5 min e, posteriormente, corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio de luz com objetiva de imersão em óleo (lente objetiva 100x) e lente ocular de 10X.

Análise estatística:

Todos os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). Para comparação entre os dois grupos experimentais, utilizou-se o teste "t" de Student para amostras não pareadas. Para os testes, os valores de p<0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

Histopatologia:

Os pulmões dos animais salina exibiram parênquima pulmonar preservado, com espaços alveolares livres de células inflamatórias e estruturas bronquiolares revestidas por epitélio cuboidal, pseudo-estratificado e, por vezes, exibindo raras células mononucleares nos alvéolos ou em septos alveolares (figura 1A).

Após 30 dias, os animais silicóticos exibiam parênquima difusamente alterado pela presença de estruturas nodulares (granulomas), por vezes confluentes, constituídas por células inflamatórias, em meio a partículas de sílica (figura 1B). Os granulo-

mas eram constituídos por macrófagos com núcleos ovalados e cromatina frouxa, linfócitos, neutrófilos e algumas células alongadas, fibroblastóides. Havia, também, uma grande quantidade de sílica livre, em meio aos granulomas (figura 1C). Observamos, ainda, que as estruturas granulomatosas localizavam-se em torno dos bronquíolos, fazendo projeções para o interior da luz bronquiolar, com hiperplasia do epitélio bronquiolar.

Na coloração por picro-sírius, observamos um aumento bastante significativo no grupo sílica ($4888,59 \pm 500,7$), em relação ao grupo salina ($220,20 \pm 300,00$), de depósito de fibras colágenas em meio aos granulomas, apresentando um aspecto reticular grosseiro evidente (figura 2).

Estudo dos Macrófagos alveolares:

Os macrófagos alveolares existentes nos pulmões de animais do grupo salina não eram reativos ao BSL 1. Nos animais silicóticos, os macrófagos intersticiais e alveolares apresentaram grande positividade em membrana celular, o que permitiu a identificação da população ativada (figura 3)

Lavado Broncoalveolar (LBA):

Observamos que havia um aumento significativo na celularidade total do LBA nos animais tratados com sílica ($4,85 \pm 0,49$), em relação ao grupo salina ($1,43 \pm 0,11$). Na contagem diferencial no LBA, observamos um aumento significativo, nos animais silicóticos, do número de mononuclear ($5,1 \pm 0,3$) e neutrófilos ($0,59 \pm 0,1$), em relação aos animais salina (mononuclear $1,35 \pm 0,06$; neutrófilos $0,01 \pm 0,00$) (figura 4).

FIGURAS

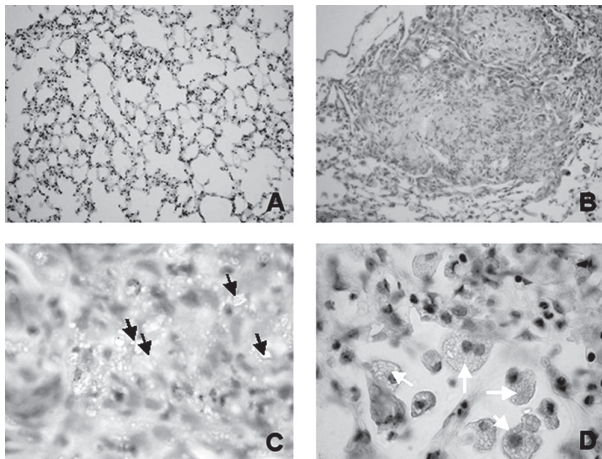


Figura 1 - Fotomicrografias de lâminas histológicas de pulmões de camundongos silicóticos coradas com Hematoxilina e Eosina. A. Grupo Salina (Aumento 20X). Parênquima pulmonar com estruturas preservadas; B. Grupo Sílica (Aumento 20X). Formação de granuloma após trinta dias de instalação de sílica; C. Grupo Sílica (Aumento 100X). Partículas de sílica em meio aos granulomas (setas pretas); e D. Grupo Sílica (Aumento 100X). Macrófagos ativados após a terem fagocitado partículas de sílica (setas brancas).

