



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: NEUROCIENCIAS

**TÍTULO: Marcadores de enfermedad pulmonar
en trabajadores expuestos a sílice**

Francisco Julián López González



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: NEUROCIENCIAS

**TÍTULO: Marcadores de enfermedad pulmonar
en trabajadores expuestos a sílice**

Francisco Julián López González

MARCADORES DE ENFERMEDAD PULMONAR EN TRABAJADORES EXPUESTOS A SÍLICE



AUTOR: FRANCISCO JULIÁN LÓPEZ GONZÁLEZ

AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas me gustaría agradecer el apoyo y el trabajo de todos aquellos que de una manera directa ó indirecta, bien desde el punto de vista personal o profesional, me han ayudado para que esta tesis doctoral haya llegado a ser escrita.

A Cristina Martínez y Aida Quero. Por confiar en mi para iniciar en Extremadura el primer trabajo de campo para el reconocimiento de trabajadores de canteras de granito. Ello sembró el germen para la posterior realización de la presente tesis.

A todos los ingenieros del Departamento Técnico de Silicosis, por poner en marcha un estudio tecnificado y complejo que dio lugar a la medición precisa y exhaustiva de la exposición a sílice en cada categoría laboral.

A Ana Fernández Tena y a Ana Isabel Enríquez. Por su ánimo, su ayuda y sus consejos.

A mis compañeros en la planta de hospitalización, en especial a Celso Álvarez, Teresa González Budiño, Marta García Clemente, Pedro Bedate Díaz y Miguel Árias Guillén. Por haber estado siempre dispuestos a ayudarme si lo necesitaba.

A mis antiguos maestros. En especial a los doctores Luis Molinos Martín y Carlos Escudero Bueno. Porque muy por encima de sus enseñanzas profesionales, me hicieron apreciar el valor del compañerismo y del trabajo en equipo.

A la secretaría del Departamento de medicina: Teresa, por su impagable paciencia y toda su ayuda.

A mis padres: Paco y Pili. Por convertirse en un modelo a seguir y por su aliento constante.

A mis hermanos: Piluca, Rubén, Roberto y Ana Belén. Por haber estado siempre dispuestos a escucharme.

A mi esposa. Vicky y a mi chiquitín. Fran. Ojalá puedan perdonarme todo el tiempo que les he robado.

MUCHAS GRACIAS A TODOS VOSOTROS

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	7
TABLA DE CONTENIDO.....	9
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	15
RESUMEN.....	21
1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 SÍLICE	29
1.2. SILICOSIS.....	31
1.2.2. ETIOLOGÍA.....	33
1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA.....	34
1.2.3 FACTORES DE RIESGO.....	37
1.2.4 FACTORES INDIVIDUALES.....	42

1.2.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	43
1.2.5.1 SILICOSIS CRÓNICA	43
1.2.5.2 SILICOSIS ACELERADA	45
1.2.5.3 SILICOSIS AGUDA Ó SILICOPROTEINOSIS	46
1.2.6 ENFERMEDADES ASOCIADAS	47
1.2.6.1 TUBERCULOSIS.....	47
1.2.6.2 EPOC	48
1.2.6.3 CÁNCER DE PULMÓN.....	49
1.3. DIAGNÓSTICO	51
1.3.1 HISTORIA LABORAL.....	51
1.3.2 ESTUDIOS RADIOLÓGICOS	52
1.3.2.1 RADIOGRAFÍA SIMPLE DE TÓRAX	52
1.3.2.2 TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	55

1.3.3 PRUEBAS DE FUNCIÓN PULMONAR	58
1.4 FISIOPATOLOGÍA	61
1.4.1 EL INFLAMASOMA.....	67
1.4.1.2 IMPORTANCIA DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.....	79
1.4.2 RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (ROS)	85
1.5. IMPORTANCIA DEL PROBLEMA.....	91
1.6 BIOMARCADORES.....	95
1.6.1 MARCADORES DE EXPOSICIÓN	96
1.6.2 BIOMARCADORES DE EFECTO.....	98
1.6.2.1 MARCADORES DE EFECTO DE RESPUESTA INICIAL.....	99
1.6.2.2 MARCADORES DE EFECTO DE RESPUESTA TARDÍA	111
1.6.2.3 BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD	150

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	163
2.1 OBJETIVOS	165
2.2 HIPÓTESIS	167
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	169
3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES.....	171
3.2 DISEÑO.....	173
3.3 METODOLOGÍA.....	177
3.3.1 MEDICIÓN DEL AMBIENTE PULVÍGENO	178
3.3.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO	180
3.3.2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	180
3.3.3 ESTUDIO MÉDICO.....	182
3.3.3.1 HISTORIA LABORAL.....	184
3.3.3.2 HISTORIA CLÍNICA	185

3.3.3.3 EXPLORACIÓN CARDIOPULMONAR	186
3.3.3.4 ESPIROMETRÍA	187
3.3.3.5 ELECTROCARDIOGRAMA	187
3.3.3.6 RX DE TÓRAX EN PROYECCIONES POSTEROANTERIOR Y LATERAL	187
3.3.3.7 DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	189
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	193
4. RESULTADOS	195
Niveles medios de marcadores inmunológicos en sanos y enfermos.....	202
Niveles de marcadores de estrés oxidativo y antioxidantes en sanos y enfermos.....	208
Efecto del tabaquismo sobre los marcadores medidos.....	210
Relación entre lesiones radiológicas y niveles de proteasas y marcadores de estrés.	212

Relación entre las alteraciones espirométricas y niveles de proteasas y marcadores de estrés oxidativo.....	214
Estudio multivariante para discriminar la presencia de silicosis.	215
5. DISCUSIÓN.....	216
6. CONCLUSIONES.....	216
7. BIBLIOGRAFÍA.....	216

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A1AT	Alfa 1 antitripsina
AMDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Macrófagos Alveolares
ATP	Adenosín Tri Fosfato
BAL	Lavado Bronquio Alveolar
BCR	Community Bureau of Reference
bFGF	Factor básico de crecimiento fibroblástico
CA 19-9	Antígeno Carbohidrato 19-9
Caspasas	Cysteine-ASPartic proteASES
CAT	Catalasa
CC16	Proteína 16 de las Células de Clara
CINCA	Chronic Infantile Neurological Cutaneous Articular Syndrome
CINCs	Factores quimiotácticos inducidos por citoquinas de neutrófilos
CLEC7A	C-type Lectin domain family member A

CLECF4N	C-type Lectin domain family member N
CSx	Combinación de sistemas
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns (Receptores de reconocimiento de daño)
DNA	Ácido DexosirriboNucleico
DPI	Difenileneiodonium
DX	Disbalance proinflamatorio/inhibidor
E	Especificidad
ECA	Enzima Convertidora de la Angiotensina
EDA	Espectroscopia de Dispersión de Energía
EDXA	Microanálisis de Dispersión de Energía de Rayos X
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FasL	Ligando de proteína Fas
FGF-2	Factor de Crecimiento Fibroblástico 2
FMP	Fibrosis Masiva Progresiva
FPI	Fibrosis Pulmonar Idiopática
FVC	Capacidad vital forzada

GPX	Glutation PeroXidasa
HLE	Elastasa Leucocítica
HO-1	HemoOxigenasa 1
Hp	Haptoglobina
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ICAM	Moléculas de Adhesión Intercelulares
IFN	Interferón
IGF-I	Factor tipo de crecimiento insulin-like I
IL	InterLeuquina
IL-1	Interleuquina 1
IL-18	Interleuquina 18
ILD	Interstitial Lung Diseases
ILO	International Labour Office
IR	Infrarrojo
LDH	Láctico DesHidrogenasa
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Leucotrieno
LTa	LinfoToxina alfa
MA	Macrófagos Alveolares

MAP-kinasas	Proteín-Quinasas Mitogen-Activadas
MIPs	Proteínas inflamatorias de macrófago
CINCs	Factores quimiotácticos inducidos por citoquinas de neutrófilos
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz 9
NACH	Dominio central de Enlazamiento de Nucleótidos que media la Oligomerización
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
NLRC4	Caspase activation and recruitment domain-containing 4
NLRP1b:	NLR, pyrin domain-containing 1b.
NLRP3	Nacht Domain –Leucine-Rich Repeat and PYD containing Protein 3
NMEP	Elastasa Neutrófila Metalloendopeptidasa
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
OVA	Ovoalbúmina

PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns (Receptores de reconocimiento de patógenos)
PCR	Proteína C Reactiva
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PG	Prostaglandina
PIIIP	Péptido N-terminal procolágeno tipo III
PMN	Células PoliMorfoNucleares
PRRs	Pattern Recognition Receptors (Receptores de reconocimiento de patrones)
RNA	Ácido RiboNucleico
ROS	Radicales Libres de Oxígeno
RS	Receptores Scavenger ó “escoba”
S	Sensibilidad
Se	Selenio
SE	Desviación estándar
SEM	Microscopía de escaneado Electrónico
SeP	Selenoproteína
SICAM	Producto de liberación soluble de las Moléculas de Adhesión Intercelulares
SiO2	Dióxido de sílice cristalina

SOD	SuperÓxido Dismutasa
TC	Tomografía computerizada
TCAR	Tomografía Axial Computerizada de Alta Resolución
TEM	Microscopía de Emisión de Electrones
TGF	Factor Transformador de Crecimiento
TGF-b	Factor de Crecimiento Fibroblástico Beta.
TIMP	Tejido Inhibidor de Metaloproteasas
TIMP-1	Inhibidor tisular de la metaloproteasa 1
uPAs	Activadores del Plasminógeno tipo Uroquinasas
USA	Estados Unidos
VEMS	Volumen Espiratorio Máximo en un Segundo
VRS	Virus Respiratorio Sincitial
XRD	Microscopía de Difracción de Rayos X

RESUMEN

Relationship of plasma levels of proteinases, proteinase inhibitors and oxidative stress with the presence of silicosis in granite quarry workers.

Resumen.

En la aparición de neumoconiosis por sílice parecen jugar un papel importante tanto la susceptibilidad individual como la magnitud de la exposición. Identificar a los pacientes susceptibles de padecer la enfermedad entre los expuestos sería importante porque podríamos modificar la historia de la enfermedad.

Objetivo: comparar los niveles plasmáticos de varios mediadores de la inflamación relacionados con la iniciación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria pulmonar y del estrés oxidativo entre individuos con silicosis y trabajadores expuestos



pero libres de la enfermedad, para identificar posibles factores de susceptibilidad.

Methodology: estudio transversal entre trabajadores expuestos a la sílice inhalada en canteras de extracción de granitos. Los pacientes se clasificaron en dos grupos según la presencia o no de silicosis: 77 expuestos sanos y 59 con silicosis, pareados por su exposición acumulada y el hábito tabáquico. Los mediadores de la inflamación medidos por enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) en el suero incluyeron metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) y inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP-1) y alfa-1-antitripsina. Los marcadores de oxidación (PgE2 y F2 isoprostanos) y los antioxidantes glutathion peroxidasa y superoxido dismutasa fueron determinados por técnicas específicas previamente descritas.

Resultados: Comparados con los expuestos sanos, los enfermos con niveles más bajos de alfa 1-antitripsina, superoxido dismutasa y glutathion peroxidasa y presentaron mayor riesgo de silicosis en el análisis multivariante (regresión logística para la aparición de silicosis).



Conclusiones: los datos sugieren que aquellos sujetos con niveles más bajos de inhibidores de las proteasas y antioxidantes serían los que tendrían el fenotipo más susceptible de desarrollar la enfermedad.



Abstract.

Unidentified factors of individual susceptibility, together with the magnitude of exposure to silica, play a part in the appearance of silicosis in exposed workers. Identification of susceptible individuals may modify the history of the disease.

Aim: to compare the levels in plasma of various parameters involved in the initiation and control of protease/antiprotease lung homeostasis and oxidative stress among individuals with silicosis and healthy exposed workers, in order to identify possible factors of susceptibility to the disease.

Methodology: transversal study of workers exposed to silica inhalation. Two groups were obtained: in 77 healthy individuals and 59 with silicosis, paired for cumulative exposure to silica and the tobacco habit, comparison was made between the groups of the levels obtained for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of metalloproteinase 9 matrix (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) and alpha1-antitrypsin. Oxidative stress markers (prostaglandin E2 synthase (PGE2) and F2-isoprostanes) and antioxidants glutathione peroxidase and



superoxide dismutase were determined by previously described methods.

Results: Compared to the healthy exposed individuals, those with silicosis showed significantly lower levels of alpha 1-antitrypsin, superoxide dismutase and glutathione peroxidase and higher risk of silicosis in the multivariate analysis (logistical regression).

Conclusions: these findings support the hypothesis of a phenotype more likely to develop the disease, determined by a lower response to inhibitors of proteases and antioxidants.





1. INTRODUCCIÓN





1.1 SÍLICE



Fig 1.1: Cuarzo



Fig: 1.2: Cristobalita



Fig 1.3: Trimidita



Fig: 1.4: Trípoli

Fig 1: *Diversas variedades de sílice cristalina*

Sílice es el nombre dado a un grupo de minerales compuesto por silicio y oxígeno (SiO_2). Los dos elementos más frecuentes de la corteza terrestre, de modo que el 12% de la corteza terrestre está compuesta por cuarzo, la forma más frecuente de sílice cristalina. Las concentraciones en la naturaleza varían de forma significativa



desde el 67% de sílice que encontramos en la piedra arenisca hasta el 25-40% en el granito.

La sílice se encuentra en forma cristalina y amorfa. Las formas de sílice cristalina más comúnmente encontradas son el cuarzo, cristobalita y tridimita, siendo la primera la más frecuente. La tridimita y la cristobalita pueden encontrarse de forma natural en la lava volcánica y se forman cuando el cuarzo o la sílice amorfa se someten a temperaturas muy elevadas. De forma artificial, pueden encontrarse en la elaboración de ladrillos de sílice.

Entre las formas de sílice amorfa, encontramos el ópalo, fibra de vidrio tierra de diatomeas ó diatomita, lana mineral, tripolita, sílice vítrea....



Posteriormente el alemán Georgius Agricola en su obra “De re metallica”, tratado de 12 libros y más de 270 grabados sobre metalurgia, medicina, química y mineralogía publicada en 1556, describe una enfermedad pulmonar que aqueja a canteros y mineros.

Luego, en 1705, el doctor italiano Bernardino Ramazzini, describió síntomas asmáticos y sustancias como la arena en los pulmones de los canteros. Este especialista fue uno de los primeros en establecer un vínculo entre la ocupación del trabajador y su salud, lo cual quedó documentado en su libro “*De Morbis Artificum Diatriba*”, un estudio de las enfermedades relacionadas con los distintos oficios.

El nombre de silicosis fue utilizado originalmente en 1870 por Achille Visconti, prosector en el Ospedale Maggiore de Milán.

Con la industrialización, a diferencia de las herramientas de mano, vino aumento de la producción de polvo. Así, el taladro de martillo neumático se introdujo en 1897 y la abrasión por “chorro de arena” se introdujo en aproximadamente 1.904, ambos



contribuyendo significativamente al aumento de la prevalencia de silicosis.

Años más tarde, en 1936, ocurre el desastre de Gauley Bridge, una de las peores tragedias de salud ocupacional en la historia de los Estados Unidos. Tras la construcción del túnel Hawks Nest, una epidemia de silicosis afectó a más de 400 hombres que habían trabajado en el lugar.

En consecuencia, en 1937, el Departamento de Trabajo de los Estados Unidos, a través de su iniciativa de acoger la Conferencia Nacional de Silicosis, busca identificar el número de trabajadores expuestos a este peligro. Además, coinciden en que la enfermedad se puede prevenir con el uso de respiradores.

1.2.2. ETIOLOGÍA

La silicosis está causada por la inhalación de dióxido de sílice cristalina (SiO_2) y es una de las enfermedades ocupacionales más prevalentes en el mundo (Greenberger MI et al et al., 2007; WHO. The Global Occupational Health Network newsletter: elimination of silicosis., 2007). La exposición a sílice respirable (partículas con



diámetro menor de 10 micrómetros) es frecuente en numerosas industrias en las que se realiza la manipulación de sílice, especialmente aquellas en que la sílice es pulverizada hasta formar polvo. Los estudios realizados hasta ahora, sugieren que la sílice cristalina tiene más potencial fibrogénico que la sílice amorfa, especialmente la tridimita seguida de la cristobalita y del cuarzo. Al parecer el potencial fibrogénico guarda relación con la superficie cristalina (Wiesner JH et al., 1988).

1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima en 2,5 millones los casos anuales de enfermedades respiratorias debidas a la exposición de agentes patógenos en el trabajo (datos de 2003). La Unión Europea al definir las actuaciones preventivas prioritarias, sitúa como factor de máxima importancia el riesgo químico, de modo que algunas estimaciones cifran en un 40% el porcentaje de enfermedades del sistema respiratorio ligadas a la exposición laboral.



Ante la ausencia de registros fiables, no sabemos con exactitud la prevalencia de la enfermedad. Globalmente, el número de casos parece disminuir con el desarrollo económico de un país. China es el país con mayor número de casos, con un registro de más de 500.000 casos entre 1991 y 1995 y con más de 6.000 casos y 24.000 fallecimientos notificados anualmente. En nuestro entorno, La base de datos CAREX, en el año 2000 cifraba en 3,2 millones de personas expuestas a sílice en la Unión Europea, y en España en 2004 había 1,2 millones de trabajadores expuestos, especialmente en el sector de la construcción (Kogevinas, 2006).

En nuestro país se han desarrollado estudios transversales en industrias con riesgo de inhalación de sílice, obteniéndose prevalencias variables: 47,5% en canteras de granito de El Escorial (1990) (Úbeda Martínez E et al., 1990), 6% en minería subterránea de espato-flúor de Asturias (1993) (Quero A et al., 1994), 6% en la industria de la pizarra en Galicia (1994) (Martínez C et al., 1993) y en explotaciones de granito en Extremadura (Mateos L et al., 2005).

Se ha observado también que a partir de 2008 hay un aumento de nuevos diagnósticos procedentes de industrias distintas a la minería del carbón (granito, pizarras, conglomerados artificiales de

sílice). Este fenómeno puede reflejar modificaciones reales de la incidencia de la enfermedad o factores derivados de circunstancias socioeconómicas.

En la figura 3 se pueden observar los nuevos diagnósticos de silicosis durante el año 2012 (modificado de Fernández R et al., 2015)



Fig : 3: Provincias en las que se han diagnosticado nuevos casos de silicosis (año 2012).



Tabla 1: nuevos diagnósticos de silicosis

Año	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
N	375	264	224	151	11	134	165	220	256	166

1.2.3 FACTORES DE RIESGO

Aunque de forma excepcional se ha descrito silicosis en el medio ambiente (p. ej en niños tibetanos expuestos a tormentas frecuentes de arena (Norbo T et al., 1991), la enfermedad se produce casi exclusivamente por la inhalación de sílice en el entorno laboral, aunque en viviendas cercanas a fuentes industriales como canteras y areneras, se han descrito ocasionalmente casos de silicosis (Brigde et al., 2009).

En general, los polvos inorgánicos que no están contaminados de sílice cristalina no son perjudiciales para la salud, a excepción de la fibra de vidrio (Moosman BT et al., 1998; Morgat R et al., 2002). Sin embargo, aquellos que contienen sílice en cualquiera de sus formas, amorfa o cristalina, son fibrogénicos. Los resultados



experimentales realizados en modelos animales sugieren que la tridimita es la forma de sílice con mayor capacidad fibrogénica seguido de la cristobalita y del cuarzo.

Además. La exposición a sílice se ha asociado con diversas enfermedades (tabla 4), siendo además un carcinógeno (Kurihara N et al., 2004) reconocido en el año 1997 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) así como por el Instituto Nacional de Estados Unidos para la Seguridad Ocupacional y de la salud y el Programa Toxicológico Nacional.

La exposición ocupacional a sílice cristalina respirable (tabla 2), es frecuente en múltiples actividades industriales. El factor de riesgo más importante para el desarrollo de silicosis es la **dosis acumulada de sílice** (*fracción de polvo respirable x porcentaje de sílice libre en mg/m^3 x número de años de exposición*).

- *Fracción de polvo respirable*: polvo que por el tamaño de sus partículas es capaz de alcanzar las unidades alveolares (30% de las partículas de 5 micras y el 100% de las de 1 micra). Las partículas mayores de 10 micras quedan depositadas en las vías aéreas superiores por impactación.



- *Valor límite ambiental (VLA)*: son valores de referencia considerados seguros. Si estos valores no fuesen superados, una gran mayoría de trabajadores expuestos durante toda su vida laboral no sufrirían efectos adversos para su salud. La legislación sobre los límites de polvo respirable varía de unos países a otros, y en España están regulados por la orden ITC/2585/2007 del 30 de agosto de 2007, por la que se aprueba la instrucción técnica complementaria 2.0.02 sobre “Protección de los trabajadores contra el polvo, en relación con la silicosis en las industrias extractivas”:
 - a. La concentración de sílice libre contenida en la fracción respirable de polvo no será superior a 0,1 mg/m³ (si se tratase de cristobalita o tridimita este valor se reducirá a 0,05 mg/m³).
 - b. La concentración de la fracción de polvo respirable no sobrepasará el valor de 3 mg/m³.

Sin embargo, distintos estudios han detectado que el umbral de 0,05 mg/m³ no protege suficientemente del riesgo de contraer



silicosis (Greaves et al., 2011), y tampoco hay un umbral que podamos considerar seguro y sin riesgo. Por ello, toda reducción en la exposición reducirá el riesgo de enfermedad.

Tabla 2: Ocupaciones con exposición a sílice cristalina

Excavaciones en minas, túneles, canteras, galerías
Tallado y pulido de rocas silíceas, canteras
Trabajos en seco, de trituración, tamizado y manipulación de minerales y rocas
Fabricación de carborundo, vidrio, porcelana, loza y otros productos
cerámicos, fabricación y manutención de abrasivos y de polvos detergentes
Trabajos de desmolde, desbardado y desarenado en las fundiciones
Trabajos con muelas (pulido, afinado) que contengan sílice libre
Trabajos en chorro de arena y esmeril
Industria cerámica
Manipulación de aglomerados de cuarzo y piedra ornamental
Protésicos dentales

Para un mismo peso de mineral, la patogenicidad parece estar condicionado por la proporción de superficie cristalina (de ahí la mayor toxicidad de la trimidita respecto a la cristobalita y de esta frente al cuarzo).



Además, las características propias del trabajo desempeñado influyen en la intensidad de la exposición (Chen W et al., 2005). Así, por ejemplo:

- El polvo con concentraciones elevadas de sílice seca y recién fracturada produce más cantidades de radicales libres de oxígeno es el más nocivo (Vallyathan V et al., 1988).

Tabla 3: porcentaje de sílice en diversos materiales

- **Granito:** 15-35%
- **Mármol:** 0-5%
- **Cuarcita:** Superior al 95%
- **Pizarra:** Hasta un 40%
- **Compactos de cuarzo:** 85-100%; con presencia de cristobalita en numerosos casos.
- **Techlam:** 10-15%

- La existencia de partículas minerales, parece, de alguna manera modular la toxicidad, de modo que por ejemplo en mineros de oro o de fundición expuestos a sílice casi pura, dosis



acumuladas de 1-3 gramos son suficientes para producir la enfermedad. Sin embargo, en mineros de carbón, la misma dosis provoca menos casos de enfermedad (Nagelschmidt G, 1960) y en minas de hierro, la existencia de este mineral parece atenuar el efecto de la inhalación de sílice.

1.2.4 FACTORES INDIVIDUALES

Al margen de la exposición y como veremos más adelante, existen unos factores de susceptibilidad individual que determinan la respuesta al stress ambiental y que determinan que la relación dosis-respuesta no sea homogénea en la población expuesta, dando lugar una heterogenidad en la manifestación de síntomas y de alteraciones radiológicas y funcionales en relación con la exposición en los diversos individuos (Katsnelson BA et al., 1986). La existencia de polimorfismos genéticos, de factores de riesgo asociados tales como el tabaquismo ó la eficacia de los mecanismos de defensa y aclaramiento, pueden ser algunos pueden estar detrás de la predisposición a padecer la enfermedad.



1.2.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Se pueden distinguir tres formas de la enfermedad

- a) Crónica.
- b) acelerada
- c) aguda

1.2.5.1 SILICOSIS CRÓNICA

Es la forma más frecuente de la enfermedad. Generalmente se desarrolla al cabo de años de exposición a dosis bajas de polvo de sílice (más de 10 años habitualmente aunque existe gran variabilidad) (Fraser et al., 1999). Muchos pacientes con formas leves de la enfermedad (silicosis simple) pueden encontrarse asintomáticos y se diagnostican de modo accidental tras un examen radiológico. La manifestación radiológica clásica es la presencia de un patrón micronodular difuso y bilateral, predominantemente en



lóbulos superiores y segmentos posteriores del pulmón, especialmente del derecho (Berjin CJ et al., 1986). Los nódulos suelen ser redondeados, bien definidos y ocasionalmente calcificados (10-20% de los casos). La silicosis suele clasificarse desde el punto de vista radiológico en silicosis simple cuando los nódulos tienen un diámetro menor de 10 mm y complicada cuando coalescen formando conglomerados mayores de 10 mm que se denominan masas de fibrosis masiva progresiva (FMP). Estas formaciones suelen situarse en la zona media y superior de ambos pulmonares aunque pueden encontrarse en cualquier localización. Tienen tendencia a emigrar hacia los hilios pulmonares dando lugar a áreas de enfisema periférico que se localizan entre las masas de FMP y la superficie pleural en las que existe una disminución del patrón micronodular. La evolución clínico-radiológica persiste con frecuencia incluso después de abandonar el entorno laboral (Kinsella N et al., 1990; Maclaren WM et al., 1985). Hasta en el 4,9% se asocian a adenopatías calcificadas con predominio periférico de las calcificaciones (adenopatías con calcificaciones en cáscara de huevo) que constituyen un marcador de exposición (Pendergrass et al., 1958). Es frecuente además la existencia de alteraciones pleurales en forma de engrosamientos pleurales, nodulaciones y



“pseudoplaclas” y ocasionalmente derrame pleural (más frecuente en el caso de silicosis complicada (Arawaka et al., 2005).

Desde el punto de vista funcional, en la neumoconiosis simple suelen presentarse pruebas funcionales normales. Con la evolución de la enfermedad, suele objetivarse tanto la existencia de patrón restrictivo como obstructivo. Se ha observado además, que las alteraciones funcionales se correlacionan de forma más significativa con la gravedad del enfisema que con la profusión de los nódulos pulmonares, existiendo una buena correlación entre los hallazgos de TC y la profusión de la Rx de tórax ($r=0,84$). Sin embargo, existe mala correlación entre la profusión en la TC y radiografía de tórax y el deterioro de la función respiratoria (Berjin CJ et al., 1986). No obstante, si existe una buena correlación entre el enfisema valorado por TC y los datos de función pulmonar, especialmente el FEV1 ($r=0,66$) y la capacidad de difusión ($r=0,71$).

1.2.5.2 SILICOSIS ACELERADA

La silicosis acelerada suele desarrollarse entre 5-10 años después de la exposición inicial (Health effects of occupational



exposure to respirable crystalline silica. Cincinnati, OH: Department of Health and Human Services, 2002). Suele compartir características clínicas y radiológicas comunes con la forma crónica de la enfermedad aun, pero tiende a progresar más rápidamente (Jalloul AS et al., 2007; Greenberg MI et al., 2007). Suele objetivarse en la radiografía de tórax la existencia de nodulación de mayor tamaño con evolución a FMP de forma más precoz. En nuestro medio la aparición de silicosis acelerada se observa con más frecuencia en trabajadores de minas de caolín.

1.2.5.3 SILICOSIS AGUDA Ó SILICOPROTEINOSIS

En ocasiones, la exposición a altas concentraciones de polvo en un periodo de sólo unas pocas semanas puede dar lugar a lo que denominamos silicosis aguda. Suele manifestarse con la existencia de consolidaciones alveolares bilaterales de predominio perihiliar que se asemejan a las de la proteinosis alveolar o al edema pulmonar. En el TCAR puede evidenciarse un patrón en “vidrio deslustrado” o alveolar sin patrón micronodular y ocasionalmente patrón “en empedrado” por ocupación del espacio aéreo y



engrosamiento de septos interlobulillares (Dee PM et al., 1978). Es más frecuente en operarios que trabajan con “chorros de arena” (Buechner HA et al., 1969). Clínicamente se caracteriza por disnea y tos seca, con progresión hacia la insuficiencia respiratoria (Burge P et al., 2002), aunque el síndrome constitucional con fiebre, astenia y pérdida de peso, puede también estar presente.

1.2.6 ENFERMEDADES ASOCIADAS

La exposición a sílice se ha asociado con diferentes enfermedades (tabla 4).

1.2.6.1 TUBERCULOSIS

El riesgo de tuberculosis se incrementa con la gravedad de la silicosis y en silicosis acelerada y aguda (Rees D et al., 2007; teWaternaude JM et al., 2006; Cowie RL, 1994)

La exposición a sílice incrementa el riesgo de tuberculosis incluso sin silicosis (teWaternaude JM., 2006; Cowie RL, 1994). En países en desarrollo la minería (sobre todo la minería de oro)



podría contribuir a que la incidencia de silicosis permanezca alto incluso tras el cese de la exposición. Es más. La existencia de tuberculosis activa predice la progresión radiológica de la silicosis (Park HH et al., 2009).

Los efectos de la silicosis e infección por HIV sobre la tuberculosis activa son multiplicativos (Corbett EL et al., 2000). El tabaquismo, constituye además otro factor agravante (Leung CC et al., 2007).

El resultado de la coexistencia de tabaquismo, silicosis, tuberculosis y HIV provoca un gran incremento de mortalidad y morbilidad en países en desarrollo (van Zyl Smit RN et al., 2010).

1.2.6.2 EPOC

La EPOC se ha asociado con la exposición a sílice de forma independiente al tabaquismo (van Zyl Smit RN et al., 2010; Leung CC et al., 2007; Mossman BT et al., 1998; Health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica. Cincinnati, OH: Department of Health and Human Services, 2002).

En mineros de oro de Sudáfrica, un incremento de 1 mg/año/m³ en la dosis acumulada de polvo respirable se asocia con una pérdida de 18,7 ml en capacidad vital forzada (FVC) y de 16,2 ml en volumen espiratorio máximo en un segundo (VEMS) (Ehrlich RI et al., 20011). Existen estudios longitudinales que sugieren que la



pérdida de función pulmonar ocurre con exposiciones a polvo de sílice a concentraciones de 0,1-0,2 mg/m³. Sin embargo una pérdida invalidante de la función pulmonar podría no ocurrir en ausencia de silicosis hasta incluso 30-40 años de la exposición (Rushton L, 2007). Se ha encontrado un patrón espirométrico obstructivo en 17,3% de pacientes con silicosis que nunca fumaron en un registro de silicosis en Estados Unidos (USA) (Roseman KD et al., 2010). La edad, el número de paquetes/año, la historia de tuberculosis, el tamaño de los nódulos pulmonares ó la existencia de FMP, son factores independientes de obstrucción al flujo en pacientes con silicosis en Hong Kong (Leung CC et al., 2005).

1.2.6.3 CÁNCER DE PULMÓN

En 1997, la Agencia internacional para la Investigación de Cáncer (IARC) clasificó la sílice cristalina inhalada en forma de cuarzo o cristobalita en el entorno laboral como un carcinógeno humano (Grupo 1). El instituto americano para la seguridad laboral y salud y el Programa Toxicológico Nacional clasificaron por tanto a la sílice cristalina como un carcinógeno humano (IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 68: silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1997).



Los diferentes meta-análisis generalmente muestran un riesgo de cáncer de pulmón significativamente aumentado en pacientes con silicosis. Sin embargo, el efecto de la exposición a sílice con el cáncer de pulmón es débil y variable en trabajadores sin silicosis. El bajo ratio de exposición-respuesta de la sílice comparado con otros carcinógenos conocidos, podría deberse en parte a la dificultad en la detección de su efecto carcinógeno en trabajadores sin afectación en estudios previos.

Tabla 4 : enfermedades que se han asociado con la exposición a sílice

Silicosis

- Silicosis crónica
- Silicosis acelerada
- Silicoproteinosis

Infecciones

- Tuberculosis (pulmonar y extrapulmonar)
- Otras infecciones pulmonares por micobacterias, hongos y bacterias (generalmente con silicosis)

Enfermedad de las vías aéreas

- Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Enfermedades malignas

- Cáncer de pulmón
- Posible asociación con cáncer gástrico, esofágico, etc...

Enfermedades autoinmunes

- Esclerodermia
- Artritis reumatoide

Enfermedades renales

- Enfermedad renal crónica

Fuente: Chiu L et al: Silicosis. Lancet 2012; 379;2008:2019



1.3. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de silicosis se basa en los siguientes criterios:

1. Historia laboral de exposición a sílice cristalina.
2. Estudios radiológicos con hallazgos característicos: radiografía de tórax simple con profusiones $\geq 1/1$ (ver clasificación ILO).
3. Exclusión de otras entidades posibles.

1.3.1 HISTORIA LABORAL

La historia laboral es imprescindible para estimar la exposición acumulada a polvo de sílice, y debe incluir la pertinente información (Burge P et al., 2002). Es importante incluir la información de toda la vida laboral. En una serie, la etiología ocupacional se perdió hasta en un 25% de los casos (Mannetje A et al., 2002). En ocasiones las rotaciones en los puestos de trabajo pueden dificultar la realización de una adecuada historia laboral, que debería incluir:

- Actividad laboral actual y previa, reflejando el tiempo de exposición a sílice cristalina.
- Descripción detallada del puesto de trabajo.