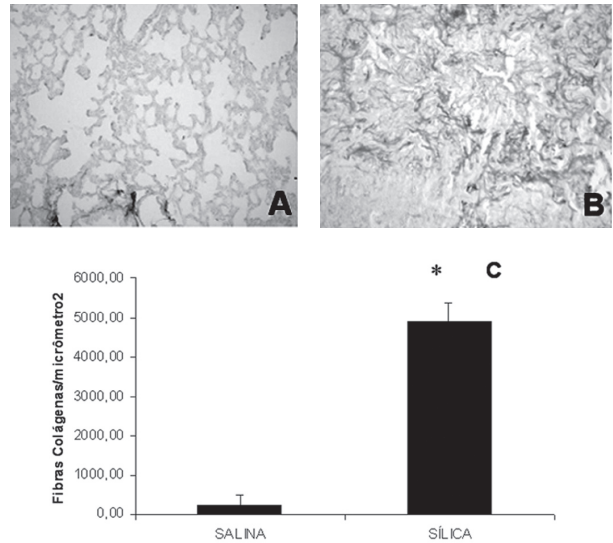


Figura 2. Fotomicrografias de lâminas histológicas de pulmões de camundongos silicóticos com Picro-sírius modificado. A. Grupo Salina (Aumento 20X). ; B. Grupo Sílica (Aumento 20X). Fibras colágenas. C. Na quantificação das fibras colágenas observamos um aumento significativo (*) no grupo sílica em relação aos animais salina (p < 0,05).

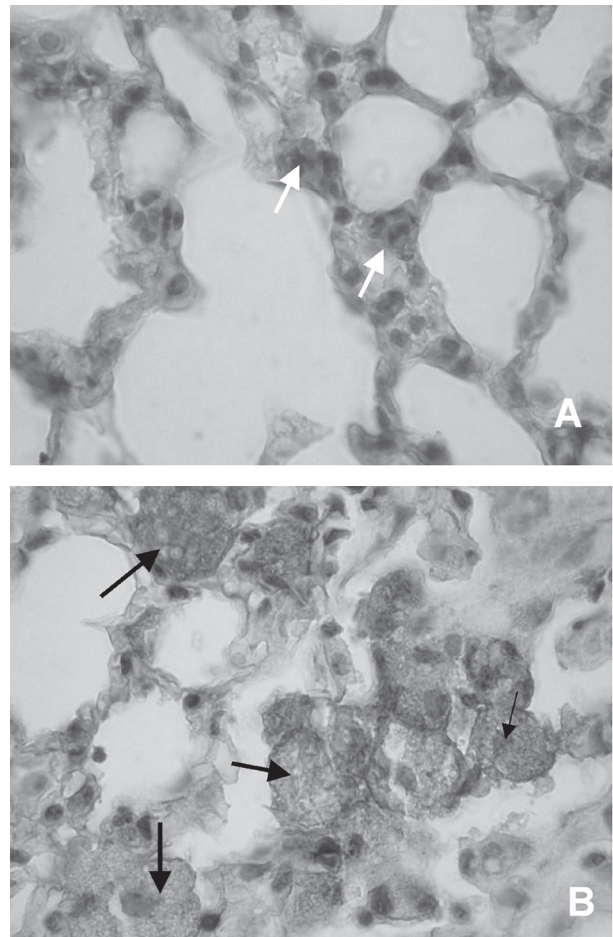


Figura 3 - Fotomicrografias de lâminas histológicas de pulmões de camundongos silicóticos marcadas pela Lectina BSL 1. A. Grupo Salina (Aumento 100X). Macrófagos intersticiais apresentando fraca marcação para Lectina (setas brancas); e B. Grupo Sílica (Aumento 100X). Macrófagos ativados e fortemente marcados para BSL 1 (setas pretas).

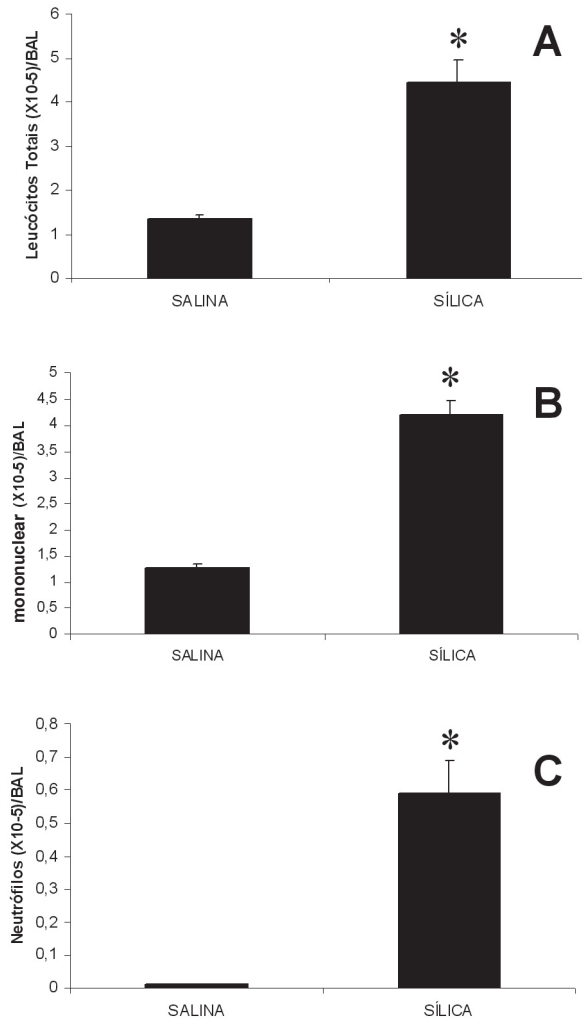


Figura 4. Contagem total e diferencial do BAL. Observamos um aumento significativo (*) no grupo sílica em relação aos animais salina ($p < 0,05$), no leucócito total, mononuclear e neutrófilos.

DISCUSSÃO

A silicose é causada pela inalação de poeira contendo sílica cristalina, cuja forma mais comum é o quartzo. O desenvolvimento e a gravidade da silicose dependem da quantidade inalada, da intensidade da inalação e da duração da exposição à sílica.⁵ Em humanos, a silicose pulmonar é caracterizada por nódulos fibróticos, causados por uma inflamação persistente, que leva a proliferação de fibroblastos e acúmulo de colágeno², localizada principalmente no ápice do pulmão.⁶

Observações em humanos demonstraram haver, para uma exposição comparável, diferenças interindividuais, com respeito ao desenvolvimento das lesões silicóticas.^{7,8}

Os modelos animais de silicose reproduzem a seqüência de eventos da silicose humana^{9,18} e têm sido explorados para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na doença. Basicamente, existem duas formas de se induzir silicose em animais: por meio de inalação das partículas em aerosol ou de instilação intra-

traqueal da sílica. Nosso modelo experimental de silicose utiliza a instilação intratraqueal de 20mg de dióxido de silício, dose utilizada por outros laboratórios.¹⁸⁻¹⁹

A instilação de sílica, em dose única foi capaz de produzir uma inflamação crônica importante nos pulmões dos camundongos selvagens, semelhante àquela vista, com a mesma via, em ratos e em camundongos C57 BL/6J e com doses um pouco menores em ratos e equivalentes em camundongos.^{12,20} O uso da dose de 20mg de sílica mostrou-se eficaz em produzir uma lesão extensa, com comprometimento de cerca de 50% da área parenquimatoza. Em trabalhos realizados em nossos laboratórios, observamos que não existe diferença na resposta inflamatória, em diferentes cepas de camundongos (dados ainda não publicados).

Com a inalação da sílica, a produção de NO e expressão da enzima óxido nítrico sintase também aumentam em macrófagos alveolares e neutrófilos, levando à formação de espécies altamente reativas. Existem evidências, *in vitro*, de que o TNF- α estimula a liberação de ROI em várias linhagens celulares.²¹⁻²³ Em contrapartida, a exposição de macrófagos alveolares a radicais livres leva à secreção de TNF- α .²⁴ Além do TNF- α , outras citocinas também parecem regular a produção de ROI lesivos aos tecidos.¹¹

A cronicidade da lesão induzida pela sílica depende do mecanismo de morte do macrófago, se por necrose e/ou apoptose, que leva ao recrutamento de polimorfonucleares e de novos macrófagos, além de induzir a fibrose local. Nestes últimos anos, diversos relatos descrevem o mecanismo de morte por apoptose dos macrófagos, na lesão induzida pela sílica. O envolvimento da via de Fas-Fas ligante foi demonstrado, em modelo de silicose, utilizando animais fas-ligante deficientes.¹⁸ Além disso, demonstrou-se que, em linhagens de macrófagos pulmonares de murinos, a interação da partícula de sílica com o seu receptor (receptor *scavenger*) promove apoptose nestas células, através do aumento de caspase-3.²⁵ Por outro lado, foi verificado que os ROI também podem mediar a apoptose de macrófagos alveolares, iniciando a ativação de caspase.²⁷ Estes autores demonstraram que antioxidantes e ROI *scavengers*, ao inibirem a produção das substâncias reativas, levam à inibição da ativação da caspase.