- Medidas de protección técnica (corte con agua, ventilación, aspiración de polvo) e individuales (máscaras).
- Medición del polvo respirable, con el fin de conocer el riesgo acumulado al que han estado expuestos (en las ocasiones que se encuentre disponible dicha información).

I.3.2 ESTUDIOS RADIOLÓGICOS

1.3.2.1 RADIOGRAFÍA SIMPLE DE TÓRAX

Es una exploración imprescindible para el diagnóstico de silicosis y para la valoración de su posible progresión. La Organización Internacional del Trabajo (*Internacional Labour Office* [ILO]) ha establecido una clasificación que codifica las alteraciones radiológicas de forma reproducible (Guidelines for the use of the ILO International Classification of Radiographs of Pneumoconioses. Occupational Safety and Health series No 22. Rev 2011. Geneva International Labour Office).

Lectura ILO (ver versión on line para descripción completa)

Se divide en 5 apartados:



1. Calidad técnica de la radiografía: 1: buena, 2: aceptable, 3: baja calidad y 4: inaceptable.
2. Alteraciones parenquimatosas: atendiendo a tamaño, profusión, forma y localización (Figura 4, Figura 5).
 - Pequeñas opacidades: se describen según su profusión, campos pulmonares afectados, forma y tamaño.
 - Grandes opacidades: se definen como opacidades con un diámetro mayor de 10 mm. Existen 3 categorías: A, B y C.
3. Alteraciones pleurales.
4. Símbolos: describen hallazgos adicionales codificados.

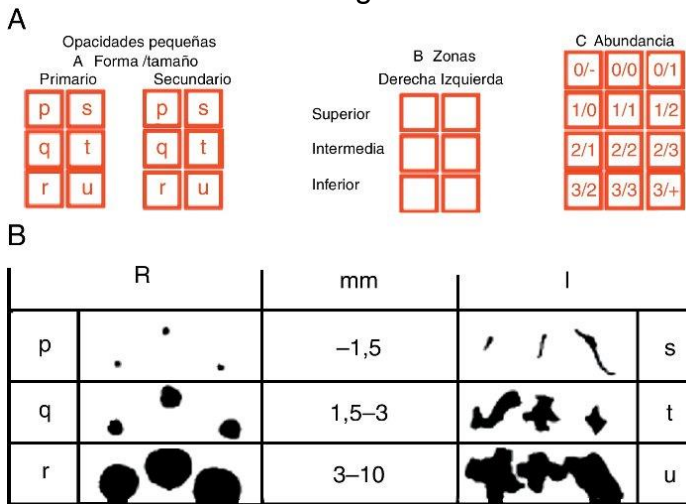


Fig 4: pequeñas opacidades en la lectura ILO

A) En la lectura ILO debe hacerse referencia a la forma y el tamaño de las lesiones expresado con 2 letras y a la profusión lesional expresada con 2 números. Así mismo hay que indicar en qué zona de cada pulmón asientan las lesiones. B) En la figura se identifican las pequeñas opacidades, tanto redondeadas (R) como irregulares (I), y su nomenclatura en función de su forma y tamaño.



5. Comentarios libres, no incluidos en la lectura anterior.

A

Categoría	0			1		2			3		
Subcategoría	0/-	0/0	0/1	1/0	1/1	1/2	2/1	2/2	2/3	3/2	3/3

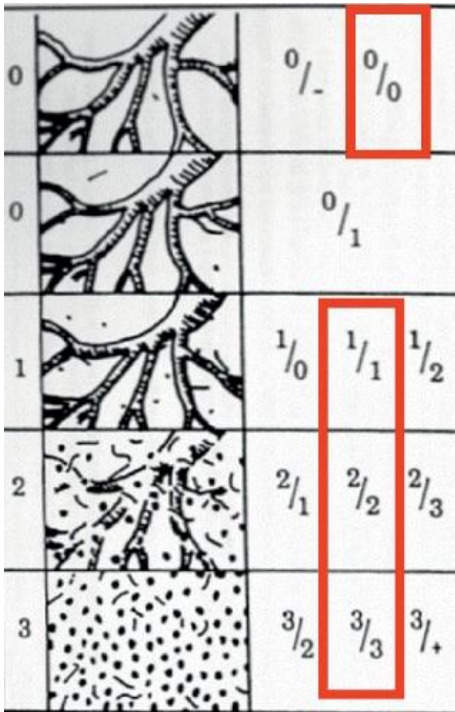


Figura 5: A) La profusión de lesiones en la lectura ILO se clasifica en 4 categorías principales y 12 subcategorías, de menor a mayor. B) En la práctica, cuanto mayor es la profusión de lesiones silicóticas, se produce un mayor borramiento de los vasos pulmonares en la radiografía de tórax.

Fig 5: Grandes opacidades en la lectura ILO (Fuente: Fernández R et al., 2015)



A partir de la última revisión de la ILO en el año 2011, se permite la utilización de imágenes digitales en la valoración de silicosis. Se proporcionan 22 imágenes estándar en formato digital y se especifican las características técnicas que deben cumplir los equipos radiológicos y los requerimientos para la lectura de las radiografías: las imágenes deben visualizarse en monitores de pantalla plana de grado médico diseñadas para radiología diagnóstica de por lo menos 21 pulgadas (54 cm) por imagen, con una razón de luminosidad máxima de por lo menos 250 candelas/m². El lanzamiento del píxel no debe ser mayor a 210 micras, y con una resolución de por lo menos 2,5 pares lineales por milímetro.

1.3.2.2 TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA DE ALTA RESOLUCIÓN

Existen diversos estudios que sugieren que la tomografía computarizada de alta resolución (TCAR) es más sensible que la radiografía convencional para la detección de características específicas tales como: nódulos de pequeño tamaño, fibrosis masiva progresiva, bullas, enfisema, así como cambios hiliares, pleurales y mediastínicos (Mosiewicz J et al., 2004; Sung J et al., 2008; Lopes AJ et al., 2008).que se pueden calcificar.

Aunque estudios comparativos entre TCAR y radiografía de tórax en el diagnóstico de silicosis han demostrado una mayor



sensibilidad de la TCAR, la falta de una estandarización clara de su lectura y la posibilidad de aumentar los falsos positivos en el proceso diagnóstico hacen que no sea una exploración recomendable para el cribado de silicosis (Ooi GC et al.2008, Hering KG et al., 2004, Aziz ZA et al., 2006), (*nivel de evidencia moderada, recomendación consistente*).

Respecto al papel del TCAR en el diagnóstico de silicosis, cabe añadir que, al igual que ocurre con el cribado de otras enfermedades, su utilización sistemática puede tener más inconvenientes que ventajas. Los criterios diagnósticos de silicosis están basados en una historia laboral y unos hallazgos radiológicos típicos, y los datos disponibles sobre ella proceden de estudios de cohortes en los que la herramienta utilizada es la radiografía de tórax. Generalizar el uso de la TCAR podría llevar a detectar nódulos de significado incierto que no permitirían establecer un diagnóstico de certeza y podrían añadir confusión. Además, desde el punto de vista laboral, y de acuerdo con la normativa actual, el trabajador podría no ser subsidiario de incapacidad y sin embargo la empresa podría declararle no apto para su trabajo. Teniendo en cuenta todos estos aspectos, y en función del conocimiento disponible, la indicación de la TCAR estaría limitada a los casos siguientes (Fernández R et al., 2015):

1. Radiografía de tórax con opacidades nodulares muy profundas y con tendencia a la coalescencia, ya que en esta situación se podrían detectar masas de fibrosis en fases iniciales.



2. Hallazgos radiológicos atípicos, para el diagnóstico diferencial con otras entidades.

Exclusión de otras patologías

En casos seleccionados para un adecuado diagnóstico diferencial será preciso ampliar estudios (Figura 6).

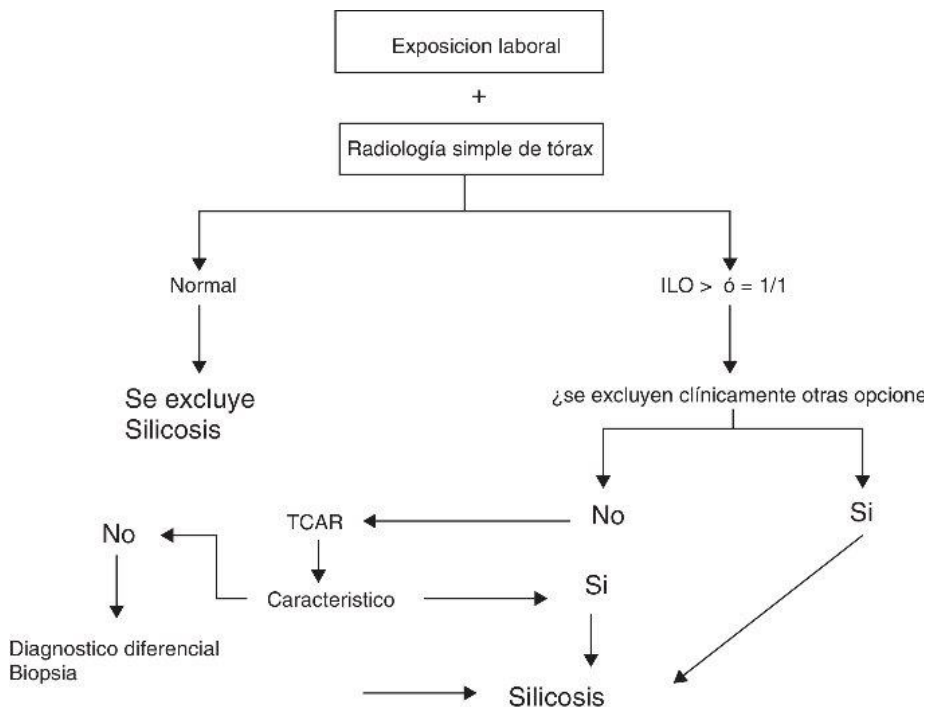


Figura 6: algoritmo diagnóstico de la silicosis



I.3.3 PRUEBAS DE FUNCIÓN PULMONAR

La espirometría es la técnica principal para realizar el estudio funcional. La espirometría puede ser normal en las etapas iniciales de la silicosis (Leung CC et al., 2005). No obstante, en la silicosis simple puede observarse tanto un patrón obstructivo como restrictivo, con un predominio de la obstrucción en fumadores (Roseman KD et al., 2010; Leung CC et al., 2005; Rosenman KD et al., 2010).

La capacidad de difusión podría ser más sensible en fibrosis inicial, incluso aunque no es por completo específica (Lopez AJ et al., 2008, Ooi GC et al., 2002, Rosenman KD et al., 2010). El descenso de la capacidad pulmonar total y de la compliance pulmonar se evidencian sobre todo en casos de enfermedad grave y progresiva

Las técnicas de oscilometría podrían ayudar a detectar el incremento en la resistencia respiratoria total y en la vía aérea, así como en el descenso de la compliance (Sa PM et al., 2010).

Las pruebas de esfuerzo no son más sensibles que los test de función pulmonar en demostrar la afectación ventilatoria inicial en la silicosis inicial, pero podrían correlacionarse con la disnea de esfuerzo (Wang X et al., 1995).

La pulsioximetría y la gasometría arterial son útiles para establecer la gravedad, ya que pueden detectar la existencia de



insuficiencia respiratoria ($paO_2 < 60$ mmHg con $SpO_2 < 90\%$) en los casos más avanzados.





1.4 FISIOPATOLOGÍA

Las variedades patológicas de la silicosis incluyen la silicosis simple (nodular), la fibrosis masiva progresiva (FMP), silicoproteinosis y la fibrosis intersticial difusa (Jalloul as et al., 2007; Mossman BT et al., 1998).

La identificación patológica macroscópica de los pulmones identifica nódulos de consistencia dura y predominio en lóbulos superiores junto con adenopatías hiliares y peribronquiales con frecuencia aumentadas de tamaño. El análisis microscópico muestra los característicos nódulos silicóticos en parénquima y linfáticos hiliares (figura 7). Bajo luz polarizada, se objetivan partículas birrefringentes con frecuencia en el centro de los nódulos, aunque la mayoría son silicatos en lugar de sílice (que es débilmente birrefringente). En la FMP, los nódulos pulmonares confluyen, dando lugar a lesiones de 1 cm o más.

Loas características histológicas de la silicoproteinosis asemejan a las de la proteinosis alveolar primaria, con material lipoproteico con gránulos positivos para la tinción de ácido periódico de Schiff.



Los nódulos silicóticos, si están presentes, son de menor tamaño que en otras formas de silicosis.

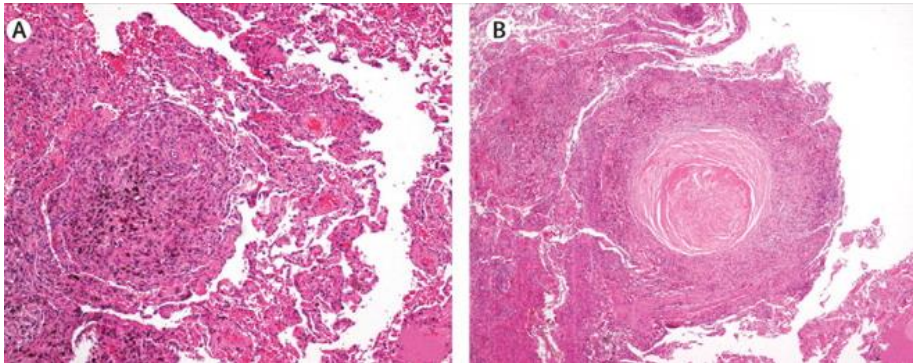


Fig 7: imagen microscópica de un pulmón con lesiones silicóticas

Imágenes de nódulo silicótico con macrófagos cargados de polvo (Ax100), Nódulo silicótico crónico con fibrosis concéntrica y macrófagos cargados de sílice en la periferia (Bx40)

La inhalación de polvo de sílice conduce al depósito del mismo en las vías aéreas distales. Existen varios estudios tanto in-vitro como en modelos animales que se centran en la descripción de como los macrófagos alveolares interaccionan con las partículas de sílice y los efectos de la toxicidad celular inducida por las mismas (Huaux F., 2007; Hamilton RF et al., 2008; Thakur SA et al., 2009).



La silicosis puede producir radicales libres de oxígeno (ROS) de forma directa en la superficie de partículas de sílice ó indirectamente a través de su efecto en células fagocíticas (Hamilton RF et al., 2008). Los receptores “escoba” ó Scavenger (RS), especialmente los receptores expresados en los macrófagos alveolares con estructura colágena, parecen cumplir un papel significativo en el reconocimiento de la sílice.

Varios estudios “in vitro” y en modelos animales (Dostert C et al., 2008; Cassel SL et al., 2008; Hornung V et al., 2008) han sugerido la probable secuencia de eventos tras la fagocitosis (figura 8).

El origen del cebado ó “priming” de los lipopolisacáridos es desconocido, pero podría deberse a la interacción con otros factores de riesgo ambientales o genéticos.

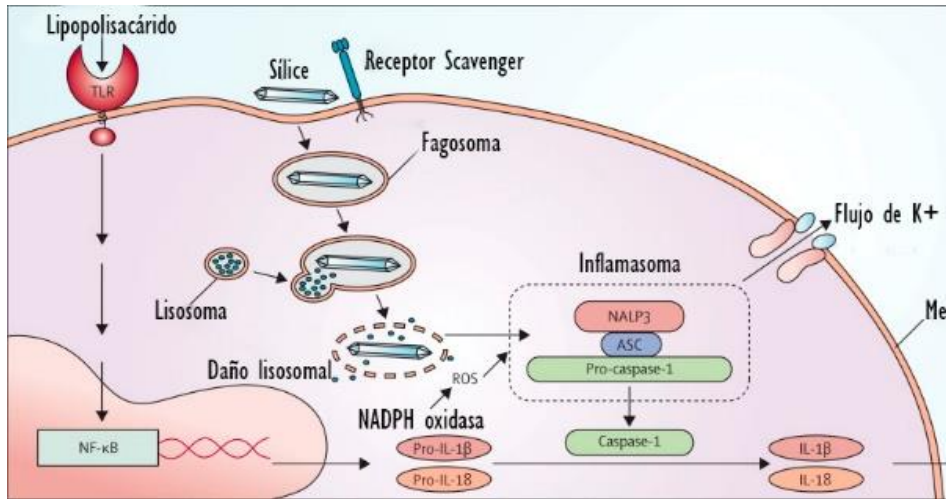


Fig 8 (adaptado de Leung et al., 2010): secuencia de eventos tras la fagocitosis de sílice.

Activación del inflammasoma NLRP3 por cristales de sílice tras el cebado inicial por un lipopolisacárido: La fagocitosis de sílice cristalina conduce a la activación de fagosomas, seguido de desestabilización de los mismos que liberan su contenido en el compartimento citosólico. El resultado final es la activación del complejo enzimático inflammasoma NLRP3 que da lugar a potentes moléculas proinflamatorias tales como IL-1b e IL-18. La activación del inflammasoma NLRP3 por sílice necesita también la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) por una oxidasa NADPH tras la fagocitosis de partículas y de un flujo intracelular de iones potasio (K⁺), lo que sugiere una posible interacción de la sílice con alguna proteína asociada de membrana. TLRs ó receptores IL-1 no parecen ser esenciales en la activación del inflammasoma. Sin embargo, la secreción de IL-1b por macrófagos humanos ó de ratón en respuesta a la sílice ó al asbesto “in vitro” parece producirse en dos pasos debido a que es necesario el “priming” por un lipopolisacárido. Los SR parecen tener un papel en el reconocimiento y absorción de sílice.



La activación de la IL-1 y otras citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), tienen un papel fundamental en la inflamación y fibrosis subsiguiente (Huax F et al., 2007; Hornung V et al., 2008; Gasse P et al., 2007). Por otra parte, la caspasa 1 modula la secreción de determinadas proteínas tales como el factor de crecimiento fibroblástico-2 que podría tener un papel en la patogénesis (Keller M et al., 2008). Tras la apoptosis inducida por la sílice, la sílice digerida se libera nuevamente dando lugar a un nuevo ciclo de fagocitosis e inflamación.

En respuesta a la sílice, las células dendríticas se activan y migran del alveolo al parénquima pulmonar, tal y como se ha demostrado en ratones (Beamer CA et al., 2007). En ratones con linfopenia, la fibrosis inducida por la sílice y la inflamación ocurren de forma independiente de las células T, B y natural killer (NK), pero los linfocitos podrían participar en la regulación de la inflamación inducida por sílice a través de la modulación del complejo del inflammasoma, especialmente el denominado NacHT Domain – Leucine-Rich Repeat and PYD containing Protein 3 (NLRP3) NLRP3 (Beamer CA et al., 2010). En el modelo murino, las células T ejercen una función de modulación a través de la expresión de



antígeno 4 citotóxico del linfocito T y de forma indirecta mediante la secreción de IL-10 y (Factor de crecimiento fibroblástico (transforming growth factor (TGF)- β) durante la fase de fibrosis (Liu F et al., 2010).

La activación del inflamasoma NLRP3, da lugar además a activación de pro-caspasa-1 y a su conversión en caspasa-1 que a su vez da lugar a la secreción de citoquinas proinflamatorias, especialmente Pro-IL-1 β , Pro-IL-18 y su conversión posterior en formas activas. Además, la activación de caspasa-1 modula la secreción de proteínas atípicas como el mencionado factor de crecimiento fibroblástico (TGF- β).

Ciertos datos sugieren que existe una posible implicación de las células epiteliales pulmonares en la inflamación pulmonar con mecanismos de activación proinflamatoria de dichas células in vivo e in vitro tanto dependientes como independientes del factor nuclear kB (Van Berlo D et al., 2010).

Un estudio in vitro ha demostrado también que el TGF- β 1 puede inducir cambio de las células del epitelio bronquial humano a células mesenquimales y dicho efecto se intensifica por IL-1 β (Doerner AM



et al., 2009. Sin embargo, el papel exacto del TGF- β 1 y IL-1 β en la silicosis es desconocido a pesar de que sabemos que los macrófagos alveolares y la secreción de IL-1 β juegan un papel crucial en la fase temprana de desarrollo de silicosis. De hecho, se ha demostrado que los macrófagos de ratones expuestos a sílice presentan una secreción elevada de IL-1 β comparada con la de los ratones sanos. Determinados polimorfismos en los alelos IL-1RA se han vinculado a la susceptibilidad en los seres humanos para desarrollar silicosis.

1.4.1 EL INFLAMASOMA

En el momento actual sabemos que, en condiciones normales de homeostasis adecuada del medio interno, la mucosa respiratoria, las células dendríticas y los macrófagos alveolares, mantienen un delicado equilibrio entre las agresiones externas y una respuesta inmunitaria adecuada y oportuna frente a las mismas, dando lugar a fenómenos inflamatorios que conllevan finalmente a la reparación de los tejidos. En caso contrario, la existencia de respuestas inflamatorias exageradas o deficientes, puede conducir, en función



del desencadenante patogénico, a la génesis de diversas enfermedades pulmonares, desde infecciones respiratorias de vías bajas a daño pulmonar agudo, fibrosis pulmonar ó EPOC. Todo ello indica que el proceso inflamatorio es controlado y que el control del mismo es extremadamente complejo. Sabemos que unas piezas clave en este control lo constituyen los miembros de la familia IL-1, cuyo miembro más representativo es IL-1 β . La producción de IL-1 β requiere la maduración proteolítica promovida por complejos multiproteicos citoplasmáticos denominados inflamasomas.

Los inflamasomas fueron descritos por primera vez en 2002 por Martinon et al. Que describieron un complejo supermolecular proteico que era capaz de activar la caspasa-1 y la caspasa-5, que a su vez eran enzimas requeridos para el procesamiento y escisión de pro-IL-1 β y pro-IL-18.

Las enzimas denominadas caspasas (Cysteine-ASPartic proteASES), pueden dividirse en dos grupos en función de su mecanismo final de acción.



1. Caspasas proapoptóticas, también clasificadas en dos subgrupos. Las caspasas iniciadoras (Casp-2, -8 y -10) y las caspasas efectoras (Casp-3, -6 y -7).
2. Caspasas inflamatorias que contienen el dominio CARD que están relacionadas con los inflamasomas y con la formación de IL-1b y IL-33.

Las caspasas 11 y 12 son conocidos moduladores de la actividad de la caspasa 1, donde la Caspasa-11 se requiere para la activación adecuada del inflamasoma en presencia de LPS aunque es prescindible en la infección por *L. monocytogenes*. La caspasa 12 es una molécula inhibidora natural que limita el daño celular durante infecciones graves y detiene la actividad indeseable del inflamasoma para prevenir situaciones como las observadas en la urticaria familiar al frío y el CINCA (Chronic Infantile Neurological Cutaneous Articular syndrome) (Scott AM et al., 2007).

Los inflamasomas son parte de los componentes de la inmunidad innata, la cual no solo constituye la primera línea de defensa, sino que también promueve el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. La activación de la respuesta innata involucra una variedad de componentes celulares y solubles que reconocen



diferentes “señales de peligro” dando lugar a funciones efectoras ante ellos. Esta capacidad de reconocimiento se efectúa a través de una serie de proteínas denominadas receptores de reconocimiento de patrones ó PRRs (Pattern Recognition Receptors). Los PRRs se expresan en las células que constituyen la primera línea frente a la infección, como son: los macrófagos, monocíticos, células dendríticas, neutrófilos y células epiteliales así como células del sistema inmune adaptativo y proveen a la célula de una serie de proteínas complejas capaces de inducir la activación de la coagulación, la vía del complemento, la inflamación o la inducción de apoptosis. De esta forma, los PRRs son capaces de reconocer por un lado diferentes componentes estructurales esenciales para la supervivencia de los organismos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) y por otro, los llamados patrones moleculares asociados a daño ó DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) (Drenth JP et al., 2006).

Los PRR se pueden clasificar en tres grupos: Aquellos que se expresan en membranas celulares (membrana plasmática o



membranas endosomales), en el citosol y las formas solubles.

Según se refleja en la fig 9.

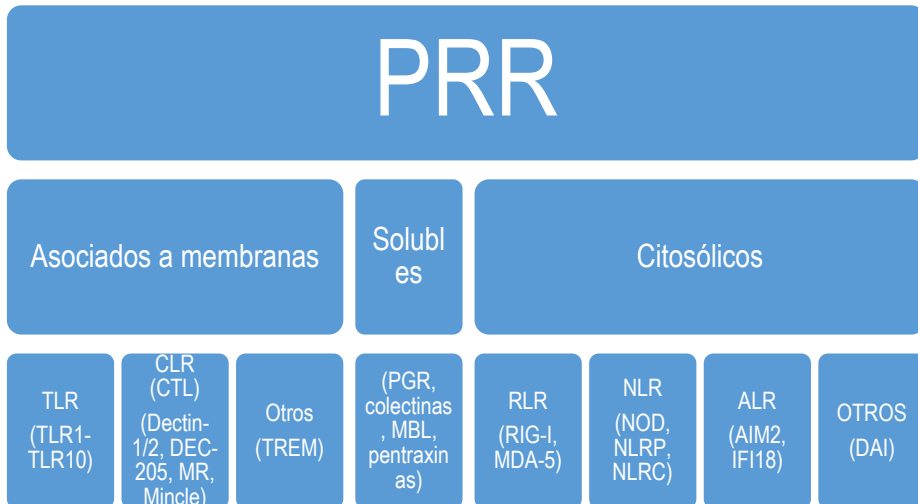


Fig 9: principales familias de receptores de reconocimiento de patrones

Los PRR mejor caracterizados son los TLR (toll-like receptors family), de los cuales se han descrito 10 funcionales en seres humanos (TLR-1 a TLR-10) y que juegan un papel determinante como sensores extracelulares de macromoléculas tales como lipofosfopolisacaridos (LPS), flagelina, ácidos nucleicos, etc.

Se han identificados otros sensores comprometidos con la respuesta inmunológica innata, la familia NLRs (del inglés: The



Nucleotide-binding oligomerization domain like-receptors and Leucin-rich repeat); estas macromoléculas son sensores intracelulares de señales de peligro producidas en respuesta a componentes patogénicos (Ting et al., 2008). Como sensores inmunológicos, las proteínas NLR no son únicas de humanos y ratones; las plantas tienen proteínas parecidas llamadas proteínas R que ejercen una función similar.

La familia de proteínas NLR consta de varios miembros, representados tanto en el genoma de ratones como el de humanos, con una estructura particular definida por tres dominios:

1. Un dominio central de enlazamiento de nucleótidos que media la oligomerización (llamado NOD o NACH).
2. Un dominio N terminal variable (CARD: dominio de reclutamiento de caspasa que define a la familia NLRC; o PYD: dominio de pirinas que define a la familia NLRP; o BIR: repetición IAP de Baculovirus).

3. Un dominio C terminal rico en repeticiones de leucina (LRR), e importante en la detección de señales moleculares asociadas a patógenos, de forma que reconocen carbohidratos complejos presentes en bacterias, virus y hongos, e incluyen miembros como lectina-1 y lectina-2 (también conocidos como CLEC7A (c-type lectin domain family member A) y CLECF4N (c-type lectin domain family member N) respectivamente: DEC-205.

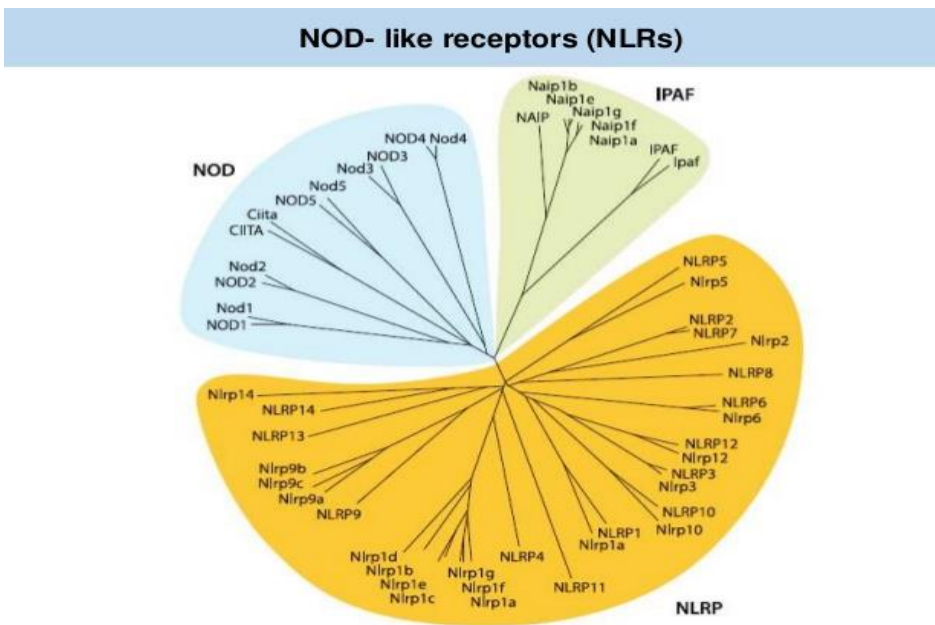


Fig 10: NOD-like receptors (NLRs)

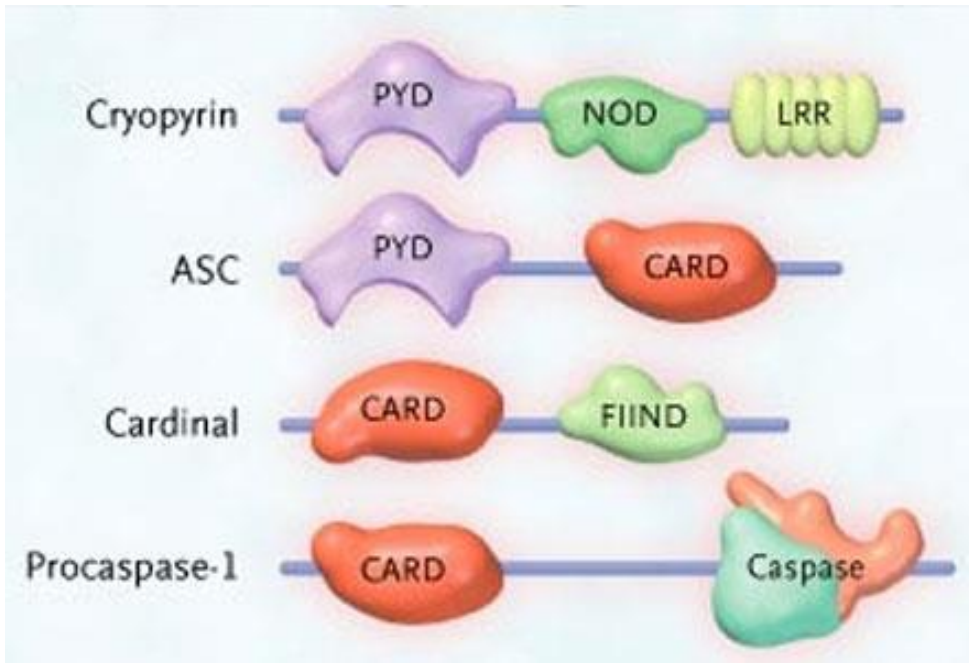


Fig 11: Estructura del inflammasoma NLRP3

Para una activación eficiente del inflammasoma NLRP3 se requiere la activación de dos señales. La primera consiste en lo que se conoce como "priming" o señal preestimuladora, que ocurre cuando las células son activadas mediante los llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), PRR o un receptor de citoquinas que active a NF- κ b, necesario para inducir la expresión de NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-1 β (Bauernfeind FG et al., 2009). Una



vez activada la primera señal, se activa la segunda (específica del inflamasoma NLRP3) que lleva al ensamblaje del mismo. Esto puede ocurrir no sólo en la exposición a estímulos químicos como el asbesto, sílice ó aluminio, sino también como respuesta a procesos infecciosos.

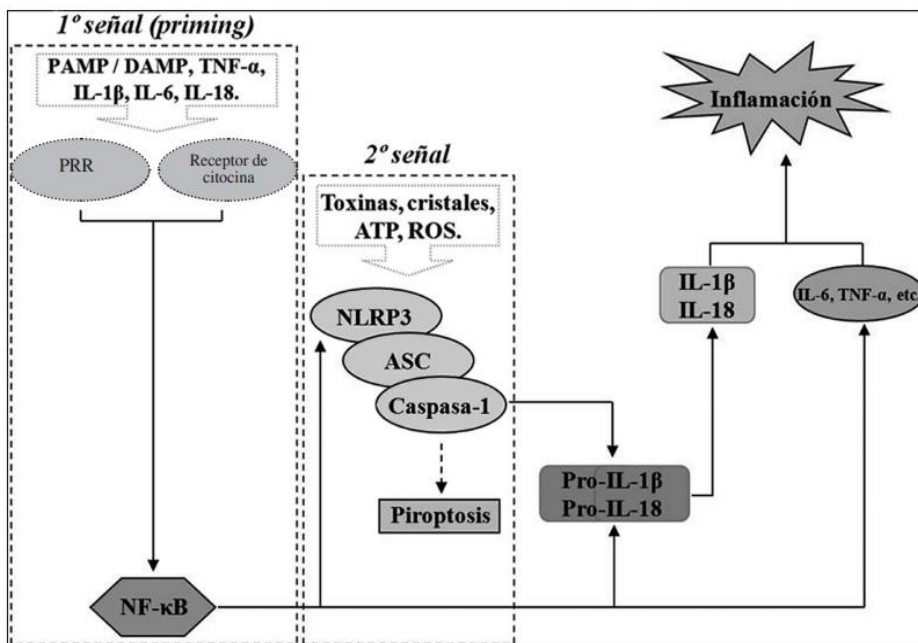


Fig 12: mecanismos de activación del inflamasoma NLRP3: Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o peligro (DAMP), y las citosinas proinflamatorias (entre ellas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18), estimulan la activación de NF- κ B a través de sus respectivos receptores, conformando la primera señal (*priming*) para la activación del inflamasoma NLRP3. Esto promueve la síntesis de NLRP3, pro-IL-1 β y pro-IL-18, y de citosinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF- α , entre otras. Acto seguido se lleva a cabo la activación de la segunda señal, que permite el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 o la formación del complejo NLRP3/ASC/Pro-caspasa-1, para la activación de la caspasa-1, y finalmente la maduración proteolítica de pro-IL-1 β y pro-IL-18, que da origen a las formas biológicamente activas de IL-1 β e IL-18. Ambas citosinas contribuyen al desarrollo y mantenimiento de la respuesta inflamatoria. Paralelo a este proceso, y como consecuencia de la activación de caspasas, se puede inducir apoptosis con liberación de IL-1 β (piroptosis). Los recuadros de líneas discontinuas representan los actores involucrados en el desarrollo de la primera y la segunda señales



Se han descrito al menos cuatro complejos de inflammasoma diferentes.