Em pulmões normais, os macrófagos alveolares são distribuídos aleatoriamente nos alvéolos. Porém, após a inalação de sílica, eles se concentram justamente na bifurcação dos ductos alveolares, onde as partículas de sílica são encontradas.²⁷ O macrófago alveolar é a principal célula responsável pelo *clearance* das partículas de sílica depositadas no pulmão. Seis a 12 meses após a inalação de sílica, 20% das partículas permanecem no interstício pul-

monar.⁴ Porém, ainda há controvérsias acerca da via do *clearance* de partículas inaladas.

Várias teorias foram levantadas sobre o destino das partículas de sílica, tais como: o sistema mucociliar das vias aéreas seria a maior via do *clearance*, permitindo que somente uma pequena fração chegasse aos linfonodos traqueobrônquicos, através dos linfáticos;²⁸ o transporte do alvéolo para os linfonodos de partículas inaladas, mediado pela fagocitose de partículas de sílica por macrófagos alveolares, com sua subsequente translocação para o interstício, de onde eles atingem os linfáticos e os linfonodos;^{29,30} as partículas livres passariam através dos pneumócitos do tipo I migrando para o interstício pulmonar, onde seriam fagocitadas por macrófagos intersticiais, dirigindo-se então para os linfáticos, sendo drenadas para os linfonodos.^{31,32}

REFERÊNCIAS

1. Beckett W, Abraham J, Becklake M, Christiani RD, Cowie GR, Davis G, Jones R, Kreiss K, Parker J, Wagner G. Adverse effects of crystalline silica exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:761-5.
2. Hunninghake GW, Garret KC, Richerson HB, Fantone JC, Ward PA, Rennard SJ, Bitterman PB, Crystal RG. Pathogenesis of the granulomatous lung diseases. *Am Rev Respir Dis* 1984;130:476-96.
3. Lima JGM, Reis LFF, Martins MA, Silva PMR. Aspectos celulares da silicose pulmonar. *Pulmão RJ* 2005;14(3):242-5.
4. Davis GS. Pathogenesis of silicosis: Current concepts and hypotheses. *Lung* 1986;64:139-54.
5. Weil LL, Jones RN, Parkes WR. Silicosis and related disease. In Parkes WR, ed. *Occupational Lung Disorders*. 3rd edition. London. 1994:285-339.
6. Fujimura N. Pathology and pathophysiology of pneumoconiosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2000;6:140-4.
7. Katsnelson BA, Polzik EV, Privalova LI. Some aspects of the problem of individual predisposition to silicosis. *Environ Health Persp* 1986;68:175-85.
8. Honda K, Kimura A, Dong RP, Tamai H, Nagato H, Nishimura Y, Sasazuki T. Immunogenetic analysis of silicosis in Japan. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:106-11.
9. Reiser KM, Hesterberg TW, Haschek WM, Last JA. Experimental silicosis. I. Acute effects of intratracheally instilled quartz on collagen metabolism and morphologic characteristics of rat lungs. *Am J Pathol* 1982;107:175-85.
10. Kumar RK. Quantitative immunohistologic assessment of lymphocyte populations in the pulmonary inflammatory response to intratracheal silica. *Am J Pathol* 1989;135:605-14.
11. Gossart S, Cambon C, Orfilla C, Lepert JC, Rami J, Carré P, Pipy B. Reactive oxygen intermediates as regulator of TNF- α production in rat lung inflammation induced by silica. *J Immunol* 1996;156:1540-8.
12. Mariani TJ, Roby JD, Mecham RP, Parks WC, Crouch E, Pierce RA. Localization of type I procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor- β as a mediator of fibrosis. *Am J Pathol* 1996;148:151-64.
13. Weirich U, Friemann J, Rehn B, Henkelüdecke U, Lammers T, Sorg C, Bruch J, Gleichmann E. Silicotic lymph node reactions in mice: genetic differences, correlation with macrophage markers, and independence from T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1986;59:178-88.
14. Huaux F, Lardot C, Arras M, Delos M, Many MC, Coutelier JP, Buchet JP, Renaud JC, Lison D. Lung fibrosis induced by silica particles in NMRI mice is associated with an upregulation of the p40 subunit of interleukin-12 and Th2 manifestations. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1999;20:561-72.
15. Huaux F, Liu T, McGarry B, Ullenbruch M, Phan SH. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J Immunol* 2003;170:2083-92.
16. Davis GS, Pfeiffer LM, Hemenway DR. Expansion of interferon-gamma producing lung lymphocytes in mouse silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999 20:813-824.
17. Arras M, Huaux F, Vink A, Delos M, Coutelier JP, Many MC, Barbarin V, Renaud JC, Lison D. Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:368-75.
18. Borges VM, Falcão H, Leite-Junior JH, Alvim L, Teixeira GP, Russo M, Nobrega AF, Lopes MF, Rocco PM, Davidson WF, Linden R, Yagita H, Zin WA, DosReis GA. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *J Exp Med* 2001;194:155-64.
19. Faffe DS, Silva GH, Kurtz PM, Negri EM, Capelozzi VL, Rocco PR, Zin WA. Lung tissue mechanics and extracellular matrix composition in a murine model of silicosis. *J Appl Physiol* 2001;90:1400-6.
20. Ohtsuka Y, Munakata M, Ukita H, Takahashi T, Satoh A, Homma Y, Kawakami Y. Increased susceptibility to silicosis and TNF- α production in C57BL/6j mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2144-9.
21. Tanner WG, Welborn MB, Shepherd VL. Tumor necrosis factor alpha and interleukin- β synergistically enhance phorbol myristate acetate-induced superoxide production by rat bone marrow-derived macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1982;7:379-85.
22. Klockars M & Savolainen H. Tumor necrosis factor enhances the asbestos-induced production of reactive oxygen metabolites by human polymorphonuclear leukocytes (PMN). *Clin Exp Immunol* 1992;90:68-76.
23. Dapino P, Dallegri F, Ottonello L, Sacchetti C. Induction of neutrophil respiratory burst by tumor necrosis factor alpha: priming effect of solid phase fibronectin and intervention of CD11b-CD18 integrins. *Clin Exp Immunol* 1993;94:533-8.
24. Chaudri G & Clark IA. Reactive oxygen species facilitate the in vitro and in vivo lipopolysaccharide-induced release of tumor necrosis factor. *J Immunol* 1989;143:1290-301.
25. Chao SK, Hamilton RF, Pfau JC, Holian A. Cell surface regulation of silica-induced apoptosis by the SR-A scavenger receptor in a murine lung macrophage cell line (MH-S). *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;174:10-6.
26. Shen HM, Zhang Z, Zhang QF, Ong CN. Reactive oxygen species