1. NLRP1b: NLR, pyrin domain-containing 1b.
2. NLRP3: NLR, pyrin domain-containing 3.
3. NLRC4: Caspase activation and recruitment domain-containing 4.
4. AIM2.

Todos estos inflammasomas, dan lugar a la activación de caspasa-1 en respuesta a infecciones microbianas y condiciones de stress que han sido validados en ratones knockout ó ratones KO (ratones a los que se les inactiva un gen para determinar su función). Los mecanismos de activación de caspasa-1 por parte de diferentes tipos de inflammasomas, que conllevan a la inducción y secreción de IL-1b, muestran una gran diversidad y complejidad, e incluyen entre otros la muerte celular programada por procesos proinflamatorios (Piroptosis), restricción de la replicación por ej. bacteriana, etc.

De gran interés ha sido el establecimiento de la relación de la familia NLRs con enfermedades inflamatorias humanas. Tal



investigación ha permitido la identificación de genes particulares y la definición de interrelaciones proteína-proteína que conforman complejos multiproteicos donde miembros de la familia NLR tienen una participación fundamental. La definición del inflamasoma, sus características estructurales y funcionales han permitido asociar mutaciones en genes de proteínas NLR particulares a desordenes inflamatorios humanos como vitiligo (mutación en el gen *NPL1*), síndrome Muckle-Wells (Hoffman HM et al., 2.001) (mutación en el gen *NPL3*), la enfermedad de Crohn (Murillo L et al., 2.002; Ogura Y et al., 2.001), la gota (Martinon F et al., 2.006), La DM tipo II (Larsen et al., 2.009; Larsen et al., 2.007, Maedler et al., 2.009) y la enfermedad de Alzheimer (Halle A et al., 2008) entre otras. El tratamiento de pacientes con algunas de estas enfermedades con antagonistas de receptores IL-1 revierte los síntomas clínicos, sugiriendo una relación causa efecto entre la producción de IL-1b y la enfermedad. Recientemente, se han encontrado evidencias de una estrecha relación entre inflamasomas y desordenes metabólicos como obesidad y diabetes tipo 2 (Schroder et al 2.010).

Determinar el rol del inflamasoma en estas enfermedades es de gran importancia en el desarrollo de terapias apropiadas y en el



conocimiento de los mecanismos que modulan los procesos inflamatorios.

Sabemos además que, en concreto el inflamasoma NLRP1b tiene como único desencadenante conocido para su activación la toxina de *Bacillus anthracis* (Kovarova M et al., 2012).

Por el contrario, el inflamasoma NLRP3 responde a un amplio espectro de agentes infecciosos, partículas extrañas y moléculas endógenas que se asocian con daño tisular y stress. En lo que respecta a las infecciones pulmonares, las células mieloides responden a la activación del inflamasoma NLRP3 en presencia de infección por bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis* así como a hongos patógenos como *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*. También se ha evidenciado activación en presencia de infección por virus de la gripe A y virus respiratorio sincitial (VRS). Tal y como se recoge en la tabla siguiente (Brusselle Guy et al., 2014).



Tabla 5: Activación del inflamasoma NLRP3 por gérmenes patógenos

PATÓGENO	ACTIVADOR MICROBIANO	INFLAMASOMA
Bacterial		
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax lethal toxin	NLRP1b
<i>Bordetella pertussis</i>	CyaA	NLRP3
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Unknown	NLRP3
<i>Francisella tularensis</i>	DNA	AIM2
<i>Haemophilus influenzae</i>	Unknown	NLRP3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Unknown	NLRP3, NLRP4
<i>Legionella pneumophila</i>	Flagellin	NLRP4
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Acylated lipopeptides	NLRP7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Flagellin	NLRP4
<i>Staphylococcus aureus</i>	Hemolysins	NLRP3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Pneumolysin, DNA	NLRP3, AIM2
Fungal		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Unknown	NLRP3
<i>Candida albicans</i>	Unknown	NLRP3
Mycobacterial		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ESAT-6, DNA	NLRP3, AIM2
Viral		
Cytomegalovirus	Viral double-stranded DNA	AIM2
Influenza A	Viral M2, viral RNA ²	NLRP3
Respiratory syncytial virus	Unknown	NLRP3

1.4.1.2 IMPORTANCIA DEL INFLAMASOMA NLRP3 EN LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

ASMA

Un denominador común de las enfermedades pulmonares inflamatorias crónicas, como el asma, la EPOC y fibrosis pulmonar, es que representan enfermedades complejas que resultan de la interacción entre la susceptibilidad genética y la exposición



ambiental. De hecho, varios hallazgos sugieren que la vía inflamatoria podría estar implicada en la patogénesis del asma. En primer lugar, los estudios de asociación genómica de asma han demostrado una asociación significativa con los polimorfismos de un solo nucleótido en el gen IL18R1 en el cromosoma 2q21 (Moffat MF et al., 2010). Por otra parte, los polimorfismos NLRP3 funcionales, que incrementan la estabilidad del ARN mensajero del NLRP3 y la expresión del mismo, se han asociado al asma inducido por aspirina (Hitomi Y et al., 2009). En segundo lugar, en un modelo experimental de asma alérgica inducida por ovoalbúmina (OVA), la inflamación alérgica de las vías respiratorias dependía de la activación inflamatoria NLRP3, dando lugar a producción de IL-1 β y a la inducción de una respuesta inflamatoria Th2 IL-1 (Bernard AG et al., 2011). Es más, la hiperrespuesta inducida por OVA fue significativamente menor en ratones con bloqueo en producción de IL-1 β (Nakae S et al., 2003). Sin embargo, el papel de la inflamación NLRP3 en la patogénesis de enfermedad alérgica de las vías respiratorias en ratones es controvertido, ya que Allen et al (Allen et al., 2012), no encontraron diferencias significativas en eosinofilia, producción de moco, o hiperreactividad bronquial en la vía respiratoria en modelos de ratones normales y NLRP3 - / - .



Aunque se debate el papel del inflamasoma NLRP3 en el asma alérgica estable, quizás podría estar involucrado en otros fenotipos de asma (por ejemplo, eosinofílica no alérgica y el asma neutrofílica) o durante las exacerbaciones de la enfermedad, que son más frecuentemente provocada por infecciones respiratorias. En estudios in vivo con ratones utilizando estudios in vitro en células epiteliales de las vías respiratorias humanas y los estudios in vivo en ratones normales y NLRP3 - / -, Hirota et al. (Hirota et al., 2012), demostraron que el inflamasoma NLRP3 se expresado en el epitelio de la vía aérea se activa por partículas urbanas, dando lugar a la escisión de caspasa-1 y producción de IL-1 β .

EPOC

Sabemos que existen niveles elevados de diferentes activadores del NLRP3 en las vías aéreas y pulmones de pacientes con EPOC. Desde el Adenosín trifosfato (ATP) extracelular, ácido úrico (cristales), ROS y PAMPs bacterianos (Lommatzsch et al., 2010; Brusselle GC., 2011).



Se ha observado un incremento de la activación de caspasa-1 en tejido pulmonar de pacientes con EPOC y donantes fumadores comparados con no fumadores (Eltom S et al., 2.011). Además, el efecto inhibitor de moléculas del inflamasoma NLRP3 IL-1B e IL-18, están aumentadas en pacientes con EPOC (Pauwels NS et al., 2.011; Botelho FM et al., 2.011; Imaoka H et al., 2.008). Se han observado también niveles elevados de IL-1b en esputo inducido y en biopsias de pulmones de pacientes con EPOC leve a moderado (Pauwels NS et al., 2.011; Botelho FM et al., 2.011). Es más, los niveles en esputo de IL-1a e IL-1b se incrementaron en exacerbaciones de EPOC en comparación con los niveles medidos durante la estabilidad clínica (Botelho FM et al., 2.011). Se ha demostrado también una producción incrementada de IL-18 por los macrófagos alveolares, células T CD8+ y células del epitelio alveolar y bronquial en los pulmones de pacientes con EPOC (Imaoka H et al., 2.008).

A este respecto, la neutrofilia inducida por el humo del tabaco en ratones se asoció con un incremento en la actividad de la caspasa-1 y de los marcadores subsiguientes de activación del inflamasoma (IL-1b e IL-18). Es más, los ratones IL-1R -/- estuvieron protegidos



no sólo contra el incremento agudo de células inflamatorias en el Lavado broncoalveolar (BAL) tras exposición aguda a humo de tabaco, sino también contra el enfisema inducido crónicamente por el mismo (Churg A et al., 2.009). Siin embargo, la inflamación aguda inducida por el humo de tabaco no se atenuó significativamente en ratones con NLRP3-/- y caspasa-1 -/- comparados con ratones normales, lo que sugiere también que IL-1a contribuyeron a la inflamación mediada por IL-1R tras la exposición al humo del tabaco (Pauwels NS et al., 2.011; Botelho FM et al., 2.011). Modelos en ratones que combinan la exposición al humo del tabaco con infecciones respiratorias en un intento de imitar las exacerbaciones de la EPOC son precisos, para entender el papel del inflamasoma NLRP3 in vivo.

FIBROSIS PULMONARES (Asbestosis, Silicosis y Fibrosis pulmonar idiopática)

Varias líneas de evidencia sugieren que inflamosomas, y en particular el inflamasoma NLRP3, podrían estar involucrados en la patogénesis de enfermedades pulmonares fibrosantes, incluyendo



la fibrosis pulmonar idiopática y enfermedades provocadas por exposiciones ambientales conocidas (por ejemplo, asbestosis y silicosis). Diversos polimorfismos de nucleótido único en el gen NLRP3 se han asociado con neumoconiosis de los mineros del carbón, y desarrollo eventual de fibrosis pulmonar (Ji X et al., (2012). Los estudios in vitro han demostrado que el amianto y sílice son detectadas por el NLRP3 inflamasoma, cuya posterior activación conduce a la secreción de IL-1 β (Hornung V et al., 2008; Dostert C et al., 2008). La activación de NLRP3 por sílice requiere la fagocitosis de cristales de sílice por los macrófagos, que posteriormente conducen a daño lisosomal y ruptura (Dostert C et al., 2008) Aunque la generación de ROS y los niveles incrementados de calcio intracelular, detectados por el receptor sensible a calcio, se cree que están involucrados en la activación del inflamasoma NLRP3 por asbesto y sílice (Lee GS et al., 2012; Cassell SL et al., 2008), un artículo reciente mostró que se requería flujo de K⁺ y que era suficiente para la activación del NLRP3 (Muñoz-Planillo R et al., 2013). En modelos de ratón de asbestosis y silicosis, NLRP3^{-/-}, los ratones mostraron disminución del número de células inflamatorias en los pulmones y una menor



producción de citoquinas tras la exposición al asbesto o sílice inhalado, en comparación con controles (Dostert C et al., 2008; Cassell et al., 2008). 3 meses después de la exposición a sílice, los ratones NLRP3 ^{-/-} tenían menos depósito de colágeno visualizado por tinción con tricrómico en las secciones de pulmón que los ratones comunes. No sabemos si el inflamasoma NLRP3 se requiere en las fases tempranas del desarrollo de fibrosis pulmonar o está involucrado en la progresión de la enfermedad establecida.

1.4.2 RADICALES LIBRES DE OXÍGENO (ROS)

Además de los DAMPs y los PAMPs, los ROS, se ha demostrado que juegan también un importante papel en la activación del inflamasoma. A este respecto, existen estudios recientes que sugieren que la producción de ROS es inducida por muchos estímuladores del inflamasoma NLRP3 fagocitosis-dependientes, como sílice (Cassel SL et al., 2008) y asbesto (Dostert C et al., 2008) como en modelos independientes de fagocitosis inducidos por ATP extracelular y flujo de potasio (Kahlenberg JM et al., 2004; Petrilli V et al., 2007), pero a la vez, la existencia de ROS elevado



es esencial para la activación del mismo. No obstante, el origen celular de ROS encargado de la mediación de estas respuestas sigue siendo incierto. ROS es inicialmente un subproducto de la fosforilación mitocondrial oxidativa. Durante la respiración el 1-2% del oxígeno molecular se reduce a superóxido e ión hidroxilo (OH⁻). Los lugares de producción en la cadena respiratoria mitocondrial son fundamentalmente los complejos I y III. El complejo I acepta electrones del NADH mediante un gradiente electroquímico a través de ubiquinona a completo III y posteriormente al citocromo C y complejo IV donde el oxígeno es reducido a agua. Además de en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, ROS se genera también en células de mamíferos mediante la actividad de enzimas como las oxidadas de NADPH (NOXs), xantinoxidasa (XO), ciclooxigenasa y lipoxigenasa (Habu et al., 1990; Lacy et al., 1998; Andrew and mayer, 1999; Paravicini and Touyz, 2.008). Existe suficiente evidencia de que la producción de ROS por activadores del inflamasoma NLRP3/NLRP3 involucra a la familia NOX de proteínas de transmembrana. Estas proteínas generan ROS mediante el transporte de electrones a través de membranas biológicas desde un donante citosólico (NADPH) a un aceptor de



electrones (O_2) a nivel del del espacio extracelular o luminal (Martinon et al., 2010; Nakahira et al., 2.011).

Dado que la generación de ROS es esencial para la señalización celular y varias respuestas fisiológicas importantes, la excesiva acumulación de ROS puede conducir a daño celular y muerte. Para amortiguar este stress oxidativo, las células tienen varios mecanismos antioxidantes de defensa que incluyen: superóxido dismutasa (SOD), glutation-peroxidasa (GPX), thioredoxina, catalasa (CAT) y peroxiredoxinas (Rahman et al., 2.006; Johnson et al., 2010).

La producción de ROS por células polimorfonucleares (PMN) y monocitos cuando están expuestos a la unión con activadores de NLRP3 regula la activación de factores transcripcionales redox-dependientes tales como el factor nuclear promotor de cadenas ligeras kappa de células B activadas (NF-kB) y proteína activada I a través de las proteín-quinasas mitogen-activadas (MAP kinasas) y producción de citoquinas pro-inflamatorias (Kabe et al., 2.005; Bauernfeind et al., 2.009).



Estudios animales han mostrado que la activación de IL-1B y caspasa-1 es ROS dependiente (Dostert et al., 2.008; Franchi et al., 2.009). En un bucle de interacción positiva, el IL-1 β promueve la acumulación extracelular de ROS desacoplando superóxido dismutasa (SOD9, glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT). Sabemos que el inflamasoma NLRP3 juega un papel crucial en la activación de la caspasa-1 y en el procesamiento proteolítico de pro-IL-1b.

La activación de las citoquinas inflamatorias IL-1 β y IL-18 es regulada de forma independiente por el inflamasoma. Sabemos que las células dendríticas de ratón “cebadas” por la proteína p60 de la *Listeria monocytogenes*, responden a la estimulación produciendo ROS y secretando IL-1 β y IL-18 sin piroptosis acompañante. Los inhibidores de la producción de ROS inhiben la secreción de IL-1 β , pero no la de IL-18 (Schmidt and Lenz, 2012).

Entre los múltiples agentes inductores de respuesta inflamatoria, aún no se ha demostrado un punto de convergencia que conlleve la activación de NLRP3. De hecho, en recientes estudios, se ha



demostrado desarrollo de silicosis en ratones deficientes en inflammasoma NLRP3.

En lo que concierne al presente trabajo, se ha demostrado que activadores como Sílice, asbesto y ATP precisan de producción de ROS para su actividad. En mamíferos el ATP extracelular se une a receptores P2X7 induciendo la acumulación rápida de ROS y activando el inflammasoma NLRP3/NLRP3 (Solini et al., 2013). La fuente de ROS activado por ATP parece ser derivada de la familia de proteínas NADPH oxidasa (NOX), dado que el inhibidor del NOX difenileneiodonium (DPI) inhibe la generación de Caspasa 1 dependiente de ATP generado por ROS.

Resumiendo la secuencia patogénica más probable, la secreción de IL-1 β por los macrófagos en respuesta a sílice y asbesto *In vitro* es un proceso en dos pasos. Inicialmente los macrófagos tienen que ser activados para responder a sílice ó asbesto. El origen de esta activación ó “priming” *in vivo* no está claro y podría estar mediado por citoquinas inflamatorias producidas localmente. La enfermedad en humanos puede acelerarse también por una infección respiratoria, lo que podría aumentar la activación macrofágica.



Los macrófagos parecen reconocer y reaccionar directamente a la sílice a través del inflammasoma NLRP3. Esta interacción inicial conduce a la liberación de ROS y a la activación de caspasa-1 y la consecuente respuesta inflamatoria. Las citoquinas inflamatorias como $TNF\alpha$ parece que juegan también un papel en la silicosis. Existen datos que sugieren que estas citoquinas inflamatorias son consecuencia de la producción inducida por sílice de $IL-1\beta$ y no el resultado de una acción directa de la sílice sobre el macrófago (Cassel et al., 2008). Diversos estudios han implicado la caspasa 1 en la modulación de otro tipo de proteínas y en especial del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) (Keller M et al., 2008).

Las implicaciones de todos estos hallazgos, de los diferentes papeles de la caspasa 1 en la patogénesis de la enfermedad y del papel del inflammasoma NLRP3 en el reconocimiento de la sílice y la activación de la caspasa 1 genera ciertas esperanzas sobre potenciales dianas terapéuticas, no sólo en la silicosis, sino en las enfermedades fibróticas pulmonares en general.



1.5. IMPORTANCIA DEL PROBLEMA

Como hemos visto, los trabajadores están expuestos a sílice cristalina en múltiples actividades. Esta exposición sigue siendo un problema de salud en el ambiente laboral, que se ha visto potenciado al conocer su efecto carcinógeno y su implicación en el origen de otras alteraciones respiratorias como son: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis pulmonar difusa, tuberculosis pulmonar, etc. El problema es preocupante por su posible continuidad en el futuro, entre otras razones, porque no se conoce con certeza el nivel de exposición de efecto 0 o nulo. El nivel de 0.1 mg/m^3 propuesto por la OSHA (Occupational Safety and Health Administration) norteamericana y aceptado en muchos países, parece que no previene aceptablemente la mortalidad por silicosis. Por otra parte, niveles más exigentes como el de 0.05 mg/m^3 propuesto por el National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) norteamericana es difícil de conseguir por las empresas. Además, la exposición a sílice está aumentando en determinados sectores industriales por la expansión de explotaciones de canteras y por el uso de productos rocosos



(granito, pizarra) en construcción y ornamentación, así como por nuevas aplicaciones industriales de la sílice (polvo y harina de sílice, etc.). Por todo ello, lamentablemente, siguen observándose formas graves de la enfermedad.

Ante las dificultades de prevención técnica indicadas, parece imprescindible abordar el problema bajo el punto de vista de la exposición a riesgo y de la susceptibilidad del trabajador expuesto. Así es un hecho bien conocido que, con la misma exposición a sílice, unos trabajadores desarrollan la enfermedad y otros no. Para poder identificar la población de sujetos susceptibles es necesario conocer detalladamente el mecanismo patogénico de la enfermedad y los mediadores inflamatorios involucrados en su desarrollo. Las armas destructivas más potentes de que dispone el organismo para defenderse de agentes extraños inhalados son: el sistema enzimático (proteasas, lipasas, amilasas) y el oxidativo (radicales oxidantes). Ambas armas parecen totalmente inútiles ante la sílice, ya oxidada y no destructible por enzimas. Parece lógico pensar que su presencia crónica en el pulmón acabe dañando el propio organismo destruyendo sus tejidos y conduciendo a la fibrosis (cicatriz) y que los trabajadores, en los que



la respuesta inflamatoria ante la sílice y sus consecuencias sea más fuerte y/o esté peor controlada sean los predispuestos a padecer enfermedad. Esto constituye la hipótesis del "fenotipo reactivo" ya formulada previamente.

En individuos susceptibles, el mantenimiento de un estado inflamatorio prolongado en el tiempo conllevaría una profunda alteración de la matriz pulmonar. Esto quedaría reflejado tanto a nivel del equilibrio oxidantes/antioxidantes como en la alteración del equilibrio proteasas/antiproteasas encargado de mantener la homeostasis pulmonar.





1.6 BIOMARCADORES

En el momento actual, la detección clínica de la silicosis depende de la detección previa de alteraciones radiológicas que se producen de forma muy tardía tras la exposición y son una manifestación de una enfermedad ya irreversible. Dado que la silicosis no es una enfermedad potencialmente curable, es extremadamente interesante la detección e marcadores de riesgo que puedan utilizarse para la detección temprana de las alteraciones fisiopatológicas que pueden dar lugar a la enfermedad.

Los marcadores biológicos o biomarcadores, son alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que se pueden medir en diferentes medios biológicos, tales como tejidos humanos, células o fluidos. Es una característica biológica que puede ser medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Incluyen herramientas que pueden ayudar en la comprensión del pronóstico, causa, diagnóstico, progresión, regresión o el resultado de una enfermedad. Sólo o en combinación, los biomarcadores pueden proporcionar un sistema



de alerta temprana para los riesgos de futuros resultados adversos para la salud.

1.6.1 MARCADORES DE EXPOSICIÓN

Los marcadores de exposición indican la presencia de sílice en el organismo e idealmente podrían cuantificar dicha exposición.

Para la identificación de la misma en tejidos animales, algunos investigadores han usado el método químico con azul de molibdeno (Absher et al., 1992; Adamson et al., 1994; Hemenway et al., 1990). Otros han usado técnicas de microscopía electrónica (ME). Por ejemplo, la presencia de sílice cristalina en muestras de biopsia y autopsia de tejido pulmonar puede determinarse con ME con una sonda microanalizadora (Pariante et al., 1970), análisis sónico de electrones (Pariante et al., 1972) y microscopía de escaneado electrónico (SEM) junto con microanálisis de la dispersión de energía de rayos x (EDXA) (Funahashi et al., 1975, 1977, 1984; Liebetrau et al., 1987; Morgenroth, 1979) ó SEM con espectrometría de energía de rayos X (Lapenas et al., 1982; McDonald & Roggli,



1995; Pierini, 1982; Pintar et al., 1976). También se han utilizado microscopía de transmisión de electrones (TEM) y espectroscopia de dispersión de energía (EDA) junto con microscopía de difracción de rayos x (XRD).

Con la metodología previamente descrita, se ha podido establecer una relación entre el cuarzo en diferentes compartimentos pulmonares y la gravedad de la silicosis en mineros de oro. Pero no se ha podido establecer una relación lineal entre la duración de la exposición a polvo y la afectación pulmonar (Dufresne et al., 1998).

El uso de BAL para valorar la cantidad de sílice cristalina o partículas inorgánicas de otra naturaleza mediante microscopía electrónica ó microanálisis semicuantitativo por rayos X ha permitido también valorar la exposición a polvos inorgánicos distintos de sílice cristalina (de Vuyst et al., 1987 Dumortier et al., 1989; Gaudichet et al., 1987).

Sin embargo, no existe un marcador definitivo que pueda establecer de forma precisa la relación dosis-respuesta en la génesis de la enfermedad. Además, las anteriores medidas de



cuantificación requieren instrumentos sofisticados y técnicas invasivas y no pueden ser recomendados de forma rutinaria para establecer una medida adecuada de exposición.

1.6.2 BIOMARCADORES DE EFECTO

Los biomarcadores de efecto, podrían indicar de forma temprana los procesos fibrógenos que preceden a la aparición de enfermedad o de forma más tardía el desarrollo y presencia de la misma (Bennet y Waters, 2.000; Schuylte, 1991; Ward y Henderson, 1996). La gran mayoría de las investigaciones sobre la patología se han centrado en la identificación de las respuestas biológicas en la evolución de la enfermedad como predictoras del desenlace de la misma ó en los mecanismos de acción de la toxicidad de la sílice cristalina.

Los biomarcadores de efecto podrían dividirse en tempranos o tardíos dependiendo de su capacidad de discernir entre la interacción inicial entre la sílice con los sistemas celulares ó en la existencia de un mínimo daño pulmonar. Estos biomarcadores han sido demostrados en animales de experimentación (DiMatteo et al.,



1996). Un biomarcador de efecto ideal sería aquel capaz de cuantificar de forma adecuada y temprana manifestaciones potencialmente reversible.

1.6.2.1 MARCADORES DE EFECTO DE RESPUESTA INICIAL

Son biomarcadores que pueden identificar cambios precoces tras la exposición a sílice. Asociados con una alteración funcional podrían correlacionarse con la exposición antes que con la presencia de silicosis.

MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO.

Los radicales libres generados, bien por la actividad de superficie de la sílice cristalina, bien por la respuesta inflamatoria involucrada y el consiguiente stress oxidativo. Tienen una importancia primordial en el esclarecimiento de los procesos que preceden a la silicosis (Ghio et al., 1990; Porter et al., 2001; Shi et al., 1998; Vallyathan et al., 1998). Existen trabajos en autopsias de sujetos expuestos que



han demostrado la existencia de radicales libres en el tejido pulmonar de mineros de carbón (Dalal et al., 1991). Otros grupos, han demostrado además aumento en la generación de radicales libres en células de BAL (Kuempel et al., 2003; Wallaert et al., 1990). De hecho, los macrófagos alveolares aislados en BAL de individuos expuestos a sílice con compromiso respiratorio asociado se ha demostrado que liberan cantidades de radicales de anión superóxido y peróxido de hidrógeno en cantidad significativamente mayor que aquellos individuos no expuestos (Casanova et al., 1996). Como resultado, se han postulado como posibles biomarcadores, diversos factores de transcripción sensibles a reacciones redox y receptores (p. ej: NF- κ B, EGF-R) (Hubbard et al., 2002), que “conectan” el stress oxidativo con la cadena de eventos subsiguiente, como la producción de citoquinas e inflamación (Rom et al., 1987), peroxidación lipídica y daño en el DNA (Bezrukavnikova et al., 1988; Daniel et al., 1993; Jaite et al., 1988; Knaapen et al., 2004; Shi et al., 1995), producción de óxido nítrico (Blackford et al., 1997; Huffman et al., 1998), proliferación celular y depósito de colágeno (Benson et al., 1986; Friemann et al., 1999; Reiser et al., 1983).



Un elevado número de oxidantes, antioxidantes y enzimas antioxidantes han sido analizados en células sanguíneas, suero, fluido del BAL y células de BAL para determinar el grado de stress oxidativo secundario a la exposición a sílice cristalina o a la aparición de silicosis.

Una de las muestras biológicas usadas para la validación de estudios en humanos ha sido el fluido del BAL. Los macrófagos alveolares aislados del BAL de individuos expuestos a sílice cristalina con afectación respiratoria, liberaban mayores cantidades de radicales aniones superóxido y peróxido de hidrógeno comparados con las células de individuos no expuestos (Rom, 1991; Wallaert et al., 1.990). La producción de ROS por células alveolares inflamatorias aisladas del BAL de pacientes con FMP fue mayor que la de pacientes con neumoconiosis simple (Wallaert et al., 1990). La actividad de diferentes enzimas antioxidantes como Glutation peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD) así como la peroxidación de lípidos medido por los niveles de isoprostano, estaban incrementados en la fracción acelular de mineros de carbón con neumoconiosis comparados con los de aquellos sin ella (Vallyathan et al., 2.000). Los resultados de la actividad SOD en el



fluído del BAL se confirmaron en otro estudio similar y se encontró que el nivel de actividad enzimática se correlacionaba linealmente con la exposición pulmonar a cuarzo (Kuempel et al., 2003).

Los estudios más importantes de validación de biomarcadores de stress oxidativo, sin embargo, utilizaban sangre periférica. Un trabajo en 19 pacientes con silicosis y 48 sujetos control, indicó un aumento en los niveles de GSH sin incremento significativo en la actividad de GPX y SOD o en la peroxidación de lípidos en lisado de células rojas comparado con sujetos control (Borm et al., 1986). En contraste, los niveles de GSH estaban disminuídos junto con el glutatión-S-transferasa en las células rojas de mineros de carbón con estadíos iniciales de neumoconiosis (Evelo et al., 1993). El descenso en los niveles de GSH en sangre en estadíos iniciales de neumoconiosis se encontró también en otro trabajo que, sin embargo, encontró altos niveles de actividad enzimática antioxidante GPx sin cambios en actividad SOD (Engelen et al., 1990).

La actividad SOD en lisado de células de sangre roja estaba incrementado en pacientes con actividad subterránea comparado con los mineros de superficie. Se concluyó que la actividad SOD



eritrocitaria Cu^{++}/Zn^{++} podría ser un marcador de efecto de polvo de carbón respirable en trabajadores expuestos. En el mismo estudio, los niveles de actividad GPx estaban más elevados en mineros jubilados con neumoconiosis comparado con la de mineros sin ella. No se encontró diferencia en el nivel de antioxidantes séricos entre ambos grupos (Perrin-Nadif et al., 1996). De forma similar, cuando el contenido antioxidante se midió por TRAP assay, no se encontraron tampoco diferencias entre mineros expuestos o no expuestos. Sin embargo, existía un incremento significativo en los casos nuevos de neumoconiosis de mineros de carbón y había una relación inversa entre el contenido de glutatión (GSH) y el estadio de neumoconiosis. Estos resultados llevaron a la conclusión de que durante los estadios tempranos de neumoconiosis, existe un stress oxidativo en el pulmón que se refleja por cambios en la concentración de antioxidantes y enzimas antioxidantes en sangre periférica, reflejando exposición al polvo en diferentes estadios de neumoconiosis (Schins et al., 1994).

Estudios posteriores no pudieron confirmar estas diferencias (Perrin-Nadif et al., 1998). Sin embargo, el mismo grupo, en un estudio más detallado, mostró una correlación negativa entre



exposición acumulada a polvo inorgánico y la actividad superóxido dismutasa (SOD) eritrocitaria, y una correlación positiva con la actividad de catalasa eritrocitaria únicamente en trabajadores con exposición reciente. También se notificó una correlación entre la actividad de catalasa y la gravedad de la neumoconiosis, confirmando la premisa de que la producción de ROS puede ser un factor clave en la exposición a polvo de carbón y la gravedad de la neumoconiosis (Nadif et al., 1998).

SELENIO

La selenoproteína-P es una proteína suministradora de selenio (Se). El selenio es un micronutriente antioxidante considerado vital para la salud humana. Se considera un factor protector de cáncer de pulmón en pacientes con concentraciones bajas, aunque incrementa el riesgo de cáncer en pacientes con niveles elevados. Se han realizado estudios en el plasma de pacientes expuestos a polvo de carbón y no expuestos, así como entre pacientes con silicosis y controles sanos (Oryszczyn et al., 1996). Así, por ejemplo, se ha encontrado disminución de los niveles de Se en plasma de



trabajadores expuestos a carbón durante un largo periodo de tiempo comparado con aquellos con exposición a largo plazo, pero sin exposición activa. La baja concentración de Se en plasma se confirmó posteriormente y se demostró correlación con baja actividad GPx en plasma en mineros en activo con exposición elevada. Se concluyó que la variación en la concentración de Se en relación a los cambios en exposición ocupacional a polvo de carbón reflejaban el papel protector contra ROS generados por exposición a polvo de carbón (Nadif et al., 2001). En otro estudio (Muzemboa et al) entre 78 pacientes con silicosis y 20 controles sanos se determinaron en plasma los niveles de Se y Selenoproteína (SeP). Se observó que estaban reducido en pacientes con silicosis respecto a controles y que descendían de forma significativa con la gravedad de la enfermedad.

HEMO OXIGENASA-1

La hemooxigenasa 1 (HO-1) es una enzima que limita la velocidad de degradación en el metabolismo del hemo. Tiene efectos antioxidantes, antiapoptóticos y anti-inflamatorios.



La HO-1 se encontró en pulmones de ratones y humanos con silicosis, sobre todo en lugares de depósito de partículas de sílice. En ratones, se asoció con infiltración leucocitaria aguda, dando lugar al desarrollo de lesiones de silicosis en el pulmón. La inflamación se suprimió mediante tratamiento con hemin, un inductor de HO-1 y se incrementó con protoporfirina de zinc, un inhibidor de HO-1. La expresión pulmonar de HO-1 se incrementa en silicosis. HO-1 suprime la actividad de los radicales libres y los cambios patológicos subsecuentes, atenuando por tanto la progresión de la enfermedad. Otro estudio, demostró que HO-1 se expresa de manera constante en las lesiones pulmonares de pacientes con silicosis, lo que refleja la inducción de radicales libres por la silicosis, dando lugar a la elevación de los niveles de HO-1 en suero. El incremento de HO-1 puede tener un papel protector suprimiendo la actividad inductora de radicales libres de la sílice y quizás podría tener un papel en el tratamiento de la silicosis.