Em estudo ultraestrutural, utilizando partículas de sílica amorfa, foi verificado que as partículas são fagocitadas pelos macrófagos alveolares e que estes migram para o interstício pulmonar, de onde se dirigem para os linfonodos, através dos linfáticos. Outra via existente é o movimento dos macrófagos alveolares para o tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), de onde partem para as vias aéreas, com subsequente *clearance* pelo sistema mucociliar ou para os linfáticos peribrônquicos.³³

Não podemos dizer que os eventos encontrados em nosso modelo são uma reprodução fiel dos achados na silicose em humanos. Entretanto, nossos resultados mostram que o modelo de silicose pulmonar em camundongos pode ser utilizado para o melhor entendimento dessa doença e em futuros estudos de tratamentos farmacológicos.

- and caspase activation mediate silica-induced apoptosis in alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 290:L10-7.
27. Brody AR, Roe MW, Evans JN, Davis GS. Deposition and translocation of inhaled silica in rats. Quantification of particle distribution, macrophage participation, and function. *Lab Invest* 1982;47:533-42.
 28. Lee KP. Lung response to particulates with emphasis on asbestos and other fibrous dusts. *CRC Crit Rev* 1985;1:33-41.
 29. Lee KP, Barras CE, Griffith FD, Waritz RS. Pulmonary response and transmigration of inorganic fibers by inhalation exposure. *Am J Pathol* 1981;102:814-22.
 30. Harmsen AG, Muggenburg BA, Snipes MB, Bice DE. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science* 1985;230:1277-80.
 31. Bowden DH & Adamson IY. The role of cell injury and the continuing inflammatory response in the generation of silicotic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 1984;144:149-61.
 32. Adamson IY. Cellular response and translocation of particles following deposition in the lung. *J Aerosol Med* 1990;3:31-9.
 33. Lee KP & Kelly DP. Translocation of particle-laden alveolar macrophages and intra-alveolar granuloma formation in rats exposed to Ludox colloidal amorphous silica by inhalation. *Toxicology* 1993;77:205-32.