Puede ser problemático cuantificar la producción de ROS por macrófagos alveolares debido a los problemas logísticos involucrados en su disponibilidad, sin embargo, pueden ser sustituidos por la cuantificación de ROS por leucocitos



polimorfonucleares aislados de sujetos expuestos a sílice. Otra dificultad añadida es que los mismos biomarcadores de stress oxidativo pueden encontrarse elevados por otras partículas minerales distintas de la sílice y por tanto carecer de especificidad. Sin embargo, esto puede ser obviado por el hecho de que el nivel, sino el tipo, de alguno de estos parámetros en sangre periférica puede ser un factor diferenciador en diferentes tipos de partículas minerales.

NEOPTERINA

La neopterina, el 6-d-eritro-trihidroxipropil-pteridina y su forma dihidroforma reducida, la 7,8-dihidro-neopterina, se producen en monocitos y macrófagos bajo el estímulo del interferón-gamma (Murr et al., 1994, 1996). Existe controversia en la literatura sobre el papel jugado por neopterinas como antioxidantes o pro-oxidantes (Giese et al., 2001; Widner et al., 2000; Wirleitner et al., 1993), pero parece que el pH, la presencia de hierro quelado y el tipo de ROS puede determinar sus características pro-oxidantes o antioxidantes (Oettl et al., 1999; Wede et al., 1999; Weiss et al.,



1993). La neopterinina es considerado un biomarcador precoz de la respuesta inmune celular. Pertenece a la clase de pteridina y es un metabolito de trifosfato de guanosina, que es producida por los macrófagos activados y células dendríticas después de la estimulación con interferón gamma. Se ha relacionado con la capacidad de las células de segregar metabolitos tóxicos, especialmente ROS y por tanto, un incremento en su concentración en fluidos corporales podría ser una estimación indirecta del stress oxidativo mediado por células. Así, en las células de músculo liso de rata, la neopterinina estimula las cascadas de transducción de señales intracelulares sensibles a redox, bien activando la expresión génica a nivel del ácido ribonucleico mensajero de NOS inducible (iNOS) con el consiguiente aumento en el óxido nítrico (NO). En las células del músculo liso vascular del músculo y las células Jurkat, activa el factor nuclear de transcripción (NF)-kB. Se ha demostrado que induce la muerte celular programada mediada por ROS en células alveolares y en líneas celulares linfoblásticas T.

Varios estudios han mostrado que en enfermedades relacionadas con la inmunidad tales como artritis reumatoide o



cánceres, la neopterinina se eleva y puede ser un biomarcador valioso en el diagnóstico clínico de progresión de la enfermedad.

En un estudio de 22 trabajadores expuestos a sílice y 20 voluntarios sanos, se midieron niveles de neopterinina y se demostró un incremento en población expuesta (Altindag et al., 2003). Se postuló que la neopterinina podría ser un marcador temprano y útil en la predicción de patología relacionada con la exposición a sílice cristalina.

NIVELES DE PROTEÍNA 16 DE CÉLULAS DE CLARA EN SUERO

La proteína-16 de las células de clara (CC16) es un homodímero que consiste en 70 subunidades ácidas y tiene un peso molecular de 15,840 KD.

La proteína CC16 se secreta casi exclusivamente por células no ciliadas del epitelio traqueobronquial (células de clara), con una síntesis muy escasa en algunos órganos del sistema reproductivo tales como la próstata (Peri et al., 1993). El papel fisiológico de la



proteína CC16 sigue siendo desconocido, pero existen datos que sugieren que es una proteína antiinflamatoria e inmunosupresora que protege a la vía aérea de de la activación injustificada del sistema inmune que podría producir daño tisular (Doyle et al., 1998). Dado que la CC16 se secreta en el tracto respiratorio, podría pasar difusamente la barrera sangre-broncoalveolar hacia el plasma (Hermans et al., 2001). Se ha sugerido que la concentración de esta proteína en plasma podría ser una medida de la integridad de las células de clara y servir como biomarcador específico de daño pulmonar. Niveles disminuídos de CC16 han estado también asociados al incremento del reclutamiento de fibroblastos en patología fibrosante pulmonar (Lesur et al., 1995).

En los estudios realizados, se ha demostrado que la concentración de CC16 en suero de trabajadores expuestos a sílice cristalina era menor que la existente en controles sin cambios en síntomas respiratorios o en test de función pulmonar (Bernard y Hermans, 1997; Bernard et al., 1994; Doyle et al., 1998). Se ha sugerido que una reducción significativa de CC16 en el suero de trabajadores expuestos a la inhalación de sílice podría utilizarse como biomarcador de toxicidad temprana y por tanto, mejorar la



detección de grupos de riesgo. Un mecanismo plausible a través del cual la sílice podría alterar la concentración de CC16 podría ser la disminución de la secreción de esta proteína en el tracto respiratorio debido al daño pulmonar inducido, dando lugar a una disminución de los niveles de la misma en el suero. Sin embargo, no se ha podido confirmar tal afirmación, ni tampoco la correlación con la hiperplasia de células de clara.

No obstante, La proteína CC16 podría ser un biomarcador aceptable de exposición, especialmente si su descenso se asocia con exposición más que con daño pulmonar establecido.

1.6.2.2 MARCADORES DE EFECTO DE RESPUESTA TARDÍA

ENZIMAS LISOSÓMICOS Y CITOSÓLICOS

El daño de las membranas celulares ó en las diferentes organelas de la célula por sílice podría ser un mecanismo de inicio de inflamación. Tal daño celular liberaría enzimas específicos de



estos compartimentos celulares en el espacio extracelular. La cuantificación de los mismos podría dar lugar a una medida del daño celular. Por ejemplo, el incremento en la actividad de enzimas lisosómicos b-N-acetilglucosaminidasa y b-glucuronidasa se usan como indicadores de daño lisosómico y el incremento en la actividad de LDH y en la fosfatasa alcalina pueden utilizarse como indicadores del daño de membrana por la sílice (Dethloff et al., 1986; Kim et al., 1999^a; Wallace et al., 1985; Zhang et al., 1999).

De la misma forma, la actividad de b-glucuronidasa, se encontró incrementada en la fracción lisosomal de homogeneizados pulmonares de pulmones de animales expuestos a sílice (Jajte et al., 1988). Además, el nivel de actividad de esta enzima y de la enzima lisosomal B-N-acetilglucosaminidasa y LDH se encontraron incrementados en lavado alveolar de ratas tras exposición a sílice (DiMatteo et al., 1996; Driscoll et al., 1990b; Johnston et al., 2.000; Knaapen et al., 2.002; Lindenschmidt et al., 1990; Vallyathan et al., 1995; Zhang et al., 1996) y en macrófagos alveolares de cobayas tras inflamación en estadios más avanzados de exposición a sílice. Esta inflamación continuó incrementándose incluso tras el cese de la exposición, con incremento simultaneo en la actividad de estos



enzimas (Sjostrand y Rylander, 1984; 1987). El incremento en la actividad de LDH y fosfatasa alcalina se ha demostrado también en BAL de trabajadores expuestos a sílice (Larivee et al., 1990). Este incremento se correlacionó con la gravedad de la enfermedad. De la misma forma, un incremento en la proporción de actividad de fosfatasa alcalina en el BAL respecto a la concentración de albúmina se consideró como un reflejo de la progresión de fibrosis (Capelli et al., 1997b).

La actividad de los mencionados enzimas en suero de ratas expuestas y trabajadores ha sido también constatada. Las ratas que inhalaban altas concentraciones de polvo de carbón mostraban incremento de actividad de LDH en BAL (Donaldson et al., 1990) así como en suero y existían cambios en su patrón de isoenzima hacia un nivel más alto de LDH3 en trabajadores de carbón incluso tras un tiempo significativo de cese de exposición (Cobben et al., 1997). La actividad sérica de dos enzimas lisosomales, la b-N-acetilglucosaminidasa y la b-glucuronidasa, se demostró también en pacientes con silicosis. La actividad de la primera de las enzimas (aunque no de la última), fue mayor en pacientes con enfermedad



que en pacientes expuestos sin sintomatología clínica (Koskinen et al., 1983a, 1984a, 1984b).

El mayor problema de estas enzimas es la falta de especificidad y de niveles de actividad en suero. Podrían ser medidos de forma concomitante con otros biomarcadores, a menos que el isoenzima específico sea medido en BAL (Capelli et al., 1997a; Cobben et al., 1997).

ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA (ECA)

ECA es una hidrolasa peptidildipéptido en el sistema renina-angiotensina que convierte la angiotensina-I en un potente vasopresor como es la angiotensina-II e inactiva la bradiquinina vasodilatadora que es el producto del sistema enzimático kalicreína-quinina. La ECA se localiza fundamentalmente en la superficie luminal de las células endoteliales vasculares (Beldent et al., 1995), pero está también presente en células monocíticas y macrofágicas (Eklund et al., 1987). En la fibrosis pulmonar inducida por polvos inorgánicos, tanto las células endoteliales como los macrófagos han sido consideradas como la fuente de niveles elevados de ECA



(Brown et al., 1983; Gronhagen-Riska, 1979, Gronhagen-Riska et al., 1978; Nordman et al., 1984; Thompson et al., 1991; Zhicheng et al., 1986. El incremento en la actividad de ECA en el BAL y en suero se consideró un marcador de daño pulmonar en un número de enfermedades pulmonares porque su concentración, especialmente en BAL, es únicamente una pequeña fracción de la actividad total de ECA en el cuerpo (Beneteau-Burnat y Baudin, 1991; Henderson, 1984; Orfanos et al., 2000; Rohatgi, 1982; Studdy et al., 1983).

Se han realizado numerosos estudios para valorar la actividad de ECA en animales de experimentación que demostraban un incremento de ECA en suero en animales con silicosis. Sin embargo, no ha habido resultados concluyentes para recomendarlo como un marcador de daño pulmonar en la exposición a sílice (Lin, 1990; Brown et al., 1983).

Los estudios en humanos han dado lugar también a resultados contradictorios. El incremento en la actividad sérica de ECA se ha demostrado en pacientes con silicosis comparado con controles, pero esta actividad no reflejaba la gravedad de la enfermedad determinada por Rx de tórax ni pruebas de función pulmonar ni



tampoco aportaba información sobre la progresión de la enfermedad (Bucca et al., 1984; Gronhagen-Riska, 1979). Otros estudios han confirmado una elevación en la actividad sérica de ECA en pacientes con silicosis pero, al contrario que en estudios previos, encontraron una asociación entre la actividad sérica de ECA y la gravedad radiológica de la fibrosis (Nordman et al., 1984); Serbescu y Paunescu, 1992; Yano et al., 1987). Los niveles elevados de ECA en pacientes con sílice en estos estudios, no han podido ser confirmados por otro estudio (Romano et al., 1985). Tampoco en un estudio más reciente se pudo observar ningún tipo de asociación entre la actividad de la ECA, la edad, género, exposición, tabaquismo ó función pulmonar (Tiwari RR et al., 2010). En cualquier caso, la ausencia de una especificidad adecuada y el hecho de que no existen datos fiables que permitan distinguir si la actividad de la ECA puede ser una manifestación de una progresión de la enfermedad o bien, la expresión de la exposición en pacientes con neumoconiosis, no permite, a día de hoy, considerarlo como un biomarcador fiable.



MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y FIBROSIS

La respuesta inflamatoria a la sílice se manifiesta en un número incrementado de macrófagos, neutrófilos y linfocitos (Begin et al., 1987; Davis et al., 2001; Donaldson et al., 1992; Driscoll, 2000; Driscoll et al., 1995, 1997; Rom et al., 1987; Sjostrand et al., 1991). Desde que en los trabajos de Heppleston y Styles (1967) se demostró que los macrófagos alveolares (AM) expuestos a sílice cristalina producen factores que estimulan la producción de colágeno por los fibroblastos, el interés por las citoquinas y los factores de crecimiento ha aumentado exponencialmente, de hecho, varias citoquinas podrían convertirse en marcadores de gran interés en la fibrosis inducida por partículas inorgánicas (Gauldie et al., 1993; Jordana et al., 1993; Kelly et al., 2003; Lugano et al., 1984).

Citoquinas

El Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), los receptores de TNF- α (TNF- α R) y IL-1 (α and β) son citoquinas relacionadas que



comparten ciertos efectos sinérgicos en inflamación e inmunología. IL-1 y TNF- α se producen por macrófagos activados y tienen un amplio espectro de acciones biológicas en dianas celulares inmunes y no inmunes. El TNF- β es producido por células T activadas que se unen al mismo receptor del TNF- α en células diana.

TNF- α : es una citoquina proinflamatoria. Importante en la cascada inicial de la inflamación así como en el desarrollo y progresión de varias enfermedades incluyendo la fibrosis pulmonar. El TNF- α puede ser producido por distintos tipos de células incluyendo macrófagos, monocitos y células polimorfonucleares (Dubravec et al., 1990; Rich et al., 1989). Esta citoquina interacciona con dos receptores asociados de la membrana celular para ampliar su efecto (Bazzoni y Beutler, 1996; Smith y Baglioni, 1997), incluyendo el reclutamiento de células inflamatorias y la estimulación de citoquinas como la interleuquina 1 (IL-1), quimiocinas tales como la IL-8 y la IL-6 y el factor estimulante e crecimiento beta (TGF- β) (Kunkel et al., 1990). A cambio, la secreción de TNF- α se modula por TGF- β (Chantry et al., 1989).



Un posible papel del TNF- α en la fibrosis inducida por sílice cristalina ha sido sugerido por estudios in vivo con macrófagos alveolares (Arcangeli et al., 2001; Dubois et al., 1989; Gosset et al., 1991), donde esta habilidad in vitro parece corresponderse in vivo con actividad inflamatoria de la sílice cristalina (Driscoll y Maurer, 1991).

IL-1: existe en diferentes variantes bioquímicas denominadas (IL-1 α y IL-1 β) (Cameron et al., 1986), donde ambas parecen tener el mismo espectro de actividades biológicas y son reconocidas de igual forma por receptores IL-1 (Dinarello, 1988; Kilian et al., 1986). La IL-1 es producida por distintos tipos celulares, incluyendo mononucleares, polimorfonucleares y fibroblastos (Akahoshi et al., 1988; Gery et al., 1981; Tiku et al., 1986). Se ha comprobado que desempeñan un papel fundamental en el proceso de fibrosis pulmonar (Kolb et al., 2001).

Muchos experimentos in vitro llevados a cabo con macrófagos alveolares y peritoneales tanto en modelos humanos como animales así como en células monocíticas de sangre periférica han demostrado que la estimulación de estas células por sílice cristalina



libera TNF- α e IL-1 (Bissonnette y Rola-Pleszczynski, 1989; Dubois et al., 1989; Gery et al., 1981; Gosset et al., 1991; Kampschmidt et al., 1986; Kang et al., 1992; Lassale et al., 1989; Lee et al., 1995; Lemaire y Ouellet, 1996; Lepe-Zuniga y Gery, 1984; Mohr et al., 1991; Oghiso y Kubota, 1987; Orfila et al., 1998; Savici et al., 1994; Schmidt et al., 1984; Seiler et al., 2001) a través de la sobreexpresión del promotor de TNF (Savici et al., 1994). Determinadas investigaciones en animales de experimentación se han concentrado en la citoquina TNF- α , que se ha demostrado que desempeña un papel clave en la fibrosis inducida por partículas y más específicamente en la fibrosis inducida por cuarzo (Piguet et al., 1990). De hecho, Determinados experimentos han demostrado que la sílicosis podría ser aminorada utilizando anticuerpos anti-TNF y que la administración de receptores solubles TNF que unen TNF libre, podrían prevenir e incluso reducir la fibrosis existente (Piguet, 1990; Piguet et al., 1990). Estos experimentos animales y muchos otros (Driscoll et al., 1993, 1995; Sime et al., 1998) han demostrado la importancia del TNF en la red de citokinas dando lugar a inflamación, remodelado y síntesis de colágeno intersticial (Ortiz et al., 2001).



Así, se han demostrado niveles elevados de IL-1, TNF- α , TNF- α R en células del BAL en diversas enfermedades inflamatorias pulmonares, existiendo por ejemplo un número más elevado de estas citoquinas en BAL de pacientes con neumoconiosis respecto a controles, con niveles más bajos de TNF- α en trabajadores asintomáticos (Lassale et al., 1989; Vallyathan et al., 2000; Vanhee et al., 1995a, 1995b). No obstante, no se objetivó la existencia de cambios en IL-1 a pesar de la existencia de cristales de sílice en macrófagos del BAL, posiblemente por la ausencia de enfermedad (Weber et al., 1996).

En otros estudios, la liberación de TNF- α se correlacionó con la exposición a polvo inorgánico así como con la presencia de enfermedad y las alteraciones clínico-radiológicas (Kim et al., 1999b; Lim, 1998; Porcher et al., 1994). También existen estudios en los que la liberación de TNF- α en monocitos de sangre periférica podría discriminar entre mineros de carbón con enfermedad (Borm et al., 1988; Jorna et al., 1994). El trabajo epidemiológico de Borm et al, con un periodo de seguimiento de 5 años, mostró además la estabilidad de este marcador a lo largo del tiempo y el valor predictivo de la liberación anómala de TNF- α a lo largo de 5 años



de progresión de la enfermedad (Borm et al., 1988; Schins y Borm, 1995a, 1995b).

El TNF- α sérico y los receptores solubles de TNF- α : también se han documentado como biomarcadores de neumoconiosis. Ciertos resultados sugieren que los niveles de receptores TNF en suero se asociaron con el proceso fibrótico y que el nivel de citoquinas séricas puede correlacionarse con la gravedad de la enfermedad. El más reciente de ellos es el de Jiang et al. (Jiang PR et al.; 2015) donde se objetivó elevación de niveles de TNF- α y MMP-9 en pacientes expuestos a sílice vs controles

Estos últimos estudios, sin embargo, han aportado poco valor respecto a la liberación de TNF excepto quizás como un potencial modificador de TNF- α libre.

Existe suficiente cantidad de literatura tanto en experimentos animales in vitro e in vivo así como estudios epidemiológicos en humanos como para validar las citoquinas inflamatorias (especialmente TNF- α e IL-a) como biomarcadores adecuados de



exposición a sílice o polvo de carbón o para predecir la progresión de la enfermedad. Los estudios de TNF como biomarcador en neumoconiosis ó en cohortes de mineros de carbón (Schins y Borm, 1995b; Morfeld et al., 2001, Porcher et al., 1993) han confirmado la validez del TNF derivado de monocitos como marcador de neumoconiosis y más específicamente en FMP. Schins et al desarrollaron un método para la cuantificación en sangre periférica que es mucho más fácil de aplicar que utilizando monocitos y que da lugar a resultados similares (Morfeld et al., 2001). En este sistema de análisis, sin embargo, a la vez que, en monocitos aislados, el tiempo de incubación, si bien es óptimo para TNF puede no serlo para otras citoquinas. Y la cuantificación y comparación entre diferentes citoquinas debe realizarse en un momento óptimo. La relativa facilidad con la que pueden realizarse estas mediciones (Schins et al., 1996) hace que estos puedan considerarse, en el momento actual, como biomarcadores ideales de exposición a sílice y polvo de carbón en silicosis y otras neumoconiosis.



Quimiocina IL-8 y citoquina IL6: Las quimiocinas se segregan por diferentes tipos de células en respuesta a la IL-1 y TNF- α (Larsen et al., 1989; Nakamura et al., 1991; Rolfe et al., 1991; Standiford et al., 1991; Strieter et al., 1990) y son unos potentes factores reclutadores de neutrófilos (Standiford et al., 1991). La IL-6 se produce también por muchos tipos de células, incluyendo monocitos y fibroblastos (Kotloff et al., 1990; May et al., 1988, 1989; Zitnik et al., 1993). La IL-6 tiene diferentes pesos moleculares con funciones reguladoras a nivel de los linfocitos B y T así como en respuestas de fase aguda (Ray et al., 1989; Van Dijk y Mackiewicz, 1995). Al igual que la IL-8, diversas citoquinas incluyendo IL-1 y TNF- α , sabemos que estimulan la liberación de IL-6 (Ray et al., 1989). Además, existen estudios encaminados a investigar la secreción de IL-8 e IL-6 en exposición a sílice.

La IL-8, se ha demostrado que juega un papel importante en la inflamación producida por sílice. La expresión de esta quimiocina se ha confirmado en células de BAL aisladas en reatas expuestas a cuarzo que producían inflamación; pero en el BAL de células con la misma exposición, pero “detoxificadas” con aluminio para disminuir el efecto inflamatorio (Duffin et al., 2001). Tanto el TNF- α como IL-



8 estaban elevados en el sobrenadante de monocitos estimulados con polvo inorgánico aislados en sangre periférica y suero de mineros con neumoconiosis (Kim et al., 199b; Morfeld et al., 2001). El incremento de IL-8 en cultivo de células de epitelio pulmonar humano tras la exposición a cuarzo se ha demostrado por la sobreexpresión persistente del gen de expresión de IL-8 junto con la activación del NF-kappa B así como depleción de I-kappa y B-alfa (Desaki et al., 2000; Schins et al., 2000). De la misma forma, el incremento concomitante de TNF-a e IL-6 se ha demostrado en macrófagos tras exposición a polvo de carbón y sílice (Gosset et al., 1991). Tras la estimulación con TNF-a, también se ha objetivado una elevación de IL-6 en fibroblastos pulmonares aislados en pacientes con silicosis (Arcangeli et al., 2001). El contenido de IL-6 en BAL se incrementó también en pacientes con neumoconiosis comparados con controles (Lesuer et al., 1994). Los niveles de esta monoquina junto con TNF- α estaban también incrementados en el sobrenadante de macrófagos alveolares aislados en pacientes con neumoconiosis, así como en muestras de biopsia pulmonar, donde el mRNA de IL-6 se encontraba limitado a macrófagos pulmonares y asociado con la presencia de polvo de carbón (Vanhee et al.,



1995b). El incremento de IL-6 junto con TNF- α y IL-1 se confirmó también en flúidos de BAL de pacientes con neumoconiosis y se correlacionó con la progresión de la enfermedad (Vallyathan et al., 2000). Los niveles séricos de esta monokina en pacientes con neumoconiosis se correlacionaban también junto con los receptores TNF con la gravedad de la neumoconiosis (Zhai et al., 2002a).

A pesar de la evidencia obtenida en estudios in vitro sobre el incremento de la producción de IL- β y IL-6 tras la exposición a sílice ó polvo de carbón en macrófagos y fibroblastos, sólo existen un pequeño número de estudios validados en humanos en la literatura. Los niveles elevados de estas quimiocinas en fluído de BAL de pacientes con neumoconiosis así como la correlación positiva entre los niveles séricos de IL-8 y la afectación respiratoria en un único estudio en humanos, hacen a estas citoquinas biomarcadores potencialmente útiles en silicosis como marcadores añadidos de inflamación, especialmente cuando se miden de forma concomitante con TNF- α y IL-1.



Otros factores quimiotácticos de neutrófilos y monocitos: Proteínas inflamatorias de macrófago (MIPs), factores quimotácticos inducidos por citoquinas de neutrófilos (CINCs), Proteína quimiotáctica de monocitos y metabolitos del ácido araquidónico: Dado que la inflamación y el reclutamiento de células inflamatorias juega un papel importante en la fibrosis producida por partículas, se han investigado las quimiocinas y otras macromoléculas biológicas que pueden afectar o controlar este proceso.

Las proteínas inflamatorias de los macrófagos 1a y -b (MIP-1a y b) son importantes quimiocinas en el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón y pueden contribuir a la patogénesis de las enfermedades pulmonares inflamatorias (Driscoll 1994; Driscoll et al., 1993, 1996). Se ha documentado su inducción en macrófagos alveolares, células epiteliales pulmonares y en fluido de BAL de animales tras exposición a sílice cristalina (Driscoll, 2000; Driscoll et al., 1996, 2001; Yuen et al., 1996).

Los factores quimiotácticos inducidos por citoquinas de los neutrófilos (CINCs) y sus 4 subtipos: CINC-a, CINC-2a, CINC-2b y CINC-3 (de los cuales la isoforma CINC-1 es la más importante),



pertenecen a la familia de IL-8. En silicosis experimental, se objetivó la presencia de CINC-2a, CINC-2-b y CINC-3, mientras que CINC-1 no se detectó. Esto sugiere la importancia de las tres primeras isoformas como factores quimiotácticos y en la formación de granulomas en la inflamación crónica en silicosis pulmonar (Hata et al., 2003).

Los eicosanoides, son también moléculas quimiotácticas (Snyderman y Goetzl, 1981). En respuesta a exposición in vitro a cuarzo recién fracturado, los niveles de leucotrieno B4 (LT B4), tromboxano A2 (TX A2) y prostaglandina E2 (PG E2) se incrementaron en macrófagos humanos (Kuhn y Demers, 1992). La exposición in vivo a sílice incrementó la producción de PGE2 en macrófagos alveolares de animales expuestos (Henderson et al., 1991; Mohr et al., 1992). También se ha demostrado la producción de factor activador de las plaquetas por macrófagos alveolares de rata en respuesta a sílice cristalina y polvo de carbón (Lapp y Castranova, 1993).

También ha sido investigado el papel de las moléculas de adhesión intrcelulares tipo I (ICAM-1) en el reclutamiento de leucocitos y la adhesión a células endoteliales tras exposición a



sílice (Anderegg et al., 1997). La administración intratraqueal de cristales de sílice incrementó los niveles de ICAM-1 en tejido pulmonar y fluido de BAL con flujo concomitante de neutrófilos al pulmón (Nario y Hubbard, 1996).

Un incremento similar de la expresión de ICAM-1 se ha demostrado en pulmones de mineros de carbón, especialmente en células endoteliales del epitelio bronquial y alveolar, con un incremento simultáneo de su producto de liberación soluble, SICAM-1, en el fluido de lavado de los pulmones de mineros (Vanhee et al., 1996).

Se ha estudiado también la MCP-1 como factor quimiotáctico de monocitos, encontrándose en fluido de BAL y sobrenadante de macrófagos alveolares aislados en fluido de BAL y neumocitos tipo II de pacientes con neumoconiosis (Boitelle et al., 1997).

La importancia de todos estos factores quimiotácticos en la perpetuación de la inflamación por sílice se ha demostrado en estudios utilizando BAL de pacientes y células pulmonares in vitro. Sin embargo, el limitado número de estudios y la falta de validación de los mismos, así como las dificultades asociadas a la obtención



de muestras biológicas limita la aplicación de los mismos como potenciales biomarcadores en estudios rutinarios.

Citoquinas antiinflamatorias: interleucina-10 (IL-10): La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria producida por diferentes tipos celulares, incluyendo monocitos y macrófagos. Tiene diversas funciones, incluyendo la reducción del reclutamiento celular de células inflamatorias en el pulmón y la reducción concomitante de citoquinas antiinflamatorias como el TNF- α , MIP-1 y MIP-2 (Greenberger et al., 1995), con el consiguiente control de la inflamación asociada a la fibrosis pulmonar (Kovacs y DiPietro, 1994).

Únicamente se han realizado dos estudios animales confirmando el incremento de IL-10 en células de BAL y en tejido pulmonar tras exposición a sílice cristalina (Driscoll et al., 1998; Huaux et al., 1988). Este incremento se acompañó de un descenso de citoquinas inflamatorias y de inflamación, pero de una actividad fibrótica más elevada (Huaux et al., 1998).



Aunque la IL-10 es un importante biomarcador en el control de la inflamación y la fibrosis, la escasez de estudios realizados, así como las dificultades para la obtención de muestras biológicas para determinar sus niveles, no lo convierten, en el momento actual, en un biomarcador útil.

Linfoquinas: interferón-gamma (IFN- γ) e Interleucina-4 (IL-4):

El interferón-g es una linfoquina con una gran variedad de funciones biológicas incluyendo su efecto antifibrótico. Aunque se produce fundamentalmente por linfocitos TH1, su producción es inducida también desde AM por IL-12 y IL-18 (Keane et al., 2001; Munder et al., 1998). Se ha hipotetizado que estas dos interleuquinas son producidas inicialmente por macrófagos estimulados por sílice que atraen y activan linfocitos para producir IFN-g (Davis et al., 2001). El IL-4, en cambio es producido por linfocitos TH2 y su incremento se asocia con fibrosis pulmonar (Huax et al., 2003).



En modelos animales se ha demostrado una tendencia a la elevación de células TH1 que expresan IFN- γ en nódulos linfáticos torácicos de animales con silicosis así como en linfocitos pulmonares (Gran et al., 1997, 2000). La delección de estos genes protegía a los animales contra la fibrosis por sílice (Davis et al., 1999, 2000). Se ha realizado un único estudio en humanos que demostró niveles disminuidos de IFN- γ en BAL de pacientes con neumoconiosis (Lesur et al., 1994).

En el momento actual, existen pocos datos disponibles sobre el papel del IFN-g y la IL-4 en la inflamación y fibrosis, con resultados a veces contradictorios sobre los efectos profibróticos o antifibróticos del IFN- γ , por lo que, en el momento actual, no se puede considerar un biomarcador útil en neumoconiosis.

Factores de crecimiento: factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor tipo de crecimiento insulín-like (IGF-I), factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor transformador de crecimiento (TGF): Los factores de crecimiento son moléculas



polipeptídicas de bajo peso molecular que pueden actuar sobre una diversidad de tipos celulares y alterar sus propiedades proliferativas y/o secretoras (Patt y Houck, 1983; Sime et al., 1998). Se han involucrado en enfermedades fibróticas pulmonares. Incluyen TGF, PDGF, bFGF, IGF-I y EGF (Gauldie et al., 1993; Kelley, 1990; Krein y Winston, 2002; LeRoy et al., 1990).

Para determinar los niveles de los citados factores de crecimiento se han utilizado muestras biológicas tanto de animales de experimentación como en humanos, como por ejemplo el BAL. En un estudio de Hamada et al, se demostró en BAL la existencia de mastocitos en proporción más elevada que en controles. Dado que los mastocitos pueden producir β FGF, se ha hipotetizado que el citado factor de crecimiento podría jugar un papel importante en el desarrollo de silicosis (Hamada et al., 2000).

Se ha objetivado también la presencia de factor de crecimiento derivado de macrófagos alveolares (AMDGF) (Rom et al., 1987), del que se descubrió con posterioridad que tenía fundamentalmente actividad PDGF (Kumar et al., 1988; Shimokado et al., 1985) con efecto proliferativo en fibroblastos (Bauman et al., 1990). Otros



mediadores identificados en el sobrenadante de macrófagos alveolares aislados del BAL de pacientes con neumoconiosis incluyen IGF-1, PDGF, FGF, EGF y TGF- β (Abshe et al., 1993; Chen et al., 1994; Kumar et al., 1994; Lesur et al., 1992a; Melloni et al., 1994; Olbruck et al., 1998). Esta actividad incrementada podría observarse en estadios tempranos de la enfermedad (Gouping et al., 1997; Lesur et al., 1992a, 1992b; Melloni et al., 1994, 1996). El tratamiento de animales expuestos a sílice con anticuerpos anti-PDGF (Melloni et al., 1994, 1996; Ohta et al., 1997) y anti-bFGF (Liu et al., 1995b) disminuyó de forma significativa el desarrollo de inflamación pulmonar y fibrosis.

La liberación espontánea de TGF- β por macrófagos alveolares humanos, así como por el estímulo de polvo de carbón y sílice se ha confirmado en pacientes con neumoconiosis en el que existían unos niveles significativamente más elevados que los evidenciados en controles (Schins, 1996) del citado factor de crecimiento junto con un aumento también de PDGF e IGF así como TGF- β , donde niveles elevados se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad (Vanhee et al., 1994).



De la misma forma, se ha descrito un aumento de determinados factores de crecimiento en sangre periférica. No se encontró diferencias significativas entre pacientes expuestos y con neumoconiosis en los niveles de PDGF-AA (Kim et al., 1999b), aunque se objetivó una elevación de los niveles de PDGF en pacientes con silicosis avanzada. La correlación entre los niveles de PDGF y la progresión de la enfermedad indican que este factor de crecimiento puede ser un marcador fiable para monitorizar la gravedad de la silicosis y el curso evolutivo de la misma (Brandt-Rauf et al., 1992).

Por tanto, tanto el PDGF como el TGF- β podrían ser biomarcadores fiables, dado que su papel en la fibrosis se ha confirmado por diferentes estudios, que demostraron la presencia de TGF- β en cortes histológicos de nódulos silicóticos y en epitelio hiperplásico silicótico (Jagirdar et al., 1996; Williams et al., 1993; Williams y Saffiotti, 1995). El papel de estas dos citoquinas de factores de crecimiento es clave en la patogénesis molecular de otros tipos de fibrosis (Kelly et al., 2003; Zhang y Phan, 1996). Es más, TGF- β se ha sugerido que pueda tener un efecto antiinflamatorio y se han encontrado niveles disminuídos en



macrófagos alveolares de sujetos con FMP. Tanto el PDGF como TGF existen en diferentes isoformas con actividades muy variadas (Williams y Knapton, 1996; Zhuo et al., 2004). El TGF- β se activa en condiciones de acidez (Pellaud et al., 1999). Estos aspectos necesitan ser tenidos en cuenta cuando se usen estos factores de crecimiento como biomarcadores de exposición de sílice cristalina y silicosis.

Fibronectina: La fibronectina es uno de los componentes no colágenos de la matriz extracelular. Tiene diversas funciones (Limper y Roman, 1992; Yamada, 1989). Por ejemplo. Es un factor de crecimiento derivado de los macrófagos que estimula la proliferación de fibroblastos en el pulmón (Bitterman et al, 1983). actuando de forma sinérgica con la sílice cristalina para estimular la transcripción genética de colágeno en fibroblastos humanos 2BS (Liu et al., 1995a). Aunque se ha observado que las cifras de fibronectina estaban más elevadas en BAL de mineros de carbón (Lassale et al., 1989; Rom, 1991; Rom et al., 1987), no se elevó en sujetos asintomáticos (Vallyathan et al., 2000; Weber et al., 1996).



A nivel plasmático se ha objetivado un incremento en los niveles de trabajadores expuestos (Porcher et al., 1993) y en pacientes con enfermedad por polvos inorgánicos, lo que podría sugerir una predisposición aumentada a estas enfermedades (Zhestkov, 2000). No obstante, existen todavía pocos estudios y no existen una sensibilidad o especificidad adecuada como para sugerir la fibronectina como un biomarcador adecuado en silicosis ó exposición a sílice.

Antígeno Carbohidrato 19-9 (CA 19-9): El CA 19-9 es un antígeno de superficie de células cancerígenas que se encuentra elevado en el BAL de pacientes con diferentes enfermedades fibróticas pulmonares (Obayashi et al., 2000; Shimizu et al., 2002; Totani et al., 2001). Podría tener una actividad quimiotáctica de neutrófilos y considerarse un marcador de inflamación, o bien, tener un papel en el daño pulmonar de los pacientes con fibrosis pulmonar (Obayashi et al., 2000). Su elevación en el suero de pacientes con fibrosis se ha considerado un factor pronóstico negativo (Fujita et al., 1998).



Se ha postulado que la sílice cristalina podría estimular la hiperplasia e hipertrofia de las células pulmonares epiteliales, produciendo CA 19-9 elevando los niveles en suero.

Sin embargo, sólo se han realizado estudios de suero y autopsia de un único paciente de silicosis en el que parecía existir una correlación con la afectación pulmonar (Totani et al., 2000). No obstante, muchas exposiciones que producen stress oxidativo podrían inducir hiperplasia de células de tipo II e hipertrofia, por lo que la especificidad y sensibilidad del CA 19-9 está aún por determinar.

Elastina: La elastina es una molécula que mantiene la integridad pulmonar mediante la propiedad de conferir elasticidad a los vasos sanguíneos, vías aéreas y alveolos (Hausladen et al., 1998). Su precursor, la tropoelastina, se produce durante un corto periodo de tiempo en el desarrollo, pero no en animales adultos (Pierce et al., 1995). No obstante, en determinados modelos animales con fibrosis pulmonar, se ha observado un incremento de la producción de tropoelastina (Starcher et al., 1978).



Se ha realizado un único estudio de animales con inflamación granulomatosa por sílice, en el que se observó un aumento de la fracción madura insoluble de elastina. Sin embargo, la localización in situ de mRNA de tropoelastina reveló que la expresión de este gen se encontraba sobre todo en células intersticiales en poblaciones no proliferativas de células alfa actin-positivas de músculo liso y en el septo alveolar, así como en áreas no granulomatosas, pero no en células de lesiones granulomatosas (Mariani et al., 1995), lo que se ha atribuido al incremento de TNF- α en estas lesiones, que a cambio podrían haber modulado la expresión de tropoelastina (Mariani et al., 1999). La ausencia de TGF-b en septos alveolares se consideró como una indicación de que no es responsable de la producción incrementada de tropoelastina en pulmones con neumoconiosis (Mariani et al., 1999), a pesar de que es conocida su función como estimulador de la expresión de tropoelastina (McGowan, 1992b). Por otra parte, se ha observado un incremento en la elastina en el suero de trabajadores expuestos a polvo de carbón, aunque parece ser un indicador de un metabolismo alterado de la elastina sin relación con el desarrollo de neumoconiosis o con su gravedad (Porcher et al., 1993).



En cualquier caso, la determinación de elastina es invasiva, requiriendo muestras de tejido. Es además un marcador no específico, dado que su concentración es inversamente proporcional a la existencia de lesiones granulomatosas. Desafortunadamente, la elastina sérica no es un marcador fiable para la silicosis dada la ausencia de relación con el desarrollo de neumoconiosis.

Red de síntesis y degradación de colágeno: El colágeno, las fibras elásticas y el proteoglicano, son los principales constituyentes del tejido conectivo en el pulmón (McGowan, 1992a). Las moléculas de colágeno son las más abundantes en la matriz extracelular y son objeto de síntesis y degradación continua. El colágeno se produce por diferentes tipos de células pulmonares, algunas de estas fibras de colágeno o sus componentes tienen actividad quimiotáctica sobre otras células (Laskin et al., 1986).

Las principales células productoras de colágeno son los fibroblastos. No obstante, también es producido por células epiteliales y endoteliales. La producción de colágeno se controla por



un gran número de citoquinas, incluyendo: TGF- β , TNF- α , PDGF, fibronectina e IL-1 (Mariani et al., 1996; Razzaque y Taguchi, 2003). Su degradación se debe a muchas enzimas, incluyendo colagenasas, elastasas, catepsinas y gelatinasa. Alguno de ellos con enzimas controladoras nativas tales como α 2-macroglobulina, α 1-antitripsina ó tejido inhibidor de metaloproteasas (TIMP) (Garbisa et al., 1986; Hibbs et al., 1987; Mariani et al., 1998; Welgus et al., 1985), son a su vez, controladas por citoquinas como IL-1 y TGF- β (Overall et al., 1989). Todo ello constituye una compleja red de factores controladores de la síntesis y degradación del colágeno en el pulmón. Dado que la cantidad y tipos de colágeno determina la elasticidad y la función fisiológica del pulmón, existe justificación para encontrar biomarcadores de exposición y de enfermedad en la silicosis.

Péptido N-terminal procolágeno tipo III (PIIIP): El PIIIP es producto de la degradación del colágeno tipo III. Se ha relacionado con diferentes enfermedades pulmonares (Anttinen et al., 1986; Cavalleri et al., 1991; Lusetti et al., 1990) y su nivel en suero parece



ser un reflejo de la actividad y depósito de colágeno en los lugares de fibrosis (Gilligan et al., 1990; Pohl et al., 1992).

el PIIP puede encontrarse en muestras de BAL y suero. Se han encontrado niveles incrementados en pacientes con neumoconiosis en estadíos tempranos (Janssen et al., 1992a). Sin embargo, otros estudios no han encontrado relación con la progresión de la enfermedad a 5 años (Schins y Boarm, 1994; Schins et al., 1995a). Existe además otro estudio en el que el PIIP se ha evaluado en combinación con colágeno tipo VI para valorar la síntesis y degradación de colágeno (Schins et al., 1995a). El cociente fue menor en mineros sanos, lo que sugería que la acumulación de colágeno se reduce en mineros en ausencia de enfermedad.

Sin embargo, la existencia de resultados y la falta de correlación entre los niveles de PIIP y la progresión de la neumoconiosis no lo convierten, en el momento actual, en un biomarcador válido para predecir el desarrollo o la progresión de neumoconiosis.

Enzimas de degradación del colágeno: Las metaloproteasas de matriz, son un grupo de endopeptidasas relacionadas que



conjuntamente tienen la función de digerir los componentes de la matriz extracelular y componentes de la membrana basal. Se clasifican en 4 subgrupos de acuerdo a su estructura de dominio y/o afinidad por sustrato incluyendo colagenasas, stromelysinas, gelatinasas y metaloproteasas ligadas a la membrana. Estos grupos involucrados en la degradación del colágeno incluyen MMP-1, MMP-8 y MMP-13, que degradan colágeno fibrilar y gelatinasas MMP-2 y MMP-9 que tienen afinidad por sustrato y membrana basal del colágeno tipo IV y elastina (Birkedal-Hansen et al., 1993; Woessner, 1994).

Los miembros del tejido inhibidor de metaloproteinasas (TIMP) cuyos componentes son fundamentalmente TIMP-1, TIMP2, TIMP-3 y TIM-4, son capaces de inhibir las actividades de todas las MMPs conocidas y por tanto, de mantener el balance entre el depósito de matriz extracelular y degradación (Gomez et al., 1997).

En un estudio experimental en fibrosis pulmonar, las actividades de todas las proteinasas de matriz, Colagenasa 3 (MMP-13) y gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9) así como las actividades de TIMP (TIMP-1 y TIMP-2), se incrementaron en el tejido pulmonar en estadios tempranos de silicosis. TIMP-1 y TIMP-2 mostraron una



moderada reducción en el estadio final de silicosis, lo que sugiere remodelado de la matriz extracelular y disrupción de la membrana basal (Pardo et al., 1999; Perez-Ramos et al., 1999). Otros estudios de MMP-13 y su inhibidor TIMP-1 confirmaron su implicación en la degeneración de la matriz vía receptores TNF (TNFR), alterando la proporción de la expresión de MMP-13/TIMP-1 a favor de la degradación (Ortiz et al., 2001).

Se han publicado otros trabajos complementarios sobre la actividad de otras enzimas reguladoras en la síntesis y degradación del colágeno, tales como los activadores del plasminógeno tipo-urokinasa (uPAs). Que han demostrado tener un papel en la limitación de la fibrosis mediante el desensamblaje de la fibrina y el procolágeno y también activando MMPs, cuyo nivel se incrementa en niveles iniciales de silicosis (Lardot et al., 1998). Los niveles de la elastasa neutrofílica metallopeptidasa (NMEP) y elastasa leucocítica (HLE), se encontraban también elevados en sangre de mineros de carbón, confirmando los hallazgos de que el polvo de carbón tiene efecto *in vitro* en varias elastasas y antiproteasas (Huang et al., 1993).



Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para realizar una evaluación cualitativa del trabajo clínico con factores de degradación del colágeno relacionados con el polvo de carbón antes de que se puedan considerar biomarcadores útiles en silicosis.

Proteína C reactiva de fase aguda (PCR) y ácido siálico: La PCR y el ácido siálico son dos de los marcadores inflamatorios que se elevan en un gran número de enfermedades inflamatorias (Crook et al., 1994; Crook et al., 1993; Gavella et al., 2003; Haq et al., 1993; Mendall et al., 1996; Ridker, 2003; Rothkrantz-Kos et al., 2003).

Las principales citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-1, TNF, IFN- γ y factores de crecimiento TGF- β y EGF afectan a la síntesis de proteínas de fase aguda incluyendo PCR. La inducción de la glicosilación de PCR humana con ácido siálico se ha demostrado en diferentes procesos patológicos (Das et al., 2003).

Estudios animales y humanos para validación de biomarcador:
La elevación de la PCR y del ácido siálico en enfermedades



ocupacionales, incluyendo la silicosis, se investigó desde los años 50 (Budanova y Danilova, 1965; Chiesura y Picotti, 1958; Gaultier et al., 1959; Ghislandi, 1958; Monteverde y Fumagalli, 1960; Rossi et al., 1962, 1965, 1967). La elevación de la PCR en silicosis se correlacionó con el efecto inmunopatogénico de sílice cristalina (Cojocarú et al., 1995; Fernandez Rego et al., 1991; Nigam et al., 1990). Posteriormente, la concentración de ácido siálico y PCR se demostró en pacientes con silicosis y se encontró una correlación positiva con la progresión de la enfermedad (Cojocarú, 1995).

Aunque diversos estudios han demostrado incremento de los niveles de PCR y ácido siálico en silicosis, estos biomarcadores son poco específicos y se elevan en diversos procesos inflamatorios e infecciones así como enfermedades cardiovasculares.

Apoptosis, sFas, mFAS, FasL y sFasL: Se ha investigado la apoptosis de células fagocíticas en relación a la fibrosis.

La apoptosis juega un papel fisiológico importante (Ameisen, 1996; Thompson, 1995) y se asocia con inflamación y fibrosis (Henson 2003). Puede desencadenarse por la unión de la proteína



de superficie Fas (mFas) asociada a la membrana con su ligando (FasL) (Nagata, 1999). Se han descrito varias variantes del gen Fas, incluyendo la variante con la forma delecional de exón 6 en el dominio transmembrana que es generalmente conocido como sFas. sFas protege células de la apoptosis inhibiendo la interacción Fas (mFas)/FasL de forma competitiva (Cheng et al., 1994; Ruberti et al., 1996). El ligando Fas (FasL) es una proteína ligada a membrana y el contrarreceptor natural para la promoción de muerte celular por la molécula Fas expresada por varios tejidos linfoides y no linfoides. FasL se convierte en su forma soluble, sFasL, por una enzima metaloproteínasa-like (Hohlbaum et al., 2000).

Se ha propuesto que la apoptosis inducida por sílice cristalina puede contribuir a la inflamación inducida por la misma y por la fibrosis (Lim et al., 1999; Srivastava et al., 2002). La apoptosis de los macrófagos por sílice cristalina (Leigh et al., 1997) a través de los receptores Scavenger se consideró que jugaba un papel determinante en el inicio de la respuesta inflamatoria que da lugar a la fibrosis (Lyer et al., 1996). Posteriormente se ha confirmado la implicación de la apoptosis en la fibrosis pulmonar inducida por sílice en estudios animales que usaban ratones mutantes con



enfermedad linfoproliferativa (gld) y deficiencia de ligando Fas (FasL), los cuales no desarrollaron silicosis. Un estudio más reciente (Kopinski et al., 2011), encontró niveles más elevados de ligando FasL (sFasL) en la membrana de macrófagos alveolares y linfocitos en pacientes con enfermedades intersticiales pulmonares (ILDs). En otro estudio, la administración de anticuerpos que neutralizaban el ligando anti-Fas en animales in vivo bloqueó la inducción de silicosis, demostrando que el FasL juega un papel primordial en la inducción de silicosis pulmonar. Por tanto, se sugirió que, dado que el sFasL producido localmente puede producir apoptosis de neutrófilos y bloqueo posterior de la extravasación de neutrófilos en ratones, sFasL puede desempeñar un papel en la modulación de la inflamación inducida por sílice en humanos (Borges et al., 2001).

Por otra parte, se ha investigado también la apoptosis de linfocitos T con enfermedades autoinmunes en pacientes con silicosis. Se ha propuesto que la elevación de sFas en suero sugiere que la disrupción de la competición entre sFas y mFas para unir FasL en linfocitos T puede ser uno de los mecanismos más importantes de adquisición de de autoinmunidad en pacientes con



silicosis (Otsuki et al., 1998, 2000; Tomokuni et al., 1997, 1999). Se ha empleado análisis factorial para evaluar nuevos parámetros relacionadas con la apoptosis mediada por Fas, tales como expresión en membrana de Fas en linfocitos de sangre periférica (mFas), sFas en suero, niveles de sFasL en suero y cociente de expresión de mRNA de sFas/mFas en sangres mononucleares periféricas. Los resultados obtenidos demuestran que podrían ser herramientas fiables para detectar alteraciones inmunológicas independientes de las alteraciones respiratorias en casos de silicosis (Otsuki et al., 1999). Se ha propuesto que la disregulación de la apoptosis de linfocitos T puede correlacionarse con la predisposición a desarrollar alteraciones inmunológicas en pacientes con silicosis (Tomokuni et al., 1997).

Aunque el hallazgo del papel importante de FasL en silicosis experimental es prometedor, dado que la producción local de sFasL podría inducir la apoptosis de neutrófilos "espectadores", reduciendo la extravasación posterior de neutrófilos en ratones. La cuestión es hasta que punto el papel de FasL podría ser extendido para modular la inflamación inducida por silicosis en humanos. En conclusión, los niveles de sFasL en suero podrían ser un marcador



fiable del efecto de silicosis y los niveles de sFas/mFas de linfocitos podrían ser un marcador adecuado del desarrollo de enfermedades autoinmunes en silicosis. Sin embargo, se necesitan más estudios de validación en humanos para confirmar los resultados obtenidos en estudios animales.

1.6.2.3 BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD

Los biomarcadores de susceptibilidad consisten en una medida de variabilidad de la respuesta individual a la agresión ambiental dependiendo de la impronta genética del individuo (Suk et al., 1996). Determinadas enzimas y otras moléculas presentan polimorfismos que pueden jugar un papel en la determinación de la extensión y tipo de la respuesta. La variación en la secuencia de los genes que codifican ciertas enzimas y otras proteínas pueden acumularse en una población. Si la frecuencia de una variante específica alcanza el 1% o más en una población, se denomina polimorfismo. Los genes alternativos que contienen estas variantes se conocen como alelos (Harris, 1980). Existe un consenso en que la interacción entre genes que confieren susceptibilidad al efecto y



la exposición a una determinada sustancia tóxica puede afectar al desenlace de la enfermedad (Greenberg 1993)

Muchos polimorfismos en citoquinas se han asociado con diversas enfermedades (Yucesoy et al., 2003). Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), es decir, sustituciones en un único par de bases, representan el 90% de todas las variaciones en la secuencia de DNA (Brookes, 1999).

Se ha revisado la influencia de la genética en la respuesta inflamatoria con la conclusión de que, de lejos, la asociación más consistente y potente es con $TNF\alpha$, linfotoxina- α y polimorfismos del receptor IL-1 (Waterer y Wunderink, 2003). Los biomarcadores para la predisposición genética de un número de enfermedades ocupacionales incluyendo silicosis, se han revisado recientemente. Dado que la respuesta inflamatoria se desarrolla sobre todo en la fibrosis inducida por sílice cristalina, se han estudiado los polimorfismos en $TNF-\alpha$, linfotoxina- α y el antagonista del receptor del IL-1 para valorar la susceptibilidad genética de individuos expuestos a sílice para desarrollar silicosis.



INTERLEUKIN-1 (IL-1) Y POLIMORFISMOS IL-1RA

La IL-1 es una citoquina altamente pleiotrópica liberada fundamentalmente por monocitos activados o macrófagos así como muchos otros tipos celulares. Se han localizado tres genes en el brazo largo del cromosoma 2 codificadores para IL-1 α , IL-1 β y antagonista del receptor IL-1 (RA) (Roux-Lombard, 1998). Cada uno de estos genes posee polimorfismos exonicos que dan lugar a cambios en la expresión de las citoquinas, lo que juega un papel importante en ciertas enfermedades inflamatorias (Blakemore et al., 1994; Clay et al., 1994; Tarlow et al., 1994). Diversos estudios han mostrado que la IL-1 está involucrada en mecanismos que subyacen a la cascada de eventos que conducen entre otros al desarrollo de fibrosis pulmonar tales como la quimiotaxis, la inflamación, la proliferación y la secreción de componentes del tejido conectivo. La IL-1 parece estar íntimamente asociada con la evolución de las lesiones de silicosis (Davis et al., 1998).

Diversos estudios utilizando tejido pulmonar y enfocados en las diferencias en los niveles de citoquina entre individuos y SNPs hereditarios contenidos dentro de los elementos reguladores de los



genes de citoquinas, avalan estas observaciones en individuos con silicosis. Por ejemplo, la proporción del antagonista del receptor IL-1 (IL-1RA) (+2018) genotipo alelo 2, se ha encontrado incrementado en mineros con silicosis comparado con controles (Yucesoy et al., 2001). El estudio de Yucesoy et al, fue el primero que mostró una asociación entre los polimorfismos y el aumento del riesgo de enfermedad. Sin embargo, no se han observado diferencias consistentes ni significativas en las variantes genóticas IL-1 α (+4845) o IL-1 β (+3953) (Yucesoy et al., 2001b).

Aunque no hay estudios que muestren asociación genética ente silicosis y citoquinas, es probable que los polimorfismos IL-1RA puedan ser buenos candidatos para valorar la susceptibilidad genética. Sus variantes pueden arrojar cierta luz sobre la alta incidencia de silicosis y su gravedad en poblaciones expuestas y podría ser un candidato adecuado para la monitorización biológica de sujetos expuestos a silicosis.

Polimorfismos TNF- α : En diferentes estudios experimentales, se ha documentado que el ciclo repetido de daño macrofágico y



liberación de citoquinas tras exposición a sílice cristalina es un factor que contribuye de forma importante al desarrollo de silicosis. El fuerte vínculo entre la sobreexpresión de TNF- α durante la génesis y la progresión de la fibrosis pulmonar en humanos expuestos a sílice y silicatos está bien establecido como ya hemos visto. Existen varios estudios que avalan la implicación de un componente genético como un determinante para el desarrollo de fibrosis pulmonar tanto en animales de experimentación como en humanos (Izmerov et al 2002; Koskinen et al., 1983b; Kreiss et al., 1989; Ohtsuka et al., 1995). En humanos, el gen codificador de TNF-a se localiza en el cromosoma 6 entre HLA-B y DR dentro del complejo clase III de histocompatibilidad. Cualquier cambio incluyendo SNPs, podría afectar a la producción de TNF- α .

Estudios humanos para la validación de biomarcadores de susceptibilidad: Los polimorfismos en el gen promotor de TNF- α , TNF2 se han investigado en CWP. Se ha encontrado que el alelo TNF2 se asocia con el desarrollo de grandes opacidades en neumoconiosis (Kim et al., 2002). Se ha descrito SNP que contienen



sustituciones G→A en las regiones promotoras en las posiciones -308 y -238 en diversas enfermedades inflamatorias pulmonares (Huang et al., 1997; Schaaf et al., 2001; Whyte et al., 2000). Un pequeño estudio de caso-control en pacientes con neumoconiosis y controles mostró una significativa asociación de la enfermedad con alelos promotores de -308 TNF α , pero dado que no se encontró relación entre este genotipo y el fenotipo TNF en monocitos, el genotipado de TNF se consideró menos predictivo (Zhai et al., 1998). En un estudio previo, el fenotipado TNF mostró ser predictor de la progresión de CWP (Schins y Borm, 1995a). Otro estudio de mineros con silicosis moderada o grave mostró que una variante menor, el TNF- α (-238), era significativamente mayor en silicosis grave y menor en silicosis moderada. Mostró también que, al margen de la gravedad de la enfermedad, las variantes IL-1RA (-2018) o TNF-a (-308), se encontraban elevadas (Yucesoy et al., 2001a, 2001ab). Un estudio en mineros de oro de Sudáfrica, mostró que polimorfismos en el gen promotor de TNF- α podrían predisponer a los trabajadores a silicosis grave. En este estudio, mineros con silicosis grave, mostraban alelos -238A y -376A en vínculo equilibrado. Se ha notificado también que pacientes con



silicosis grave tienen un incremento de mutaciones a nivel del alelo -308 (Corbett et al., 2002). Estos estudios han demostrado con una especificidad razonablemente elevada y con un valor predictivo adecuado que los polimorfismos en el gen del TNF- α si se combinan con otras citoquinas tales como IL-1 pueden proporcionar información valiosa sobre la susceptibilidad a la enfermedad y la gravedad en trabajadores expuestos a sílice cristalina (Yucesoy et al., 2002).

Por tanto, los polimorfismos a nivel de TNF podrían aportar información valiosa sobre la susceptibilidad de la enfermedad y la gravedad en pacientes expuestos a sílice. El problema es que, aunque los estudios muestran que la información genética desempeña un papel fundamental en la caracterización de grupos de riesgo, la presencia o ausencia de estas pequeñas variantes podrían no ser una herramienta útil para la clasificación individual (McCanlies et al., 2002).

Polimorfismos a nivel de Linfotoxina alfa (LT α): El TNF- α y la linfotoxina- α (LT- α) son citoquinas relacionadas que se producen



en respuesta al stress oxidativo o la infección. Sus genes están localizados de forma adyacente a nivel del cromosoma 6p1.3 en la región del complejo mayor de histocompatibilidad clase III. El TNF- α y la LT- α actúan a través de los mismos receptores 55-kD TNF-RI y 75 kD TNF-RII. Se ha demostrado que la expresión de superficie de estos receptores es necesaria para el desarrollo de fibrosis en ratones con doble supresión del gen TNF- α /LT- α expuestos a sílice cristalina y bleomicina (Piguet et al., 1997).

Se ha desarrollado una hipótesis para evaluar en que situaciones TNF -308 y polimorfismos en LTA Ncol modifican la respuesta pulmonar a oxidantes en mineros de carbón con diferentes niveles de exposición a humo de tabaco y polvo de carbón. De forma global, los hallazgos mostraron gravedad de la silicosis con asociación con TFN -308 en varias etapas de la progresión de la enfermedad así como asociación de la prevalencia de neumoconiosis con polimorfismos en Ncol de LTA en individuos con baja actividad de catalasa. Esto confirmó la hipótesis de la interacción de respuestas biológicas y genéticas al stress oxidativo (Nadif et al., 2003). No obstante, basándose en la actual evidencia, el uso de los



polimorfismos LTA Ncol como biomarcadores de silicosis es poco probable.

Polimorfismos MnSOD, GSTM1, GSTT1 y OGG1: Ya hemos visto previamente la implicación de ROS y stress oxidativo en neumoconiosis y silicosis y la importancia de los enzimas antioxidantes en los sujetos expuestos para proteger al individuo frente a los mismos. Esto podría justificar investigaciones sobre polimorfismos a nivel de alguno de estos enzimas antioxidantes en relación con la susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo, en un único estudio realizado no se encontró asociación entre neumoconiosis y la existencia de polimorfismos para estos enzimas (Zhai et al., 2002b).

Polimorfismos en la Haptoglobina: La haptoglobina (Hp) es una proteína de fase aguda capaz de unir hemoglobina (Hb) y formar un complejo estable Hp-Hb previniendo así el daño oxidativo inducido por hierro en los tejidos. El aclaramiento de Hp-Hb está



mediado por un receptor scavenger de macrófagos CD163. La Hp actúa también como antioxidante, tiene efecto antibacteriano y juega un papel en la modulación de muchos aspectos de la respuesta de fase aguda. La Hp influye en la función del linfocito T e interacciona específicamente con células CD4+ y CD8+ tanto en reposo como activadas. La unión de Hp suprime la proliferación de células T. La Hp inhibe las citoquinas anti-inflamatorias Th2 tales como IL-1, IL-10 e IL-13 y juega un papel crucial en la modulación de las citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α , IL-1 β e IFN γ (Arredouani et al., 2003).

Hay tres variantes fenotípicas mayores, Hp-1-1, Hp 2-1 y Hp 2-2 que están asociadas con distintas manifestaciones clínicas de diferentes enfermedades con complicaciones microvasculares y diabetes (Ilzecka, 1996). Diversos estudios han demostrado que polimorfismos en alelos funcionales del gen de la Hp actúan como un determinante importante en la susceptibilidad para desarrollar complicaciones microvasculares en diabetes (Hochberg et al., 2002) y es un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular en individuos con diabetes. Los polimorfismos Hp y su influencia en el



metabolismo del hierro en hemocromatosis hereditarias, han sido también descritos (Delanghe y Langlois, 2002).

En diversos estudios en enfermedades respiratorias ocupacionales, se han investigado 7 variantes de polimorfismos genéticos. 5 de ellas, incluyendo Hp mostraban características hereditarias de susceptibilidad a silicosis.

No obstante, en base a la actual evidencia, el uso de Hp como biomarcador en silicosis no está justificado.

Polimorfismos en la enzima convertidora de la angiotensina (ECA): Como hemos visto con anterioridad, La ECA se incrementa en los pacientes con determinadas enfermedades pulmonares incluyendo la silicosis. Sin embargo, en el momento actual no existen datos consistentes para utilizarlo como un biomarcador aceptable ante la su falta de especificidad. Se ha realizado un único estudio iraní entre las variaciones genéticas de la ECA entre 41 pacientes con silicosis y 41 controles sanos entre las variaciones (I/D). El estudio indicaba que los genotipos D/D+D/I fueron mayores en el grupo de pacientes que en el de controles (OR: 5,24) y que el



genotipo I/I fue menor en pacientes (OR: 0,19). no existe, sin embargo, evidencia como para poder recomendar los polimorfismos de la ECA como un marcador de exposición en el momento actual.



2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS





2.1 OBJETIVOS

1. Encontrar una combinación de marcadores bioquímicos relacionados con el desarrollo de enfermedad pulmonar en un colectivo de trabajadores expuestos a sílice.
2. Identificar un conjunto de marcadores que sea útil en el diagnóstico precoz de la enfermedad y en la acción preventiva individual.
3. Identificar un conjunto de marcadores bioquímicos que sirva de base para la búsqueda orientada de marcadores genéticos (polimorfismos) que puedan identificar sujetos predispuestos a desarrollar la enfermedad y poder prevenirla.
4. Profundizar en el conocimiento de los mecanismos de las fibrosis pulmonares en general, puesto que la silicosis es considerada como un modelo interesante para el estudio de las mismas, por ser de causa conocida.





2.2 HIPÓTESIS

Una combinación de sistemas (CSx) implicados en la inflamación con disbalance “proinflamatorio/inhibidor” (variable DX), tiene relación con la enfermedad. La hipótesis nula a contrastar H0 es: coeficiente de regresión de Dx (RDx)=0. Una combinación de Sx o Dx predice la enfermedad de modo razonable



3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

Se reclutaron trabajadores de canteras de la provincia de Pontevedra (granito, pizarra y otras), en activo, correspondientes a un estudio que se realizó para conocer la situación de exposición y enfermedad de estos trabajadores.

El estudio fue promovido por el convenio de colaboración entre el Ministerio de Industria, Turismo y Comercio, y el Principado de Asturias (consejería de salud y servicios sanitarios) (21 de julio de 2006) y la participación de la Xunta de Galicia. Se reconocieron 170 trabajadores, incluyendo todas las categorías laborales de las empresas. Todos los sujetos tenían al menos un año de exposición a sílice o no habían trabajado en otros trabajos de riesgo fuera de las canteras de Granito.

Dado que el estudio de marcadores se hizo en plasma sanguíneo y que cualquier agente agresor o proceso inflamatorio inespecífico podría alterar los niveles de los mismos, se excluyeron los trabajadores que tenían síntomas o signos de enfermedad aguda o crónica o alteración significativa en los análisis.



Se consideró sujeto sano expuesto a aquel trabajador que no tenía antecedentes respiratorios de interés, los valores de la espirometría forzada y prueba broncodilatadora estaban en el rango de referencia (American Thoracic Society, AJRCCM 1995) y no había fumado nunca. Los sujetos sanos fumadores, además presentaban un tabaquismo que fue seleccionado en función de su exposición a la sílice.

Los criterios de inclusión para el grupo con silicosis fueron presentar una alteración radiológica compatible con silicosis. La silicosis se clasificó como simple (profusión de lesiones 1/1 o superior) o complicada (presencia de masas de fibrosis masiva, FMP).

Se consideró defecto ventilatorio obstructivo si el cociente FEV1/FVC fue menor del 70 % y el FEV1 menor del 80 % del previsto (utilizando las ecuaciones propuestas por la European Respiratory Society (ERS)).



3.2 DISEÑO

Las variables edad, sexo, nacionalidad, categorías laborales y tiempo en las mismas, años en la empresa, empresa, tipo de explotación (granito, pizarra, otros), presencia de bronquitis crónica (criterios ERS) y de cualquier otra enfermedad aguda o crónica y uso de medicación se recogieron en el cuestionario médico por un neumólogo en entrevistas personales. En el día que se realizó la extracción de sangre, se hizo también la radiografía de tórax y la espirometría a cada minero. La gravedad de la neumoconiosis fue obtenida por la clasificación de las radiografías torácicas según 3 radiólogos independientes, según el protocolo estándar de la International Labour Organization (ILO). La exposición acumulada al polvo respirable y de sílice fue determinada por ingenieros del Departamento Técnico. Una muestra de sangre fue obtenida en tubos de 10 mL con EDTA, enviados al laboratorio a 4°C y luego centrifugadas. El plasma fue almacenado a -70°C.

Se analizaron los siguientes sistemas:



Entre los sistemas (Sx, S1-7) que tienen más probabilidades de estar implicados en la mencionada respuesta destacan:

- **S1:** TNF- α : interleucina proinflamatoria, potente iniciador de una cascada de eventos implicados en las fibrosis pulmonares, cuyos principales inhibidores son el receptor sérico (sTNF-R55 (Schins RPF et al., 1995)) y la PGE2 (Schins RPF et al., 1999).
- **S2:** IL-1 β : importante citosina en la respuesta inflamatoria y su antagonista IL-1 RA.
- **S3:** Cortisol plasmático: conocido regulador de la inflamación.
- **S4:** elastasa de los neutrófilos y su inhibidor alfa-1-antitripsina: agentes bien conocidos por su papel en patología respiratoria.
- **S5:** Metaloproteinasa de matriz extracelular (MMP-9) y su inhibidor tisular (TIMP-1): factores relacionados con la degradación de la matriz extracelular (Ylisirnio S et al., 2001; Watelet JB et al., 2004; Lee KS et al 2004).
- **S6:** F2-isoprostano como marcador del “stress” oxidante y la actividad superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) como antioxidantes más significativos (Dworski R et al., 2001; Koyama S et al., 1992; Nadif R et al., 2001).



- **S7:** Transforming Growth Factor b1: importante citosina fibrógena (Swartz KB et al., 2003).





3.3 METODOLOGÍA

Este estudio corresponde al muestreo de polvo y ruido, realizado en la Comunidad autónoma de Galicia, en 48 centros de trabajo de granito de Pontevedra, excluyendo las canteras de Porriño que fueron estudiados en el proyecto del año 2005. Cuarenta y dos son canteras de granito ornamental, cinco son talleres de elaboración y una de las empresas arrancaba el material para su uso como árido.

Los reconocimientos médicos fueron realizados por especialistas del Instituto Nacional de Silicosis y del Centro de Seguridad e Higiene de Rande (Pontevedra). Posteriormente, las radiografías se enviaron al INS para su valoración definitiva por diferentes lectores. Asimismo, los análisis de sangre realizados a todos los trabajadores reconocidos se hicieron en los laboratorios del Instituto Nacional de Silicosis.



3.3.1 MEDICIÓN DEL AMBIENTE PULVÍGENO

En cuanto a la evaluación del ambiente pulvígeno de los diferentes puestos de trabajo, todos los muestreos realizados, tanto de polvo como de ruido, fueron efectuados por personal técnico del INS y del Centro de Seguridad e Higiene de Rande. En todos los casos se estudiaron los métodos operativos en las en las muestras de polvo se tomaron según dispone la vigente ITC:07.1.04.

Se utilizaron aparatos personales, que recogen en una membrana de PVC de 37 mm de diámetro, el polvo respirable, separado por medio de un ciclón incorporado al aparato y que se coloca individualmente a cada trabajador. (Figuras 11 y 12), a fin de establecer las correspondientes medidas preventivas.

La toma de muestras de polvo comprendía la jornada laboral del personal al que se le coloca el equipo.



Fig 13

CURVA DE POLVO RESPIRABLE

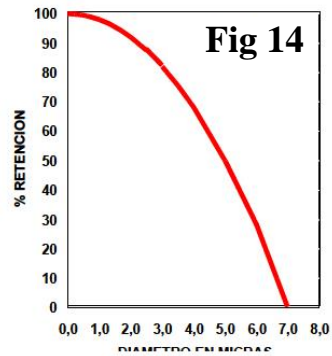


Fig 14

Fig 13 y Fig 14: aparato medidor de polvo respirable y curva de polvo respirable

El riesgo pulvígeno se valora en función de la masa de polvo respirable recogido sobre el filtro y del tanto por ciento de sílice libre que contiene. En la actualidad el valor límite de concentración de polvo para un puesto de trabajo determinado viene dado por la fórmula:

$$V_L = \frac{25}{Q} \text{ mg / m}^3$$

Cuando el contenido Q de SiO era inferior al 5%, el valor límite fué de 5 mg/m^3



3.3.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

La técnica analítica que se viene utilizando sistemáticamente para la determinación rutinaria de la sílice libre en muestras de polvo respirable, es la Espectrofotometría de Infrarrojo.

La Difracción de Rayos X proporciona información complementaria en este tipo de análisis, por cuanto mediante esta técnica es posible distinguir las distintas variedades de sílice cristalina. Además las interferencias que se pueden presentar en la difracción de Rayos X son totalmente distintas a las encontradas por Espectroscopía de IR.

3.3.2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Una vez realizada la toma de muestras, los filtros de membrana se introducen en crisoles de porcelana y se calcinan en mufla durante 2 horas a 800 °C. El residuo obtenido en la calcinación se mezcla con, aproximadamente, 360 mg de KBr, mantenido en estufa a 110 °C. La homogeneización se lleva a cabo en el mismo crisol, sin que se haya observado que sea necesario una



transferencia de esta mezcla a un mortero de ágata con objeto de lograr una mejor homogeneización. Finalmente, se prepara, con ayuda de una prensa hidráulica, una pastilla de bromuro potásico de 13 mm de diámetro.

Exponemos a continuación la tabla de exposición por categoría laboral

Tabla 6: exposición a sílice por categoría laboral

Categorías	Nº	mg/m ³	% SiO ₂	%> V _L
Barrenista frente manual	68	1,3	16,6	35,3
Barrenista frente banqueador	13	0,45	16,4	7,7
Labrador	2	1,85	13,9	50,0
Palista frente	30	0,55	15,8	3,3
Encargado	27	0,32	16,1	0,0
Palista martillo rompedor	1	0,5	19,3	0,0
Palista de Retro Frente	3	0,5	16,7	0,0
Sierras	12	0,33	14,4	0,0
Molienda primaria	1	0,4	19,3	0,0
Barrenista ayte perforadora	7	0,13	16,5	0,0
Palista perforadora	3	0,1	14,7	0,0
Operario de Perpiaño – mampostería	32	1,03	15,0	28,1
Barrenista tiros horizontales	7	1,06	13,3	28,6
Otros	11	0,55	16,7	18,2



3.3.3 ESTUDIO MÉDICO

Se trata de un estudio epidemiológico transversal llevado a cabo en los trabajadores en activo de las canteras de granito.

El único criterio de selección utilizado para participar en el estudio fue el de ser trabajador en activo de dichas explotaciones en el año 2006, independientemente del tiempo trabajado en ellas.

La difusión de la oferta del reconocimiento, se realizó indicando su carácter voluntario y confidencial, a través de los propios empresarios, de los sindicatos implantados en el sector y del Servicio de Salud Laboral de la Xunta de Galicia a través del Centro de Seguridad e Higiene de Rande.

La citación de los trabajadores al reconocimiento (a la totalidad de los activos) fué llevada a cabo desde el del Centro de Seguridad e Higiene de Rande, de forma directa a cada una de las empresas.

Fueron citados a reconocimiento médico 170 trabajadores, de los que acudieron al reconocimiento un 95,5 % de los citados.



A cada trabajador se le realizaron las siguientes pruebas:

- **Radiografía de tórax (Rx)** siguiendo las recomendaciones ILO-80; si la calidad de la Rx no era adecuada se repetía hasta que era aceptable. Las radiografías fueron leídas como mínimo por dos lectores (uno del INS) y en caso de discrepancias significativas por tres o incluso por cuatro lectores.
- **Espirometría**, con espirómetros de volumen y según las recomendaciones de la Sociedad Europea de Respiratorio (ERS).
- **Electrocardiograma y extracción de sangre para análisis habituales y pruebas especiales.** Los análisis habituales se realizaron en Rande y las pruebas especiales se realizaron en el INS.
- Cada trabajador recibirá un informe de su situación en cuanto a enfermedad ocupacional y a otras alteraciones halladas, así como las recomendaciones preventivas oportunas. El expediente completo es archivado en Rande, donde muchos trabajadores tenían historia previa.
- En todos los trabajadores se aplicó el siguiente protocolo de estudio:



3.3.3.1 HISTORIA LABORAL

A cada trabajador se le realizó un interrogatorio detallado de todas las actividades laborales realizadas a lo largo de toda su vida, especificándose respecto del periodo que hubiera estado trabajando en la industria extractiva, el tiempo permanecido en los diferentes centros de trabajo propios de las canteras de granito, así como el transcurrido en las diversas categorías que hubiera desempeñado (barrenista, palista, operario de perpiños, etc.), uso de herramientas (martillo perforador, pistoleta, etc.) y nombres de las empresas donde se desarrollaron estas actividades.

A partir de estos datos, y de los procedentes de los muestreos realizados por el equipo técnico del Instituto Nacional de Silicosis, relativos a los niveles medios de polvo respirable, en mg/m^3 y % de SiO_2 existentes en las diferentes explotaciones. y de los datos que el INS tenía de años anteriores, se estableció una estimación individualizada del nivel de riesgo calculando la dosis acumulada de exposición en mg/m^3 de SiO_2 x año (cantidad de mg/m^3 de sílice libre de exposición por el número de años) a la que cada trabajador estaba expuesto.



3.3.3.2 HISTORIA CLÍNICA

El cuestionario recogía:

- Antecedentes personales.
- Enfermedades pleuro-pulmonares (tuberculosis pulmonar, asma bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasias)
- Hábito tabáquico en paquetes-año, considerándose no fumadores a los que nunca habían fumado y exfumadores a los que llevaban más de 6 meses sin fumar, y fumadores activos los que fumaban en el momento del reconocimiento o llevaban menos de 6 meses sin hacerlo.
- Hábito enólico en g de alcohol l/día.
- Hipertensión arterial.
- Sintomatología presente en el momento del reconocimiento y tiempo de evolución.
- Criterios clínicos de bronquitis crónica, considerándose éstos los establecidos por la American Thoracic Society: presencia de tos y expectoración crónica o recurrente durante un mínimo de tres



meses al año durante dos años consecutivos (Am Rev Respir Dis 1987; 136:225-244).

- Ausencia o presencia de disnea y gradación en su caso, en el momento del reconocimiento. Este síntoma fue clasificado en los siguientes grados de intensidad: grado 0 cuando estaba ausente, grado I cuando se presentaba en grandes esfuerzos, grado II en medianos esfuerzos, grado III en esfuerzos moderados y grado IV si se manifestaba en actividades como el aseo personal o el vestido.
- Enfermedades cardiológicas previas o concurrentes.
- Utilización crónica de medicamentos.

3.3.3.3 EXPLORACIÓN CARDIOPULMONAR

En todos se realizó medida de tensión arterial sistólica y diastólica, peso y talla, así como auscultación cardiopulmonar.



3.3.3.4 ESPIROMETRÍA

Fueron realizadas con un espirómetro de volumen, provisto de un ordenador incorporado, que permitía el registro y almacenaje de todas las pruebas realizadas y la visualización de las gráficas correspondientes a la curva flujo-volumen, con la determinación de capacidad vital forzada (CVF), volumen espiratorio máximo en el primer segundo (FEV1), relación FEV1/CVF, flujo espiratorio máximo (PEF) y flujos mesoespiratorios.

3.3.3.5 ELECTROCARDIOGRAMA

En todos los registros electrocardiográficos, se analizaron los siguientes parámetros: ritmo y frecuencia cardíaca, eje, y morfología del trazado, emitiéndose informe específico sobre su normalidad o posibles alteraciones (bloqueos y anomalías en la conducción del estímulo eléctrico, crecimientos de cavidades, isquemia o necrosis, etc.).

3.3.3.6 RX DE TÓRAX EN PROYECCIONES POSTEROANTERIOR Y LATERAL

Fué realizada a todos los trabajadores que acudieron al reconocimiento, según la normativa indicada al respecto.



Informe de las Radiografías: Todas las Rx fueron examinadas en el Instituto Nacional de Silicosis y en el Centro de Seguridad e Higiene de Rande, por médicos expertos en la valoración radiológica de neumoconiosis, y de forma independiente emitieron su informe acerca de todos los elementos contenidos en la clasificación completa establecida por la normativa de la ILO-80 para la clasificación de las Rx de la neumoconiosis. Los lectores, utilizaron las Rx patrón emitidas por la ILO para su uso como referencia, de las diferentes categorías radiográficas de las neumoconiosis, emitiendo un juicio comparativo respecto de las Rx objeto de examen, manifestando su opinión acerca de los siguientes aspectos:

Calidad técnica del estudio: Respecto de esta cuestión fueron establecidas las siguientes opciones: calidad buena, aceptable, deficiente, inaceptable.

En cada caso, de no ser considerada buena calidad, el lector especificaba los motivos para la calificación emitida (sobreexposición, subexposición, inspiración inadecuada, visualización de escápulas, etc.).

Anomalías parenquimatosas: Se emitía informe acerca de la presencia o ausencia de pequeñas opacidades redondeadas o irregulares (p, q, r s, t, u) y de su profusión utilizando una escala de doce puntos (0/-,0/0, 0/1, 1/0, 1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/3, 3/2, 3/3,3/+), indicando las zonas de los pulmones en donde se observaban tales



imágenes, considerando éstos divididos en tres zonas (superior, media e inferior).

Asímismo se expresaba la opinión de cada lector respecto de la presencia o ausencia de grandes opacidades, indicando en su caso, tamaño (A, B, C) y características radiológicas (broncograma aéreo, lesión satélite, calcificaciones, etc.).

Se diagnosticó silicosis simple si la Rx mostraba pequeñas opacidades de profusión 1/1 o superior y silicosis complicada si se observaban grandes opacidades.

Anomalías pleurales: en todas las Rx se hizo una referencia expresa a la existencia o no, de engrosamientos pleurales, en cuyo caso se señalaba localización, grosor, longitud y posible calcificación.

Otras anomalías: Fueron tenidos en cuenta los veintidós símbolos establecidos por la clasificación ILO-80, utilizándose en los casos pertinentes (ax, bu, ca, cn, etc.), lo que permite poner de manifiesto la coexistencia de otras alteraciones de interés.

3.3.3.7 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Se extrajeron muestras de sangre, para la realización del hemograma en el laboratorio donde tenía lugar la extracción. Además, parte de las muestras, una vez centrifugadas y congeladas, fueron



trasladadas al Instituto Nacional de Silicosis para pruebas adicionales: glucemia, uremia, creatinina, colesterol, triglicéridos y pruebas hepáticas.

ANÁLISIS BIOQUÍMICO

La concentración plasmática de elastasa de los neutrófilos, Alfa-1 antitripsina (valores normales entre 120 y 220 mg/dl), MMP-9 y TIMP-1 se determinaron mediante sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Los kit utilizados fueron los siguientes:

- para PGE2 se utilizó el kit nº. catalogo 514010 Prostaglandin E2 EIA Kit – Monoclonal, Cayman Chemical, Michigan, USA. Los niveles descritos en sujetos sanos son 3-12 pg/ml.
- Para F2-ISOPROSTANOS se utilizó un kit de Cayman Chemicals. Valores en sanos sobre 270 (95,66) ng/ml.
- Para la SOD se siguió la técnica de Pascual y Misra. Este método consiste en medir la capacidad de SOD de inhibir la autooxidación de la epinefrina a adrenocromo, a un pH de 10,2. La reacción es medida a una longitud de onda de 480 nm, correspondiente al adrenocromo. Sus valores normales en población sana son 765,10 U /g Hb.
- Para la GSH-Px se midió su actividad a 37°C en un Cobas-Mira S analyser con un Ransell kit (Randox Laboratories, Crumlin, UK) con el método descrito por Paglia and Valentine. La GPx cataliza la oxidación del glutation (GSH) por el hidroperóxido de



cumeno. El glutatión oxidado (GSSG) en presencia de glutatión reductasa (GR) y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP⁺. Se mide la disminución de la absorbencia a 340 nm. La actividad GSH-Px fue expresada como U/g de hemoglobina en los eritrocitos, y U/l en plasma. Su valor descrito para mineros expuestos fue de 62.6 ng/ml con niveles de 59 para baja exposición y de 65 para alta.





3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La descripción de la muestra se realizó con los valores medios para cada variable y su desviación estándar. Para las correlaciones entre variables se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Pearson

Del cociente entre el marcador proinflamatorio y su inhibidor se obtuvieron 9 variables indicadoras de desbalance en el sistema (Dx) que fueron comparadas entre pacientes con y sin silicosis. Se procedió a la comparación de otras variables de interés (tabaquismo, exposición acumulada a sílice etc...).

Las variables con diferencias significativas en el análisis crudo de datos se introdujeron en un análisis multivariante (regresión logística condicional) para ver su relación con la enfermedad.

Las Dx que mostraron relación significativa con la enfermedad en el análisis multivariante fueron sometidas también a análisis posterior. Mediante curvas ROC se realizó determinación del punto de corte que mejor predijo la enfermedad y se procedió a la



conversión de dichas variables en binarias codificando como 1 los valores anormales (por encima del punto de corte) y como 0 el resto. Finalmente se analizó que combinación de variables Dx o sistema predecía mejor la aparición de enfermedad pulmonar. De la misma forma se analizó la relación entre los citados marcadores y la alteración ventilatoria pulmonar.

Se hizo una comparación cruda de las variables del estudio con el grupo de referencia sin silicosis mediante las pruebas correspondientes para datos independientes. Las variables que alcanzaron significación estadística en el análisis crudo fueron introducidas en una regresión multivariante para ver su relación con la enfermedad. Las alteraciones radiológicas, funcionales y el tabaquismo fueron objeto de un análisis posterior.

4. RESULTADOS





De los 170 sujetos estudiados, 34 fueron excluidos por presentar enfermedades concomitantes o alteraciones analíticas sugestivas de enfermedades sistémicas.

Un total de 77 (57%) trabajadores cumplieron criterios de silicosis y 59 (43%) no los cumplían por lo que se consideraron sanos expuestos. Ambos grupos no diferían en las variables relativas a la exposición. Así, la exposición media al sílice fue de 20 años (6-44) años y de 19 años (3-39 años), respectivamente. Los pacientes reconocieron No haber utilizado medios de protección activa respiratoria tanto en el grupo con enfermedad como en los expuestos, siendo el tiempo medio sin protección de un 13,9 (8,8) y 14,1 (8,26) años respectivamente en ambos grupos (rangos de (0-42) y (0-39) respectivamente). Asimismo, los niveles de exposición medidos en el puesto de trabajo fueron de 14,4 (7,7) g/m^3 y 12,4 (5,7) g/m^3 . Sin diferencia significativa ($p=0,86$).

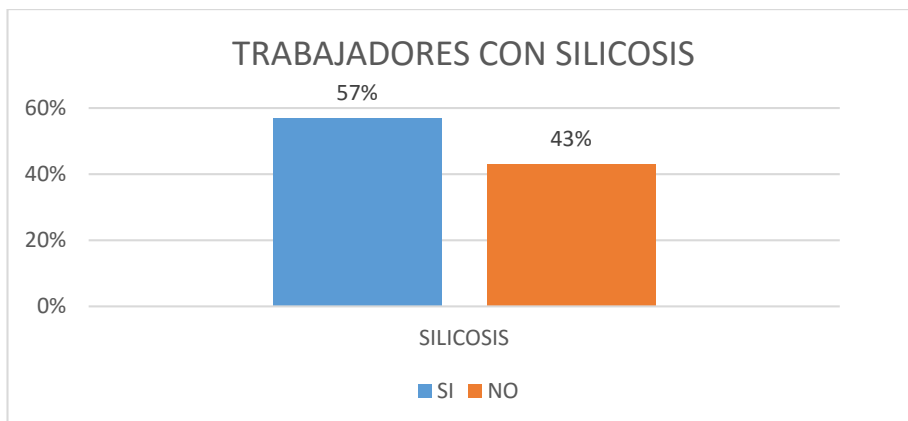


Fig 15: Porcentaje de pacientes con silicosis

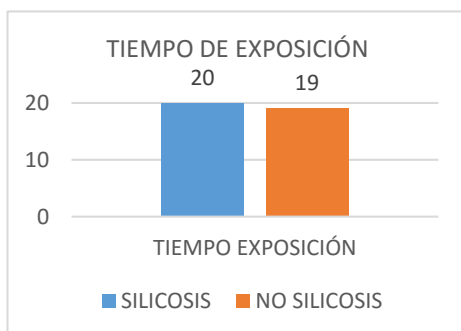


Fig 16: tiempo medio de exposición a sílice

($p=0,53$)

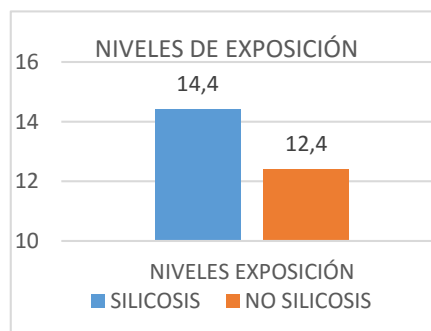


Fig 17: niveles medios de exposición a sílice en g/m^3

($p=0,86$)

La clasificación ILO de las alteraciones radiológicas encontradas pueden observarse en la tabla 7. Solo un caso entre los enfermos con silicosis refería presentar disnea a grandes esfuerzos y hasta



cinco (6%) pacientes con silicosis presentaron clínica de bronquitis crónica. Ningún trabajador presentaba clínica respiratoria entre los expuestos sanos.

Tabla 7: Profusión, edad y tiempo trabajado

PROFUSIÓN	N	EDAD MEDIA	AÑOS TRABAJADOS
0/0	39	41	19,2
0/1	11	41	18,7
1/0	9	41	20,1
1/1	27	42	19,3
1/2	11	46	18,27
2/1	7	46	22
2/2	9	41	17,6
2/3	5	37	19,6
3/2	3	38	20,7
3/3	15	45	23,3
TOTAL		42,07 (7,6)	19,7 (7,2)

El hábito tabáquico estaba presente en 27 (36%) de los enfermos de silicosis y en 23 (40%) de los expuestos sanos. Veinte (26%) de los enfermos eran exfumadores y 29 (38%) no habían fumado nunca, mientras que en los expuestos sanos hubo 16 (28%) y 19



(33%), respectivamente. No había diferencias significativas en tabaquismo entre trabajadores con silicosis ó sin ella ($p=0,75$).

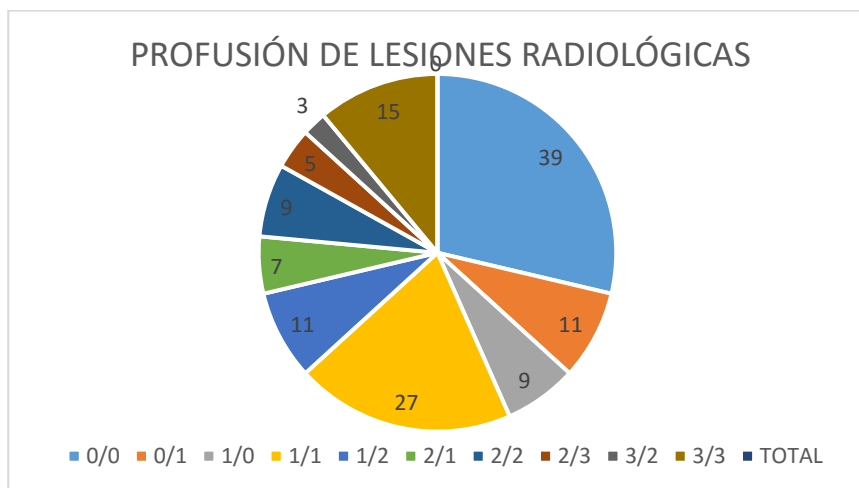


Fig 18: Alteraciones radiológicas

Tabla 9: edad y tiempo trabajado en función de existencia o no de silicosis

SILICOSIS		AÑOS TRABAJADOS	EDAD
No silicosis	Media	19,25	41,01
	N	59	59
	Desviación estándar	6,945	7,103
Silicosis	Media	20,04	42,89
	N	77	77
	Desviación estándar	7,417	7,951
Total	Media	19,70	42,07
	N	136	136
	Desviación estándar	7,200	7,626

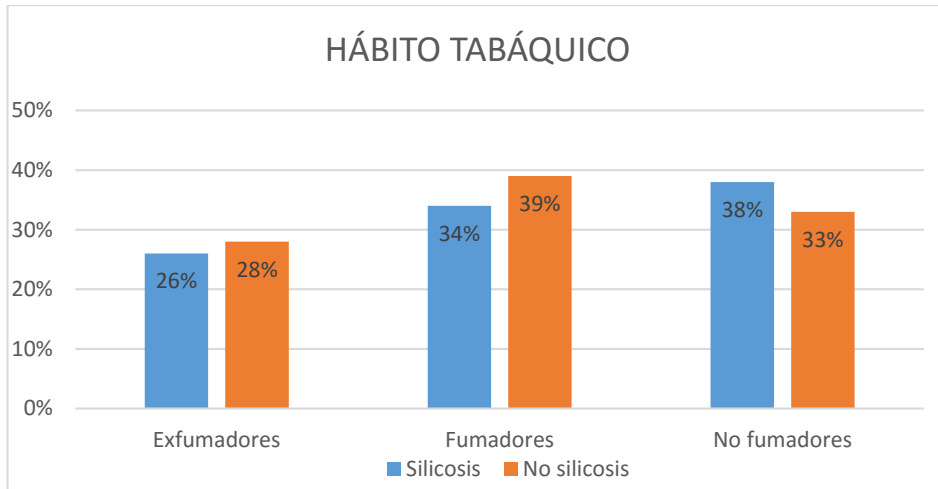


Fig 19: hábito tabáquico entre trabajadores con y sin silicosis

Resumimos a continuación distintas variables sociodemográficas y clínicas

Tabla 10: variables sociodemográficas y clínicas

	Control		Caso		p
	Media	SE	Media	SE	
EDAD	41	7	43	8	0,153
IMC	28,14	3,31	27,29	3,66	0,160
TAM	130	17	133	17	0,319
PAQ/ AÑO	8,91	11,94	8,10	10,27	,0693
FVC	4.90	.70	4.65	.87	0,078
FEV1	3.95	.60	3.68	.80	0,075
GLUC	96,7	23,0	96,5	23,2	0,954
COLEST	211	42	219	39	0,48
TRIGL	153	113	138	87	0,381

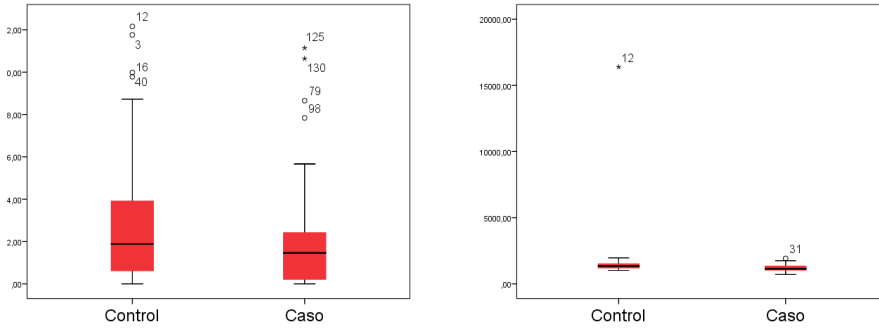


Sólo 1 caso del grupo de pacientes con silicosis refería disnea a moderados/grandes esfuerzos y 2 pacientes del grupo control reconocían tener asma ($p=0,189$).

Niveles medios de marcadores inmunológicos en sanos y enfermos.

Tabla 11: marcadores inmunológicos en sanos y enfermos

	Control		Caso		p
	Media	SE	Media	SE	
TNF α	3,00	3,21	2,00	2,36	0,039
Stnf-R55	1623,59	1970,39	1198,65	257,36	0,065
PGE2	7,3390	5,2653	19,4262	63,6768	0,149
IL1b	2,80	5,69	4,03	4,70	0,170
IL1Ra	555,104	191,488	385,642	162,265	0,000
Cortisol	12,4	3,4	14,3	4,4	0,006
Elastasa	37	20	33	20	0,196
A1AT	137	20	103	47	0,000
MMP9	1274,02	395,06	1212,58	668,80	0,533
TIMP1	155562	30596	156059	73540	0,961
Isoprost	197636,652	448845,900	76270,906	129722,270	0,34
SOD	,1066	,0172	,0892	,0517	0,014
GSH-Px	668,11	388,79	301,11	387,60	0,000
TGFb	32501,92	12928,23	29702,17	15643,81	0,281



Figs 20 y 21: Niveles de TNF α y de sTNF-R55

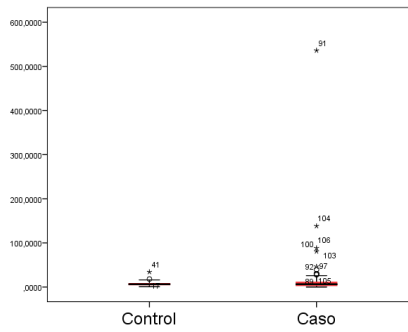
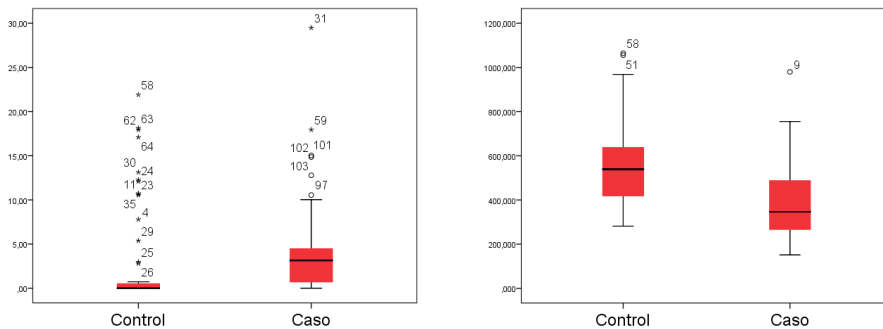


Fig 22: niveles de PGE2



Figs 23 y 24: niveles de IL1b y IL1RA

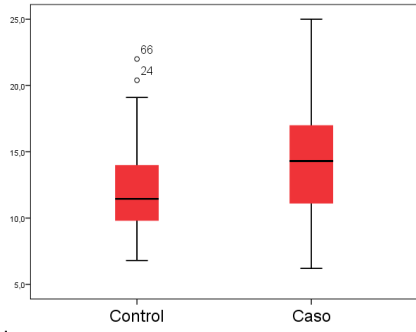


Fig 25: Niveles de cortisol

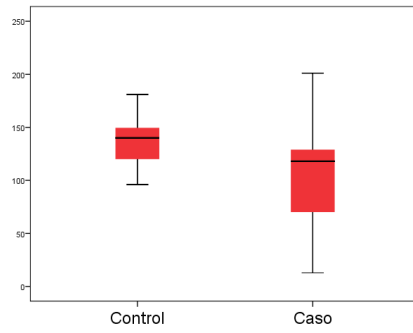
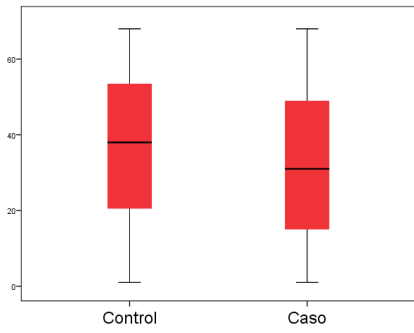


Fig 26 y 27: niveles de Elastasa de los neutrófilos y Alfa -1-AT

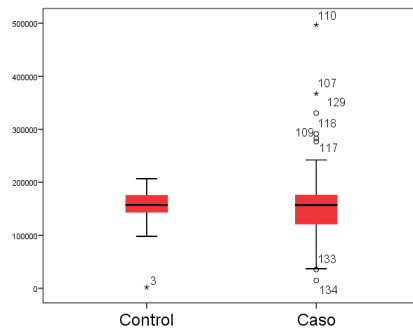
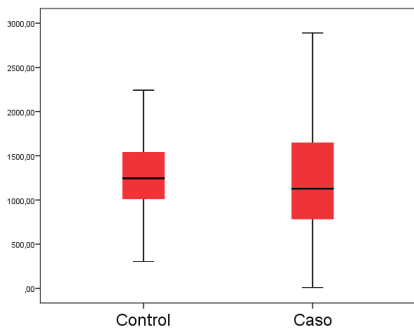
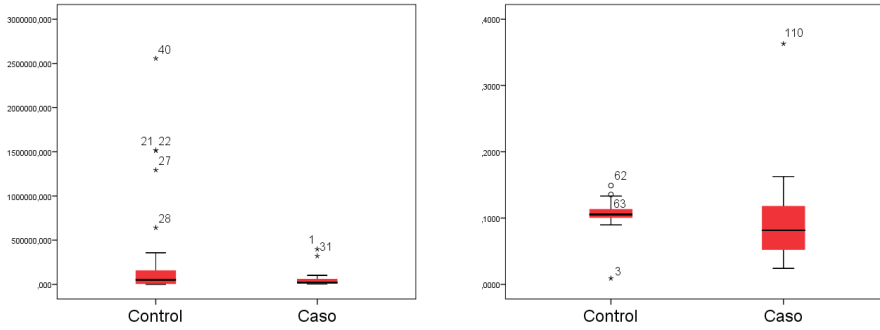


Fig 28 y 29: niveles de MM9 y TIMP1



Figs 30 y 31: Niveles de F2 isoprostanol y SOD

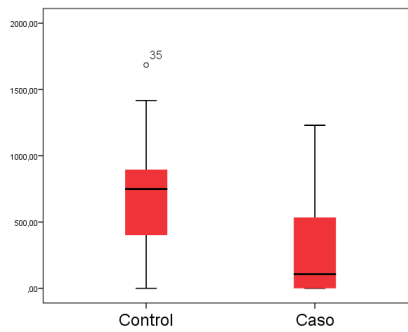


Fig 32: niveles de GSH-Px

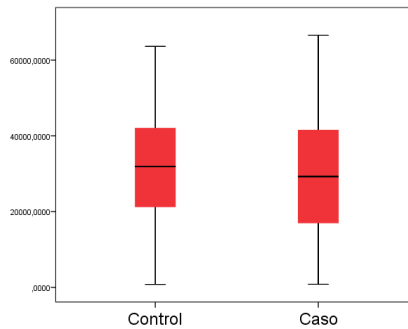


Fig 33: Niveles de TGFβ1

Los datos reflejan que los casos presentan niveles inferiores de ILR1, TNF α , GSH-Px, SOD, A1AT y una elevación del cortisol.



No obstante, la distribución no es normal, por lo que optamos por calcular el logaritmo neperiano de los valores. En este caso, se mantienen las diferencias significativas para ILR1, GSH-Px, SOD y A1AT tal y como vemos reflejado a continuación.

Tabla 12: Logaritmo neperiano de los marcadores inmunológicos con diferencia significativa entre sanos y enfermos

	Control		Caso		p
	Media	SE	Media	SE	
LnTNFa	3,00	3,21	2,00	2,36	0,039
LnIL1Ra	555,104	191,488	385,642	162,265	0,000
LnCortisol	12,4	3,4	14,3	4,4	0,006
LnA1AT	137	20	103	47	0,000
LnSOD	,1066	,0172	,0892	,0517	0,014
LnGSH-Px	668,11	388,79	301,11	387,60	0,000

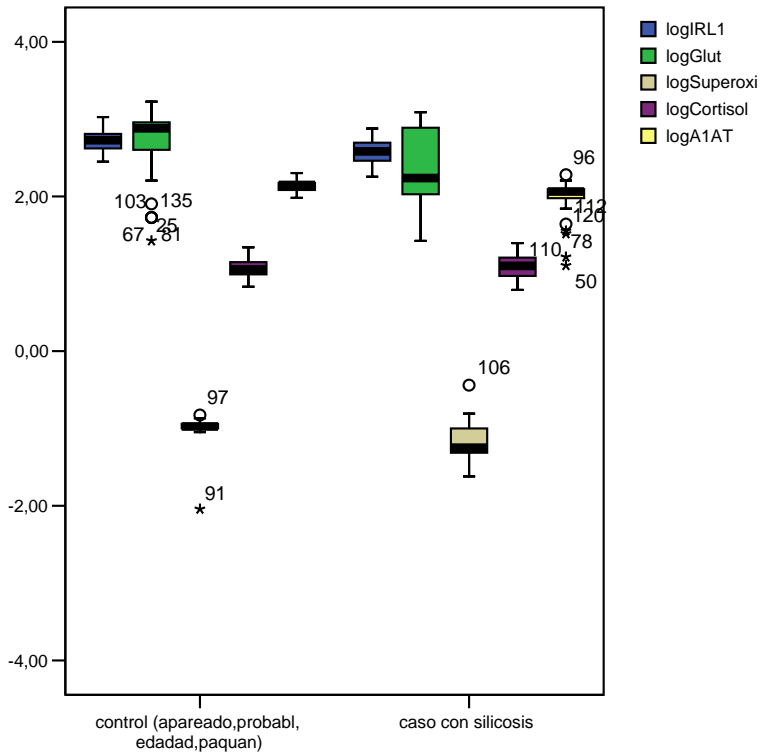


Fig 34: Gráfico del logaritmo neperiano de los valores inmunológicos con diferencias significativas

Los trabajadores con silicosis presentaron niveles similares a los expuestos sanos en MMP-9 y TIMP-1 pero unos niveles más bajos de A1AT. La diferencia media de A1AT fue de 34,5 mg/dl (6,2) con una $p < 0,0001$ y un IC95% 22,1 a 46,9 mg/dl.

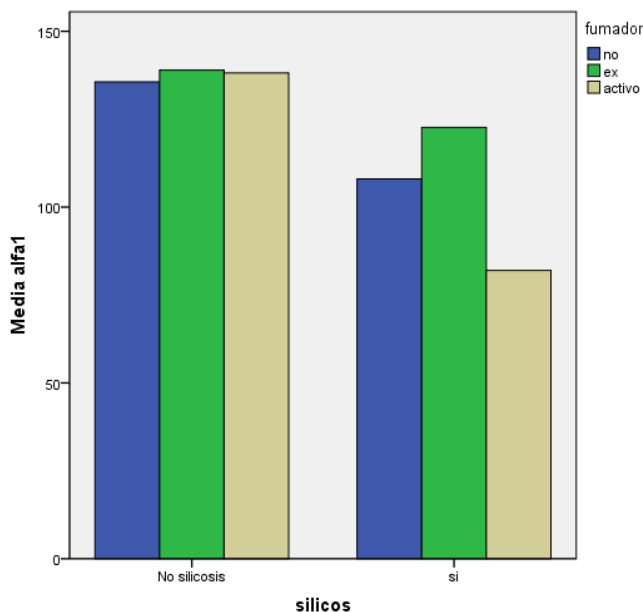


Fig 35: niveles de A1AT

Niveles de marcadores de estrés oxidativo y antioxidantes en sanos y enfermos.

Aunque los trabajadores con silicosis presentaron niveles F2-isoprostano superiores a los de los expuestos sanos con una diferencia media de 121.365 (68.622) mcg/ml, esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p=0,082$). Igualmente los niveles de PGE2 no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos ($p=0,104$).

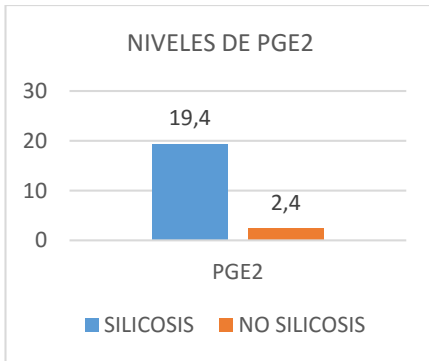


Fig 36: niveles de PGE2o

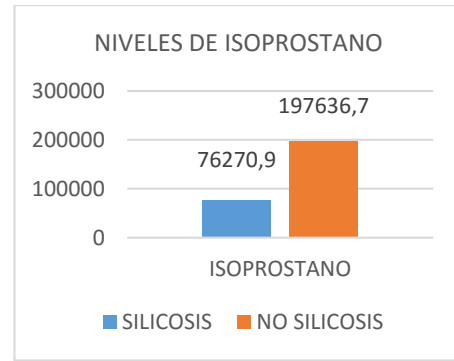


Fig 37: niveles de isoprostano

Sí que aparecieron diferencias significativas en el análisis de los antioxidantes y los trabajadores con silicosis presentaron niveles inferiores de SOD (diferencia media de 0,017 mcg/dl IC95% 0,003-0,031, $p=0,007$) y de GSH-Px (diferencia media de 367 mcg/dl IC95% 234-500, $p<0,0001$).

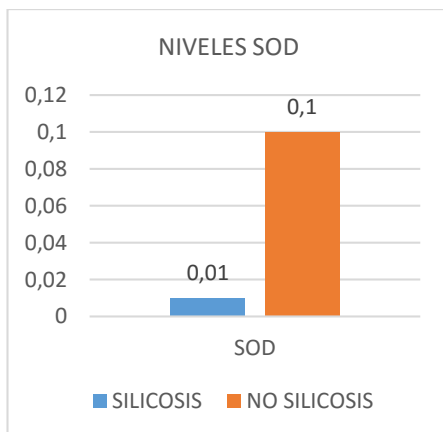


Fig 38: niveles de SOD

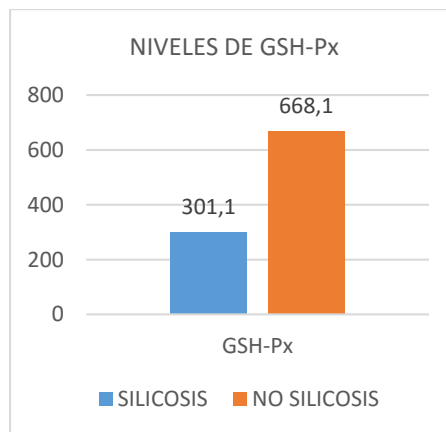


Fig 39: niveles de GSH-Px

Efecto del tabaquismo sobre los marcadores medidos.

El tabaco presenta un potencial efecto bien conocido tanto sobre los marcadores estudiados de la homeostasis de la matriz como sobre el estrés oxidativo. Por lo tanto, se repitió el análisis anterior con un ANOVA ajustado por el factor hábito tabáquico (no fumador, exfumador y fumador activo).

Los resultados están expresados en la tabla IV. Los valores de MMP-9 y TIMP-1 no se vieron afectados por el efecto del tabaquismo y la presencia de silicosis continuó sin mostrar un efecto significativo.



Sin embargo, la A1AT continuó mostrando un efecto significativo sobre la presencia de silicosis a pesar de evidenciarse un efecto independiente del tabaquismo y de la interacción entre ambas (figura 1) ($F=8,53$; $p<0,0001$).

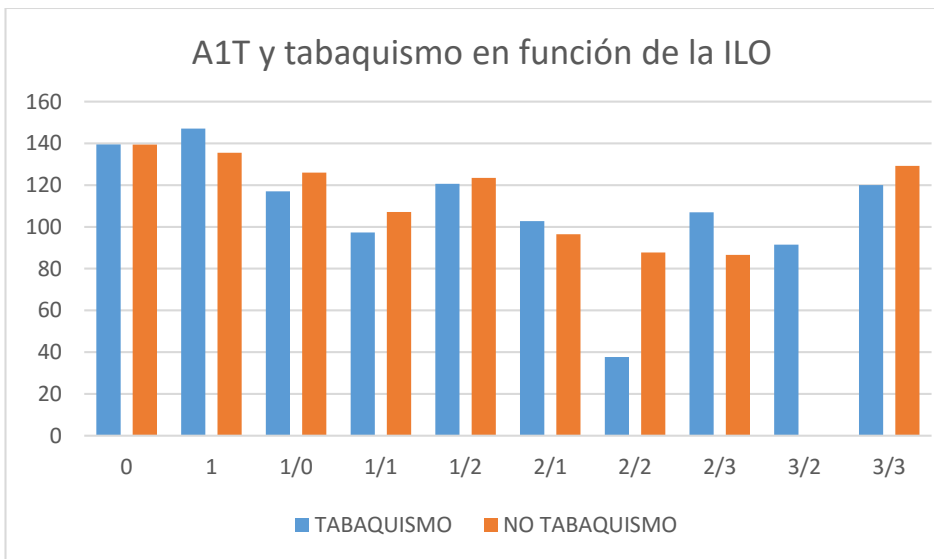


Fig 40: niveles de A1AT en función del tabaquismo

De forma similar a las proteasas, tanto el F2-isoprostano como los niveles de PGE2 continuaron sin mostrar diferencias significativas entre trabajadores con o sin silicosis que no se modificó por el hábito tabáquico ($p=0,553$ y $p=0,255$, respectivamente).



Sorprendentemente, tanto la SOD como la GSH-Px mantuvieron el efecto significativo de la presencia de silicosis sin que se evidenciase un efecto significativo del hábito tabáquico.

Relación entre lesiones radiológicas y niveles de proteasas y marcadores de estrés.

La gradación de las lesiones radiológicas viene expresada en la clasificación ILO.

De nuevo se encontró una relación significativa entre la clasificación ILO y los niveles en suero de A1AT, SOD y GSH-Px (ANOVA $F=5,674$ $p<0,0001$; $F=2,726$ $p=0,006$; $F=3,693$ $p<0,0001$). Esta relación puede apreciarse en los gráficos siguientes. Siendo no significativa para el resto de marcadores estudiados.

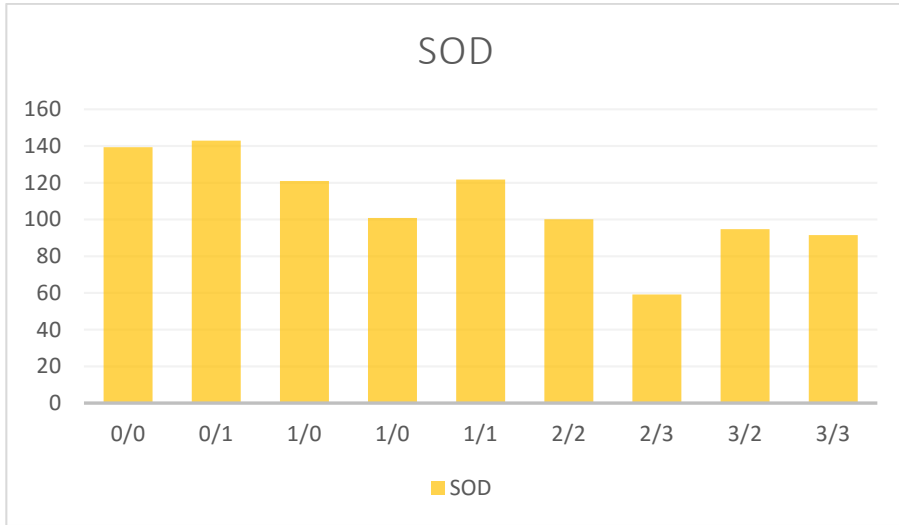


Fig 41: Clasificación ILO y niveles de SOD

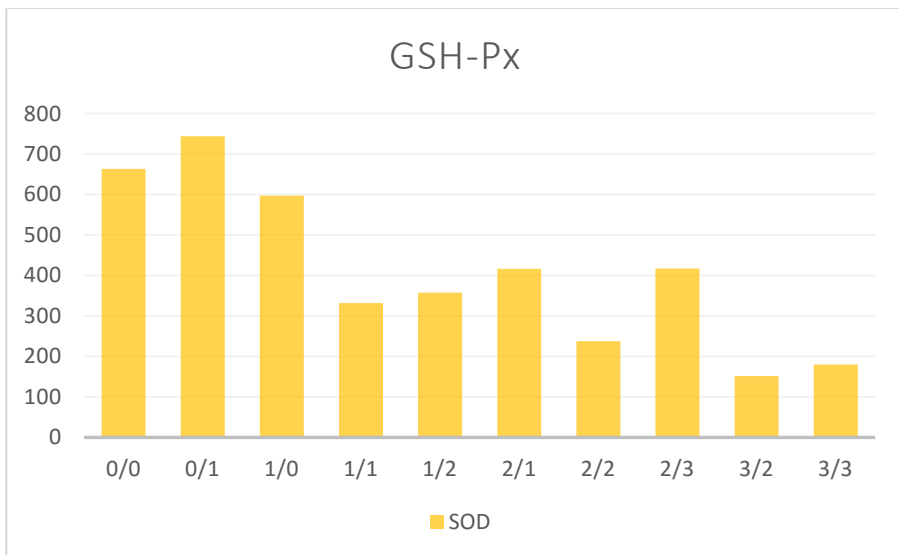


Fig 42: ILO y niveles de GSH-Px

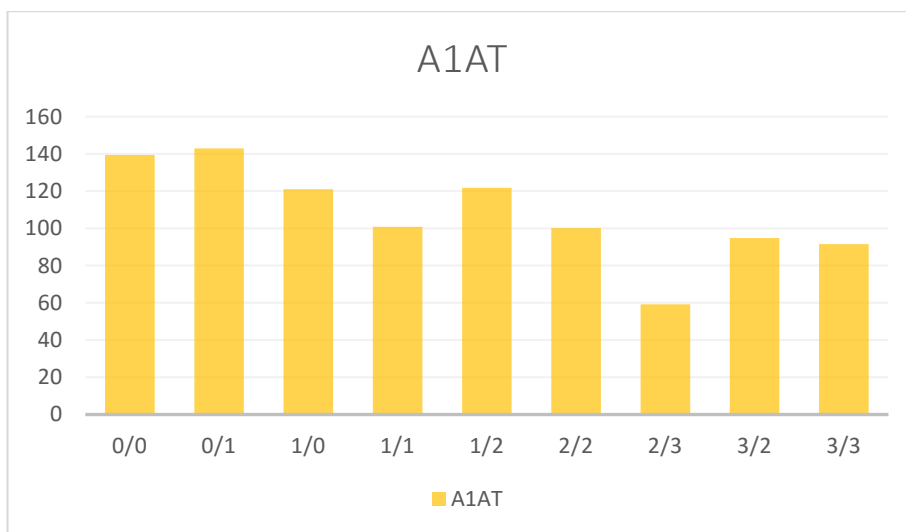


Fig 43: ILO y niveles de A1AT

Relación entre las alteraciones espirométricas y niveles de proteasas y marcadores de estrés oxidativo.

Las variables espirométricas (FVC, FVC%, FEV1, FEV1% y FEV1/FVC) no mostraron relación directa con los marcadores estudiados. Aunque, si mostraron una relación débil con la clasificación ILO de la silicosis ($r=-0,266$ $p<0,0001$ para el FEV1%) y aún menor con el tabaquismo. No obstante, si agrupamos por un lado los expuestos sin silicosis y por otro a los pacientes con silicosis complicada, las diferencias llegan a ser significativas tanto para la FVC ($p=0,000$), como para el FEV1 ($p=0,001$).

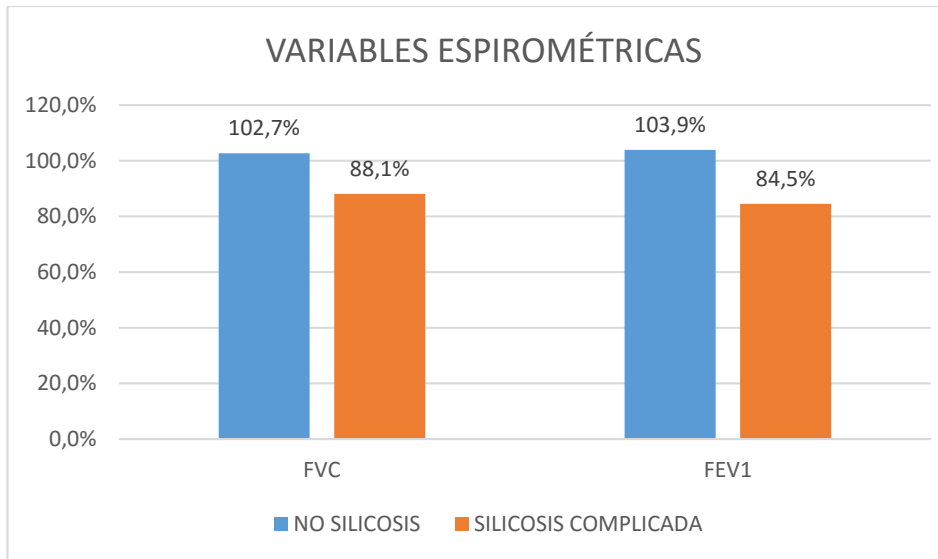


Fig 44: FVC y FEV1 en trabajadores sanos y con silicosis complicada

Estudio multivariante para discriminar la presencia de silicosis.

El análisis multivariante por pasos relacionó variables implicadas en la reparación tisular como las más relevantes respecto a la presencia de silicosis. En orden ascendente se incluyeron: A1AT, SOD, TIMP-1 y GSH-Px. Se realizó un modelo de regresión logística con variable independiente el estado de caso-control, y forzando edad, sexo, tabaquismo e IMC, la significación de los marcadores



se mantiene excepto el cortisol ($p=0.926$) y al límite el glutathion peroxidasa ($p=0.083$).

La gráfica siguiente indica como niveles bajos A1AT y SOD separan razonablemente la mayor parte de los trabajadores con silicosis del resto.

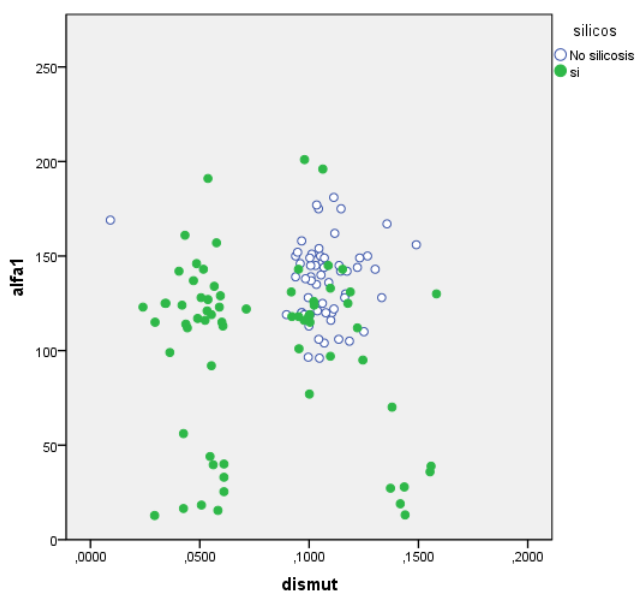
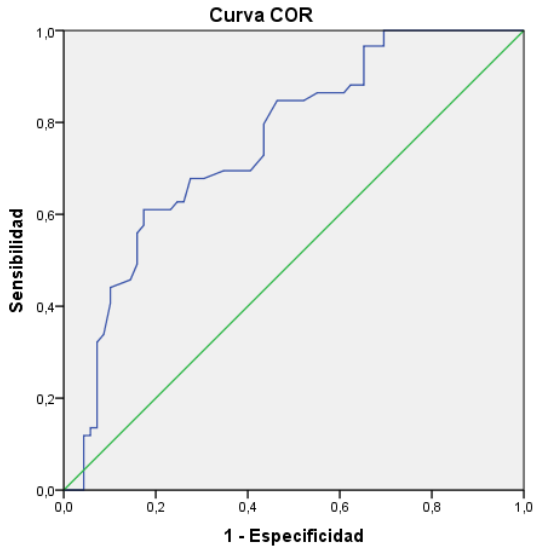


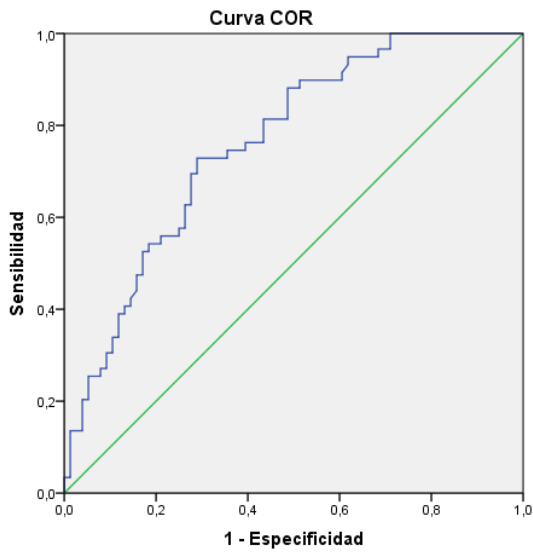
Fig 45: niveles de A1AT y SOD en pacientes con y sin silicosis

En cualquier caso, si establecemos curvas ROC para la determinación de los puntos de corte de las variables con diferencias significativas entre la población con silicosis y sin ella, obtenemos las curvas expuestas a continuación:



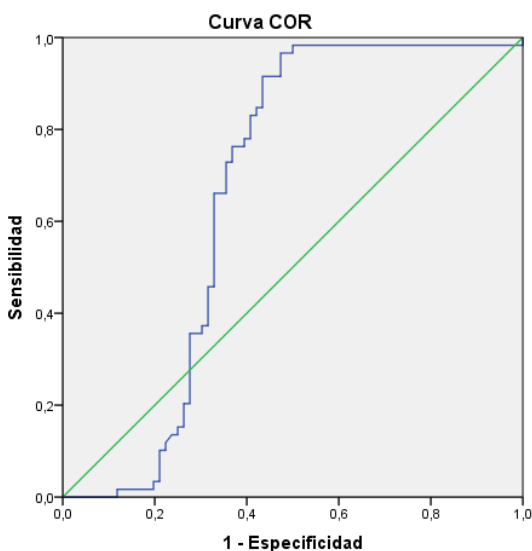
Los segmentos de diagonal se generan mediante empates.

Fig 46: Curva ROC para A1AT (Área: 0,754)



Los segmentos de diagonal se generan mediante empates.

Fig: 47 Curva ROC par IL1RA (Área: 0,792)



Los segmentos de diagonal se generan mediante empates.

Fig 48: Curvas COR para Superóxido dismutasa (Área: 0,664)

Del análisis de los datos previos, encontramos como puntos de corte analíticos de interés los que se reflejan a continuación.

	Valor	Sensibilidad	Especificidad
A1AT	118,5	84,7%	53,6%
IL1RA	389,5	81,4%	56,6%
SOD	0,099	81,4%	59,2%

5. DISCUSIÓN





Como ya hemos visto, existen numerosos estudios tanto en animales de experimentación “in vivo” e “in vitro” que buscan un modelo adecuado para entender los mecanismos subyacentes a la etiología de la silicosis. Han sido numerosos los biomarcadores que han sido evaluados en busca del más idóneo para detectar la existencia de potenciales factores de riesgo para desarrollar silicosis. Idealmente, estos marcadores deberían elevarse en las fases iniciales del desarrollo de la enfermedad, antes del desarrollo de fibrosis pulmonar y de enfermedad irreversible.

Por lo que sabemos, el presente estudio es el primero en el que se realiza de forma simultánea la medición de un elevado número de biomarcadores midiendo además el desbalance proteasa/antiproteasa. Todo ello con una medición extremadamente rigurosa del riesgo pulvígeno en cada una de las categorías laborales implicadas.

El interés del estudio, consiste fundamentalmente en constatar el estado del estrés oxidativo y de la homeostasis de la matriz en una muestra de trabajadores activos expuestos a polvo de sílice con y sin silicosis. Los resultados indican que los pacientes afectados de silicosis presentan niveles más bajos de antiproteasas (A1AT) y



antioxidantes (SOD y GSH-Px) independientemente de la exposición, la edad y el tabaquismo, sugiriendo una alteración de los mecanismos defensivos del pulmón. En este sentido, el estudio previo de Nadif R (Nadif R et al., 2001) ya apuntaba a la diferencia de niveles de GSH-Px en pacientes expuestos a sílice en probable relación con su papel antioxidante como protector ante el daño inducido por ROS.

El presente trabajo intenta realizar un enfoque relativamente novedoso, de tal manera que se ha buscado no sólo la existencia de elevación entre diferentes posibles biomarcadores de exposición, sino también la comprobación de un desbalance entre proteasas y sus antiproteasas específicas como posible mecanismo iniciador de fibrosis pulmonar. Quizás el mayor valor de los hallazgos expuestos no sea únicamente el haber podido objetivar la existencia de alteraciones en el balance oxidación/reducción, sino el que posiblemente este desbalance pudiera ser extendible al resto de procesos fibróticos del pulmón, puesto que como ya hemos dicho, a la luz de los conocimientos fisiopatológicos actuales, el mecanismo común de acción es, probablemente, el reconocimiento por los DAMPs de moléculas externas capaces de generar daño en



el organismo y la puesta en marcha a través fundamentalmente del inflammasoma NLRP3 y la consiguiente liberación de IL y caspasas del proceso iniciador de la fibrosis pulmonar.

En este sentido, el desbalance de los sistemas oxidantes/antioxidantes objetivado por las alteraciones en SOD y GSH-Px bien pueden contribuir a la génesis de ROS, contribuyendo a la activación del inflammasoma.

En la misma dirección apunta el aumento de la IL1 β y su inhibidor IL-1RA. Sabemos que tal y como apunta el trabajo de Cassel L (Cassel L et al., 2008), la liberación de IL1 β por parte de los macrófagos alveolares es esencial para el desarrollo e inicio del proceso fibrótico mediado por el inflammasoma NLRP3. En el presente trabajo, se objetivan niveles elevados de IL1 β en los pacientes con silicosis que, sin embargo, no llegan a tener significación estadística ($p=0,1$) junto con disminución significativa ($p=0,000$) de su inhibidor IL-1RA.

Aunque la hipótesis resulta atractiva a nivel experimental, no existen apenas estudios que hayan podido confirmar estos datos en sujetos vivos. En los trabajadores expuestos, los cambios



sobrevienen al cabo de muchos años y la cronicidad de la reacción inflamatoria impide identificar la secuencia. El papel que juegan los inhibidores de las proteasas (A1AT y TIMP-1) en la producción del enfisema pulmonar parece bien establecido. Sin embargo, su papel en la inducción de la lesión silicótica no ha sido descrito hasta el momento.

Existen también, existen investigaciones recientes sobre la silicosis que parecen centrarse en la aparición de enfisema en pacientes expuestos aún en ausencia de tabaquismo. Curiosamente y como ya hemos visto con anterioridad existen trabajos que han vinculado la exposición a sílice con el desarrollo progresivo de limitación crónica al flujo aéreo (LCFA) aún en ausencia de tabaquismo y sin silicosis radiológica. Nuestro estudio apunta claramente en esta línea y sugiere que unos niveles bajos de A1AT y SOD podrían estar involucrados en el desarrollo de la silicosis. Dado que es posible modificar terapéuticamente estos niveles, las implicaciones de nuestros datos resultan, cuando menos alentadores. Igualmente el screening sistemático de estos marcadores resulta fácilmente accesible a la mayoría de los laboratorios clínicos.



Desde otro punto de vista, no hemos sido capaces, al contrario que otros autores, de encontrar variaciones significativas en las mediciones de $TNF\alpha$ ó metaloproteasas MM9 y sus inhibidores. Resulta difícil aventurar el porque de la discrepancia, aunque cabe reseñar que en el caso del $TNF\alpha$, el análisis inicial de los datos reflejaba diferencias significativas entre los casos y controles. Sólo al intentar tipificar la variable como una variable normal y también en el análisis de regresión logística, con datos apareados por edad, IMC y tabaquismo, los resultados dejaron de ser significativos. Quizás con poblaciones muestrales más amplias, las conclusiones podrían haber sido diferentes.

En cualquier caso, quizás sea necesaria la realización de más estudios basados en la realización de polimorfismos genéticos con medición de las citadas variables para exponer las respuestas individuales en nuestro entorno a los citados marcadores.

El estudio tiene la ventaja de acceder a una población de trabajadores en activo, por lo que, en general, son jóvenes y libres de enfermedad. Estos trabajadores están expuestos a riesgos específicos de su trabajo y muchos de ello se encuentran



desarrollando enfermedad ocupacional, en algunos casos en fases iniciales de la misma. Es, por tanto, el momento óptimo para estudiar los factores determinantes de la misma con fines preventivos. Es como un experimento natural que puede aportar valiosa información.

Los inconvenientes del estudio son, por una parte, los habituales de los estudios transversales: el sesgo de supervivencia y no poder contar con uno de los criterios de causalidad, la temporalidad. Ello puede limitar la utilidad del estudio al no ser capaz de detectar variaciones individuales con la exposición a lo largo del tiempo, lo que dificulta la validación de los resultados como factor pronóstico.

Por otra parte y en último lugar. A pesar de la alta prevalencia de silicosis en la población estudiada, el número de trabajadores puede ser escaso para algunos análisis.

6. CONCLUSIONES

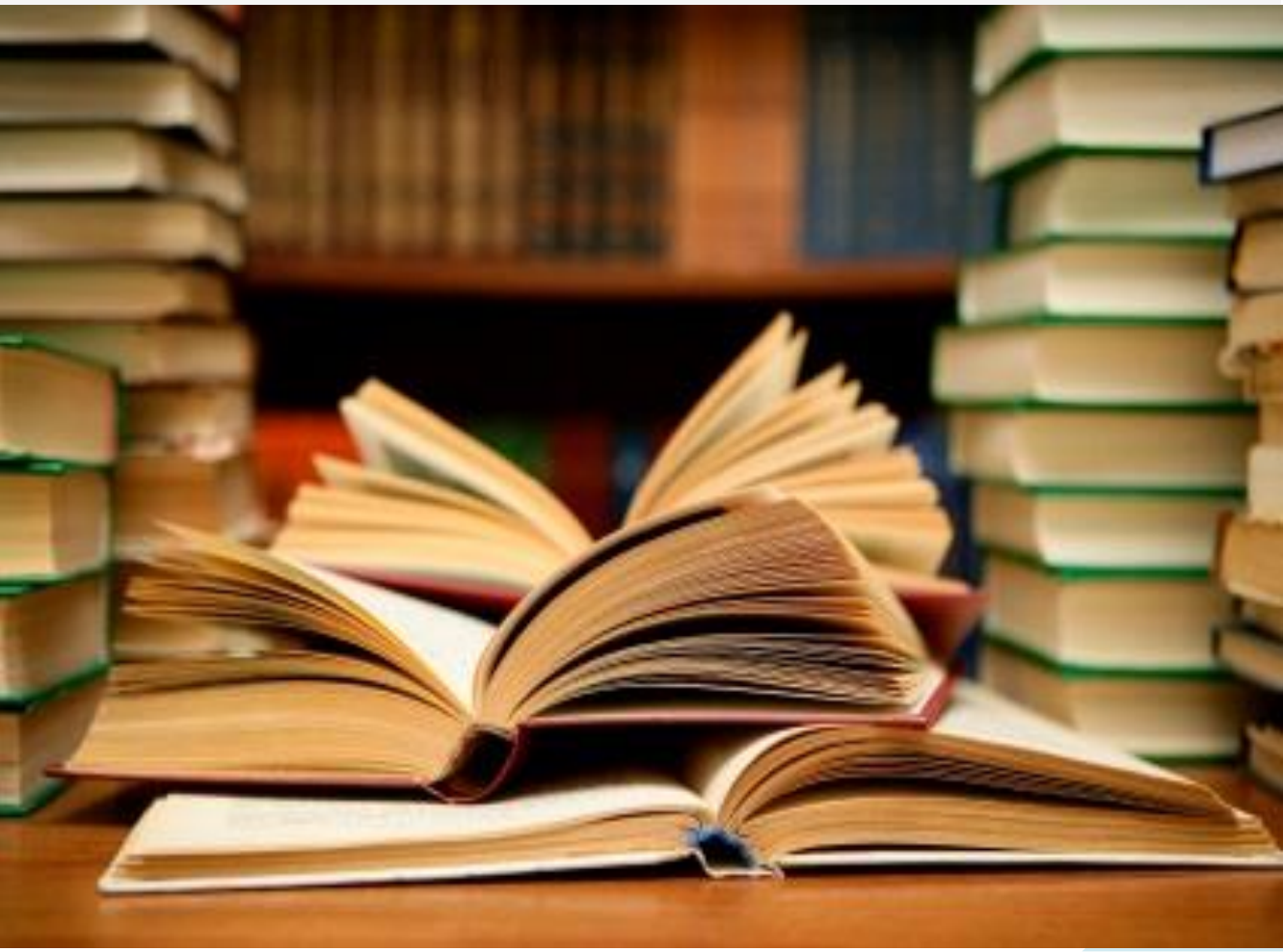




1. Existe un desequilibrio entre proteasas/antiproteasas en pacientes con silicosis.
2. La combinación de marcadores bioquímicos relacionados con el desarrollo de enfermedad pulmonar más probable es la que afecta a los sistemas f2 isoprostano/superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa así como elastasa de los neutrófilos y su inhibidor alfa-1-antitripsina.
3. El desequilibrio en el sistema elastasa de los neutrófilos y su inhibidor alfa-1 antitripsina, podría explicar la existencia de destrucción parenquimatosa y aparición de enfisema pulmonar en pacientes expuestos a sílice.
4. La alteración a nivel del IL1RA como inhibidor de la IL α podría justificarse por la validez del inflammasoma NLRP3 como instrumento necesario para el desencadenamiento de la respuesta fibrótica pulmonar en la silicosis y posiblemente en otras enfermedades inmunes que cursan con depósito de colágeno pulmonar.



7. BIBLIOGRAFÍA





(TNF) from blood monocytes of miners with coal workers' pneumoconiosis. 1997. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:1589–1594.

Absher, M. P., Hemenway, D. R., Leslie, K. O., Trombley, L., and Vacek, P. 1992. Intrathoracic distribution and transport of aerosolized silica in the rat. *Exp. Lung Res.* 18:743–757.

Absher, M., Sjostrand, M., Baldor, L. C., Hemenway, D. R., and Kelley, J. 1993. Patterns of secretion of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) in experimental silicosis. Acute and subacute effects of cristobalite exposure in the rat. *Regul. Immunol.* 5:225–231.

Adamson, I. Y., Frieditis, H., and Bowden, D. H. 1994. Enhanced clearance of silica from mouse lung after instillation of a leukocyte chemotactic factor. *Exp. Lung Res.* 20:223–233.

Aggarwal, A. N., and Behera, D. 2000. Interferon-gamma 1b: Impact of new indications (idiopathic pulmonary fibrosis). *Expert Opin. Pharmacother.* 1:1423–1427.

Akahoshi, T., Oppenheim, J. J., and Matsushima, K. 1988. Interleukin 1 stimulates its own receptor expression on



human fibroblasts through the endogenous production of prostaglandin(s). *J. Clin. Invest.* 82:1219–1224.

Albrecht, C., Adolf, B., Weishaupt, C., Hohr, D., Zeittrager, I., Friemann, J., and Borm, P. J. 2001. Clara-cell hyperplasia after quartz and coal-dust instillation in rat lung. *Inhal. Toxicol.* 13:191–205.

Allen IC, Jania CM, Wilson JE, et al. 2012. Analysis of NLRP3 in the development of allergic airway disease in mice. *J Immunol.* 188(6):2884-2893

Altindag, Z. Z., Baydar, T., Isimer, A., and Sahin, G. 2003. Neopterin as a new biomarker for the evaluation of occupational exposure to silica. *Int. Arch Occup. Environ. Health.* 76:318–322.

Altindag, Z. Z., Sahin, G., Inanici, F., and Hascelik, Z. 1998. Urinary neopterin excretion and dihydropteridine reductase activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 18:107–111.

Altindag, Z. Z., Sahin, G., Isimer, A., Akpek, G., and Kansu, E. 1999. Dihydropteridine reductase activity and neopterin levels in leukemias and lymphomas: Is there any



- correlation between these two parameters? *Leukocyte Lymphoma*. 35:367–374.
- Ameisen, J. C. 1996. The origin of programmed cell death. *Science*. 272:1278–1279.
- Anderegg, U., Vorberg, G., Herrmann, K., and Kaufstein, U. F. 1997. Silica directly induces intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in cultured endothelial cells. *Eur. J. Dermatol.* 7:27–31.
- Andrew, P. J., and Mayer, B. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43, 521–531. doi:10.1016/S0008-6363(99)00115-7
- Anttinen, H., Terho, E. O., Myllyla, R., and Savolainen, E. R. 1986. Two serum markers of collagen biosynthesis as possible indicators of irreversible pulmonary impairment in farmer's lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133:88–93.
- Arawaka H, Honma K, Saito Y, Shida H, Morikubo H, Suganua N et al. 2005. Pleural disease in silicosis: pleural thickening, efusión and invagination. *Radiology*. 236: 685-93.



- Arcangeli, G., Cupelli, V., and Giuliano, G. 2001. Effects of silica on human lung fibroblast in culture. *Sci. Total Environ.* 270:135–139.
- Arredouani, M., Matthijs, P., Van Hoeyveld, E., Kasran, A., Baumann, H., Ceuppens, J. L., and Stevens, E. 2003. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 108:144–151.
- Asleh, R., Marsh, S., Shilkrut, M., Binah, O., Guetta, J., Lejbkowicz, F., Enav, B., Shehadeh, N., Kanter, Y., Lache, O., Cohen, O., Levy, N. S., and Levy, A. P. 2003. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ. Res.* 92:1193–2000.
- Augmentation of pulmonary reactions to quartz inhalation by trace amounts of iron-containing particles. *Environ. Health Perspect.* 105(suppl. 5):1319–1324.
- Aziz ZA, Hansell DM. 2006. Occupational and environmental lung disease: The role of imaging. En: Gevenois P.A., de Vuyst P., editors. *Imaging of Occupational and Environmental Disorders of the Chest*. Berlin: Springer.



Baimanova, A. M. 1999. [Metabolism of serum phospholipids in coal miners]. *Med. Tr. Prom. Ekol.* 10–13.

Basaran, N., Shubair, M., Undeger, U., and Kars, A. 2003. Monitoring of DNA damage in foundry and pottery workers exposed to silica by the alkaline Comet assay. *Am. J. Ind. Med.* 43:602–610.

Basu S, Stuckler D, Gonsalves G, and Lurie M. 2009. The production of consumption: addressing the impact of mineral mining on tuberculosis in southern Africa. *Global Health.* 5: pp. 11

Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Nuñez G, Hornung V. 2011. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation of the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.* 187:613-617.

Bauernfeind FG, HOrvarth G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D et al. 2009. Cutting edge: NF-kappaB activatng pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* Jul 15: 183(2):787-91



- Bauman, M. D., Jetten, A. M., Bonner, J. C., Kumar, R. K., Bennett, R. A., and Brody, A. R. 1990. Secretion of a platelet-derived growth factor homologue by rat alveolar macrophages exposed to particulates in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 51:327–334.
- Bazzoni, F., and Beutler, B. 1996. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* 334:1717–1725.
- Beamer CA, and Holian A. 2007. Antigen-presenting cell population dynamics during murine silicosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 37: pp. 729-738
- Beamer CA, Migliaccio CT, Jessop F, Trapkus M, Yuan D, and Holian A. 2010. Innate immune processes are sufficient for driving silicosis in mice. *J Leukoc Biol.* 88: pp. 547-557
- Begin, R. O., Cantin, A. M., Boileau, R. D., and Bisson, G. Y. 1987. Spectrum of alveolitis in quartz-exposed human subjects. *Chest* 92:1061–1067.
- Beldent, V. R., Michaud, A., Bonnefoy, C., Chauvet, M.-T. R. S., and Corvol, P. 1995. Cell surface localization of



proteolysis of human endothelial angiotensin I-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 270:28962–28969.

Beneteau-Burnat, B., and Baudin, B. 1991. Angiotensin-converting enzyme: Clinical applications and laboratory investigations on serum and other biological fluids. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 28:337–356.

Bennett, D. A., and Waters, M. D. 2000. Applying biomarker research. *Environ. Health Perspect.* 108:907–910.

Benson, S. C., Belton, J. C., and Scheve, L. G. 1986. Regulation of lung fibroblast proliferation and protein synthesis by bronchiolar lavage in experimental silicosis. *Environ. Res.* 41:61–78.

Berdowska, A., and Zwirska-Korczala, K. 2001. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J. Clin. Pharm. Ther.* 26:319–329.

Bergin CJ, Müller NL, Vedall S, Chan-Yeung M. 1986. CT in silicosis: Correlation with plain films and pulmonary function test. *Am J Roentgenol.* 146: 477-83.

Bernard, A. M., Gonzalez-Lorenzo, J. M., Siles, E., Trujillano, G., and Lauwerys, R. 1994. Early decrease of serum Clara



cell protein in silica-exposed workers. *Eur. Respir. J.* 7:1932–1937.

Bernard, A., and Hermans, C. 1997. Biomonitoring of early effects on the kidney or the lung. *Sci. Total Environ.* 199:205–211.

Bernard, A., Broeckaert, F., Hermans, C., and Knoop, B. 1998. The Clara cell protein, CC16: A biomarker of pulmonary toxicity. In *Biomarkers: Medical and workplace applications*, eds. M. L. Mendelsohn, L. C. Mohr, and J. P. Peeters, pp. 273–283. Washington, DC: Joseph Henry Press.

Bernard, A., Dumont, H., Roels, R., Lauwers, I., Ley, M. D., Strobant, V., and de Hoffman, E. 1993. The molecular mass and concentration of protein 1 or Clara cell protein in biological fluids: A reappraisal. *Clin. Chim. Acta* 223:189–191.

Bernard, A., Marchandise, F. X., Depelchin, S., Lauwerys, R., and Sibille, Y. 1992. Clara cell protein in serum and bronchoalveolar lavage. *Eur. Respir. J.* 5:1231–1238.



- Besnard AG, Guillou N, Tschopp J, et al. 2011. NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy*. 66(8):1047-1057.
- Bezrukavnikova, L. M., Arkhipova, O. G., Neifakh, E. A., and Burlakova, E. B. 1988. [Impairment of lipid peroxidation control in patients with dust-induced lung diseases]. *Vopr. Med. Khim.* 34:18–21.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W. G., Bodden, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J. A. 1993. Matrix metalloproteinases: A review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4:197–250.
- Bissonnette, E., and Rola-Pleszczynski, M. 1989. Pulmonary inflammation and fibrosis in a murine model of asbestosis and silicosis. Possible role of tumor necrosis factor. *Inflammation* 13:329–339.
- Bitterman, P. B., Rennard, S. I., Adelberg, S., and Crystal, R. G. 1983. Role of fibronectin as a growth factor for fibroblasts. *J. Cell Biol.* 97:1925–1932.
- Blackford, J. A., Jr., Jones, W., Dey, R. D., and Castranova, V. 1997. Comparison of inducible nitric oxide synthase gene expression and lung inflammation following



intratracheal instillation of silica, coal, carbonyl iron, or titanium dioxide in rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 51:203–218.

Blakemore, A. I., Tarlow, J. K., Cork, M. J., Gordon, C., Emery, P., and Duff, G. W. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 37:1380–1385.

Bogner, J. R., Matuschke, A., Heinrich, B., Eberle, E., and Goebel, F. D. 1988. Serum neopterin levels as predictor of AIDS. *Klin. Wochenschr.* 66:1015–1018.

Boitelle, A., Gosset, P., Copin, M. C., Vanhee, D., Marquette, C. H., Wallaert, B., Gosselin, B., and Tonnel, A. B. 1997. MCP-1 secretion in lung from nonsmoking patients with coal worker's pneumoconiosis. *Eur. Respir. J.* 10:557–562.

Borges, V. M., Falcao, H., Leite-Junior, J. H., Alvim, L., Teixeira, G. P., Russo, M., Nobrega, A. F., Lopes, M. F., Rocco, P. M., Davidson, W. F., Linden, R., Yagita, H., Zin, W. A., and DosReis, G. A. 2001. Fas ligand triggers pulmonary silicosis. *J. Exp. Med.* 194:155–164.



- Borm, P. J. 1994. Biological markers and occupational lung disease: Mineral dust-induced respiratory disorders. *Exp. Lung Res.* 20:457–470.
- Borm, P. J., and Schins, R. P. 2001. Genotype and phenotype in susceptibility to coal workers' pneumoconiosis. The use of cytokines in perspective. *Eur. Respir. J. Suppl.* 32:127S–133S.
- Borm, P. J., Bast, A., Wouters, E. F., Slangen, J. J., Swaen, G. M., and De Boorder, T. 1986. Red blood cell antioxidant parameters in silicosis. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 58:235–244.
- Borm, P. J., Bast, A., Wouters, E. F., Slangen, J. J., Swaen, G. M., and De Boorder, T. J. 1987. Red blood cell antioxidant parameters in healthy elderly subjects versus silicosis patients. *Free Radical Res. Commun.* 3:117–127.
- Borm, P. J., Meijers, J. M., and Swaen, G. M. 1990. Molecular epidemiology of coal worker's pneumoconiosis: Application to risk assessment of oxidant and monokine generation by mineral dusts. *Exp. Lung Res.* 16:57–71.



- Borm, P. J., Palmen, N., Engelen, J. J., and Buurman, W. A. 1988. Spontaneous and stimulated release of tumor necrosis factor-alpha
- Botelho FM, Bauer CM, Finch D, et al. 2011. IL-1[alpha]/IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice. PLoS ONE. 6(12):e28457.
- Brandt-Rauf, P. W., Smith, S., Hemminki, K., Koskinen, H., Vainio, H., Niman, H., and Ford, J. 1992. Serum oncoproteins and growth factors in asbestosis and silicosis patients. *Int. J. Cancer* 50:881–885.
- Brice, E. A., Friedlander, W., Bateman, E. D., and Kirsch, R. E. 1995. Serum angiotensin-converting enzyme activity, concentration, and specific activity in granulomatous interstitial lung disease, tuberculosis, and COPD. *Chest* 107:706–710.
- Bridge I. Crystalline Silica. 2009. A review of the dose response relationship and environmental risk. *Air Quality and Climate Change.*; 43:17-23.
- Broeckeaert, F., Clippe, A., Knoop, B., Hermans, C., and Bernard, A. 2000. Clara cell secretory protein (CC16):



features as a peripheral lung biomarker. *Ann. NY Acad. Sci.* 923:68–77.

Brookes, A. J. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234:177–186.

Brown, R. C., Munday, D. E., Sawicka, V. M., and Wagner, J. C. 1983. Angiotensin converting enzyme in the serum of rats with experimental silicosis. *Br. J. Exp. Pathol.* 64:286–292.

Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. 2011. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 378(9795):1015-1026

Brusselle, Guy MD, PhD; Provoost, Sharen; Bracke, Ken; Kuchmiy, Anna; Lamkanfi, Mohamed. 2014. *Inflammasomes in Respiratory Disease: From Bench to Bedside.* *Chest.* 145(5):1121-1133

Bucca, C., Veglio, F., Rolla, G., Cacciabue, M., Cicconi, C., Ossola, M., Nuzzi, A., Avolio, G., and Angeli, A. 1984. Serum angiotensin converting enzyme (ACE) in silicosis. *Eur. J. Respir. Dis.* 65:477–480.



- Budanova, L. F., and Danilova, T. N. 1965. [C-Reactive Protein in the Blood Serum in Some Occupational Diseases]. *Ter. Arkh.* 37:102–104.
- Buechner HA, and Ansari A 1969. Acute silico-proteinosis: a new pathologic variant of acute silicosis in sandblasters, characterized by histologic features resembling alveolar proteinosis. *Dis Chest.* 55: pp. 274-278
- Burge P. 2002. How to take an occupational history relevant to lung disease. En: Hendrick D., Burge P., BeckettW Churg A., editors. *Occupational Disorders of the Lung.* Philadelphia: WB Saunders. 25-32.
- Burge P. 2002. How to take an occupational history relevant to lung disease. En: Hendrick D., Burge P., BeckettW Churg A., editors. *Occupational Disorders of the Lung.* Philadelphia: WB Saunders. 25-32.
- Bussolino, F., Breviario, F., Tetta, C., Aglietta, M., Sanavio, F., Mantovani, A., and Dejana, E. 1986. Interleukin 1 stimulates platelet activating factor production in cultured human endothelial cells. *Pharmacol. Res. Commun.* 18(suppl.):133–137.



Cakmak, G. D., Schins, R. P. F., Shi, T., Fenoglio, I., Fubini, B., and Borm, P. A. 2004. In vitro genotoxicity assessment of comercial quartz flours in comparison to standard DQ12 quartz. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207:105–113.

Calabro, S., Arcangeli, G., Cisno, F., Altinier, G., and Giuliano, G. 1990. [The evaluation of serum angiotensin-converting enzyme in silicosis and silicotuberculosis]. *Med. Lav.* 81:283–289.

Cameron, P. M., Limjuco, G. A., Chin, J., Silberstein, L., and Schmidt, J. A. 1986. Purification to homogeneity and amino acid sequence analysis of two anionic species of human interleukin 1. *J. Exp. Med.* 164:237–250.

Capelli, A., Cerutti, C. G., Lusuardi, M., and Donner, C. F. 1997a. Identification of human pulmonary alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:1448–1452.

Capelli, A., Lusuardi, M., Cerutti, C. G., and Donner, C. F. 1997b. Lung alkaline phosphatase as a marker of fibrosis in chronic interstitial disorders. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:249–253.



Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, et al. 2008. The NLRP3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: pp. 9035-9040

Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, et al. 2008. The NLRP3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(26):9035-9040

Castranova, V., and Vallyathan, V. 2000. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Environ. Health Perspect.* 108(suppl. 4):675–684.

Castranova, V., Antonini, J. M., Reasor, M. J., Wu, L., and van Dyke, K. 1996. Oxidant release from pulmonary phagocytes. In *Silica and silica-induced lung diseases*, eds. V. Castranova, W. E. Walker, and V. Vallyathan, pp. 185–195. Boca Raton, FL: CRC Press.

Castranova, V., Porter, D., Millecchia, L., Ma, J. Y., Hubbs, A. F., and Teass, A. 2002. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: Time course of pulmonary reactions. *Mol. Cell Biochem.* 234–235:177–184.

Castranova, V., Vallyathan, V., Ramsey, D. M., McLaurin, J. L., Pack, D., Leonard, S., Barger, M. W., Ma, J. Y., Dalal, N. S., and Teass, A.



- Cavalleri, A., Gobba, F., Bacchella, L., and Ferrari, D. 1991. Evaluation of serum aminoterminal propeptide of type III procollagen as an early marker of the active fibrotic process in asbestos-exposed workers. *Scand. J. Work Environ. Health* 17:139–144.
- Chantry, D., Turner, M., Abney, E., and Feldmann, M. 1989. Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. *J. Immunol.* 142:4295–4300.
- Chariot, P., Couste, B., Guillon, F., Gaudichet, A., Bignon, J., and Brochard, P. 1992. Nonfibrous mineral particles in bronchoalveolar lavage fluid and lung parenchyma from the general population. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146:61–65.
- Chen W, Hnizdo E, Chen JQ, Attfield MD, Gao P, Hearl F, et al. 2005. Risk of silicosis in cohorts of Chinese tin and tungsten miners and pottery workers: An epidemiological study. *Am J Ind Med.* 48:1-9.
- Chen, F., and Shi, X. 2002. NF-kappaB, a pivotal transcription factor in silica-induced diseases. *Mol. Cell Biochem.* 234–235:169–176.
- Chen, F., Deng, H. Y., Ding, G. F., Houg, D. W., Deng, Y. L., and Long, Z. Z. 1994. Excessive production of insulin-



like growth factor-I by silicotic rat alveolar macrophages. *APMIS* 102:581–588.

Chen, F., Lu, Y., Demers, L. M., Rojanasakul, Y., Shi, X., Vallyathan, V., and Castranova, V. 1998. Role of hydroxyl radical in silica-induced NF-kappa B activation in macrophages. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 28:1–13.

Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., and Mountz, J. D. 1994. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263:1759–1762.

Chiesura, P., and Picotti, G. 1958. [C-reactive protein in the serological diagnosis of silicosis & silicotuberculosis.]. *Folia Med. (Napoli)* 41:981–990.

Churg A, Zhou S, Wang X, Wang R, Wright JL. 2009. The role of interleukin-1beta in murine cigarette smoke-induced emphysema and small airway remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 40(4):482-490

Chvapil, M., Stankova, L., and Malshet, V. 1976. Lipid peroxidation as one of the mechanisms of silica fibrogenicity? I. Study with erythrocytes. *Environ. Res.* 11:78–88.



Clay, F. E., Cork, M. J., Tarlow, J. K., Blakemore, A. I., Harrington, C. I., Lewis, F., and Duff, G. W. 1994. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism association with lichen sclerosis. *Hum. Genet.* 94:407–410.

Cobben, N. A., Drent, M., Schols, A. M., Lamers, R. J., Wouters, E. F., and Van Dieijen-Visser, M. P. 1997. Serum lactate dehydrogenase and its isoenzyme pattern in ex-coalminers. *Respir. Med.* 91:616–623.

Cojocaru, M. 1997. Relationship between serum total sialic acid and C-reactive protein in silicosis. *Rom. J. Intern. Med.* 35:77–82.

Cojocaru, M., Spataru, E., Dinu, E., and Niculescu, T. 1995. The role of certain immunologic parameters in silicosis. *Rom. J. Intern. Med.* 33:61–72.

Contrasting bronchoalveolar leukocyte responses in rats inhaling coal mine dust, quartz, or titanium dioxide: effects of coal rank, airborne mass concentration, and cessation of exposure. *Environ. Res.* 52:62–76.

Corbett EL, Churchyard GJ, Clayton TC, et al. 2000. HIV infection and silicosis: the impact of two potent risk factors



on the incidence of mycobacterial disease in South African miners. 14: pp. 2759-2768

Corbett, E. L., Mozzato-Chamay, N., Butterworth, A. E., De Cock, K. M., Williams, B. G., Churchyard, G. J., and Conway, D. J. 2002.

Cowie RL. 1994. The epidemiology of tuberculosis in gold miners with silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 150: pp. 1460-1462

Crook, M. A., Tutt, P., Simpson, H., and Pickup, J. C. 1993. Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* 219:131–138.

Crook, M., Haq, S., Haq, M., and Tutt, P. 1994. The relationship of serum total sialic acid with serum acute phase proteins and lipoprotein (a) in patients with severe hypertriglyceridaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 24:179–181.

D'Andrea, F., Lechi, C., Apostoli, P., Stuppioni, M., Arosio, E., and Boninsegna, F. 1979. [Behavior of plasma ACE (angiotensin-converting enzyme) in pulmonary silicosis]. *Med. Lav.* 70:369–374.

Dalal, N. S., Jafari, B., Petersen, M., Green, F. H., and Vallyathan, V. 1991. Presence of stable coal radicals in



autopsied coal miners' lungs and its possible correlation to coal workers' pneumoconiosis. *Arch. Environ. Health* 46:366–372.

Dalal, N. S., Shi, X. L., and Vallyathan, V. 1990. Role of free radicals in the mechanisms of hemolysis and lipid peroxidation by silica: Comparative ESR and cytotoxicity studies. *J. Toxicol. Environ. Health* 29:307–316.

Daniel, L. N., Mao, Y., and Saffiotti, U. 1993. Oxidative DNA damage by crystalline silica. *Free Radical Biol. Med.* 14:463–472.

Das, T., Sen, A. K., Kempf, T., Pramanik, S. R., and Mandal, C. 2003. Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological conditions. *Biochem. J.* 373:345–355.

Davis, G. S., Holmes, C. E., Pfeiffer, L. M., and Hemenway, D. R. 2001. Lymphocytes, lymphokines, and silicosis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20(suppl. 1):53–65.

Davis, G. S., Pfeiffer, L. M., and Hemenway, D. R. 1998. Persistent overexpression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in murine silicosis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 17:99–114.



- Davis, G. S., Pfeiffer, L. M., and Hemenway, D. R. 1999. Expansion of interferon-gamma-producing lung lymphocytes in mouse silicosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20:813–824.
- Davis, G. S., Pfeiffer, L. M., and Hemenway, D. R. 2000. Interferon-gamma production by specific lung lymphocyte phenotypes in silicosis in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22:491–501.
- de Vuyst, P., Dumortier, P., Leophonte, P., Weyer, R. V., and Yernault, J. C. 1987. Mineralogical analysis of bronchoalveolar lavage in talc pneumoconiosis. *Eur. J. Respir. Dis.* 70:150–156.
- Dee PM, Suratt P, Winm W. 1978. The radiographic findings in acute silicosis. *Radiology.* 126: 359-63.
- Delanghe, J. R., and Langlois, M. R. 2002. Haptoglobin polymorphism and body iron stores. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40:212–216. Desaki, M., Takizawa, H., Kasama, T., Kobayashi, K., Morita, Y., and Yamamoto, K. 2000. Nuclear factor-kappa b activation in silica-induced interleukin 8 production by human bronchial epithelial cells. *Cytokine* 12:1257–1260.



Dethloff, L. A., Gilmore, L. B., Gladen, B. C., George, G., Chhabra, R. S., and Hook, G. E. 1986. Effects of silica on the composition of the pulmonary extracellular lining. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 84:66–83.

DiMatteo, M., Antonini, J. M., Van Dyke, K., and Reasor, M. J. 1996. Characteristics of the acute-phase pulmonary response to silica in rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 47:93–108.

Dinarello, C. A. 1988. Biology of interleukin 1. *FASEB J.* 2:108–115.

Doerner AM, and Zuraw BL. 2009: TGF-b1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1b but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res.*; 10: pp. 100

Donaldson, K., Brown, G. M., Brown, D. M., Robertson, M. D., Slight, J., Cowie, H., Jones, A. D., Bolton, R. E., and Davis, J. M. 1990.

Donaldson, K., Brown, G. M., Brown, D. M., Slight, J., and Li, X. Y. 1992. Epithelial and extracellular matrix injury in quartz-inflamed lung: Role of the alveolar macrophage. *Environ. Health Perspect.* 97:221–224.



Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, and Tschopp J. 2008. Innate immune activation through NLRP3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 320: pp. 674-677

Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. 2008. Innate immune activation through NLRP3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 320(5876):674-677.

Doyle, I. R., Hermans, C., Bernard, A., Nicholas, T. E., and Bersten, A. D. 1998. Clearance of Clara cell secretory protein 16 (CC16) and surfactant proteins A and B from blood in acute respiratory failure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 158:1528–1535.

Drenth JP and Van der MEER JW. 2006. The Inflammasome — A Linebacker of Innate Defense. *N Engl J Med*. Aug 17;355(7):730-2

Driscoll, K. E. 1994. Macrophage inflammatory proteins: Biology and role in pulmonary inflammation. *Exp. Lung Res*. 20:473–490.



Driscoll, K. E. 2000. TNF α and MIP-2: Role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress. *Toxicol. Lett.* 112–113:177–183.

Driscoll, K. E., and Maurer, J. K. 1991. Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: Potential biomarkers of pulmonary toxicity. *Toxicol. Pathol.* 19:398–405.

Driscoll, K. E., Carter, J. M., Hassenbein, D. G., and Howard, B. 1997. cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ. Health Perspect.* 105(suppl. 5):1159–1164.

Driscoll, K. E., Carter, J. M., Howard, B. W., Hassenbein, D., Burdick, M., Kunkel, S. L., and Strieter, R. M. 1998. Interleukin-10 regulates quartz-induced pulmonary inflammation in rats. *Am. J. Physiol.* 275:L887–L894.

Driscoll, K. E., Hassenbein, D. G., Carter, J. M., Kunkel, S. L., Quinlan, T. R., and Mossman, B. T. 1995. TNF α and increased chemokine expression in rat lung after particle exposure. *Toxicol. Lett.* 82–83:483–489.

Driscoll, K. E., Hassenbein, D. G., Carter, J., Poynter, J., Asquith, T. N., Grant, R. A., Whitten, J., Purdon, M. P., and



- Takigiku, R. 1993. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: Expression by
- Driscoll, K. E., Howard, B. W., Carter, J. M., Asquith, T., Johnston, C., Detilleux, P., Kunkel, S. L., and Isfort, R. J. 1996. Alpha-quartz-induced chemokine expression by rat lung epithelial cells: Effects of in vivo and in vitro particle exposure. *Am. J. Pathol.* 149:1627–1637.
- Driscoll, K. E., Howard, B. W., Carter, J. M., Janssen, Y. M., Mossman, B. T., and Isfort, R. J. 2001. Mitochondrial-derived oxidants and quartz activation of chemokine gene expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 500:489–496.
- Driscoll, K. E., Lindenschmidt, R. C., Maurer, J. K., Higgins, J. M., and Ridder, G. 1990a. Pulmonary response to silica or titanium dioxide: Inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2:381–390.
- Driscoll, K. E., Maurer, J. K., Lindenschmidt, R. C., Romberger, D., Rennard, S. I., and Crosby, L. 1990b. Respiratory tract responses to dust: Relationships between dust burden, lung injury, alveolar macrophage fibronectin release, and the development of pulmonary fibrosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106:88–101.



- Dubois, C. M., Bissonnette, E., and Rola-Pleszczynski, M. 1989. Asbestos fibers and silica particles stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor. Autoregulatory role of leukotriene B4. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:1257–1264.
- Dubravec, D. B., Spriggs, D. R., Mannick, J. A., and Rodrick, M. L. 1990. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6758–6761.
- Duffin, R., Gilmour, P. S., Schins, R. P., Clouter, A., Guy, K., Brown, D. M., MacNee, W., Borm, P. J., Donaldson, K., and Stone, V. 2001. Aluminium lactate treatment of DQ12 quartz inhibits its ability to cause inflammation, chemokine expression, and nuclear factor-kappaB activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176:10–17.
- Dufresne, A., Loosereewanich, P., Begin, R., Dion, C., Ecobichon, D., Muir, D. C., Ritchie, A. C., and Perrault, G. 1998. Tentative explanatory variable of lung dust concentration in gold miners exposed to crystalline silica. *J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol.* 8:375–398.
- Dumortier, P., De Vuyst, P., and Yernault, J. C. 1989. Non-fibrous inorganic particles in human bronchoalveolar



lavage fluids. *Scan. Microsc.* 3:1207–1216; discussion 1217–1218.

Dunn, C. J., Hardee, M. M., Gibbons, A. J., Staite, N. D., and Richard, K. A. 1989. Local pathological responses to slow-release recombinant interleukin-1, interleukin-2 and gamma-interferon in the mouse and their relevance to chronic inflammatory disease. *Clin. Sci. (Lond.)* 76:261–263.

Ehrlich RI, Myers JE, te Water Naude JM, Thompson ML, Churchyard GJ. 2011. Lung function loss in relation to silica dust exposure in South African gold miners. *Occup Environ Med.* 68: pp. 96-101

Eickelberg, O., Pansky, A., Koehler, E., Bihl, M., Tamm, M., Hildebrand, P., Perruchoud, A. P., Kashgarian, M., and Roth, M. 2001. Molecular mechanisms of TGF-(beta) antagonism by interferon (gamma) and cyclosporine A in lung fibroblasts. *FASEB J.* 15:797–806.

Eklund, A., Blaschke, E., and Danielsson, B. 1987. Subcellular localization of angiotensin-converting enzyme in the human alveolar macrophage. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 47:47–54.



- Eltom S, Stevenson CS, Rastrick J, et al. 2011. P2X7 receptor and caspase 1 activation are central to airway inflammation observed after exposure to tobacco smoke. *PLoS ONE*. 6(9):e24097
- Engelen, J. J., Borm, P. J., van Sprundel, M., and Leenaerts, L. 1990. Blood anti-oxidant parameters at different stages of pneumoconiosis in coal workers. *Environ. Health Perspect.* 84:165–172.
- Evelo, C. T., Bos, R. P., and Borm, P. J. 1993. Decreased glutathione content and glutathione S-transferase activity in red blood cells of coal miners with early stages of pneumoconiosis. *Br. J. Ind. Med.* 50:633–636.
- Fernandez Jorge, M. A., and Alonso Mallo, E. 1994. [Angiotensin-converting enzyme (ACE) in sarcoidosis, tuberculosis, silicosis, and coal mining workers]. *An. Med. Interna* 11:588–590.
- Fernandez Rego, G., Ocio Achaerandio, G., Gonzalez Cuervo, V., Rodriguez Menendez, C., Martinez Gonezalez, C., and Alvarez Alvarez, C. 1991. Presence of acute phase response in coal workers' pneumoconiosis. *Br. J. Ind. Med.* 48:193–195.



- Ferrer, J., Orriols, R., Tura, J. M., Lirola, J., Xaus, C., and Vidal, X. 1994. Energy-dispersive X-ray analysis and scanning electron microscopy of pleura. Study of reference, exposed non-pneumoconiotic, and silicotic populations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149:888–892.
- Finkelstein MM. 2000. Silica, Silicosis and Lung Cancer: A Risk Assessment. *Am J Ind Med.* 38: 8-18.
- Franchi L, Eigenbrod T. Muñoz-Planillo R, Nuñez G. 2009. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat. Immunol.* 10;241–247
- Fraser RS, Müller NL, Coldman N, Paré PD. 1999. Inhalación de polvo inorgánico (neumoconiosi). En: Fraser RS, Paré DP (eds). *Diagnosis of diseases of the chest.* 4^o ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. P. 2374-402.
- Friemann, J., Albrecht, C., Breuer, P., Grover, R., and Weishaupt, C. 1999. Time-course analysis of type II cell hyperplasia and alveolar bronchiolization in rats treated with different particulates. *Inhal. Toxicol.* 11:837–854.



Fujita, J., Obayashi, Y., Yamadori, I., Ohtsuki, Y., Miyawaki, H., Hojo, S., Furukawa, Y., and Takahara, J. 1998. Marked elevation of CA19-9 in a patient with idiopathic pulmonary fibrosis: CA19-9 as a bad prognostic factor. *Respirology* 3:211–214.

Funahashi, A., Pintar, K., and Siegesmund, K. A. 1975. Identification of foreign material in lung by energy dispersive x-ray analysis. A new approach to silicosis. *Arch. Environ. Health* 30:285–289.

Funahashi, A., Schlueter, D. P., Pintar, K., and Siegesmund, K. A. 1984. Value of in situ elemental microanalysis in the histologic diagnosis of silicosis. *Chest* 85:506–509.

Funahashi, A., Siegesmund, K. A., Dragen, R. F., and Pintar, K. 1977. Energy dispersive x-ray analysis in the study of pneumoconiosis. *Br. J. Ind. Med.* 34:95–101.

Gabor, S., Anca, Z., and Zugravu, E. 1975. In vitro action of quartz on alveolar macrophage lipid peroxides. *Arch. Environ. Health* 30:499–501.

Gabor, S., and Anca, Z. 1974. Effect of silica on lipid peroxidation in the red cells. *Int. Arch. Arbeitsmed.* 32:327–332.



- Garbisa, S., Ballin, M., Daga-Gordini, D., Fastelli, G., Naturale, M., Negro, A., Semenzato, G., and Liotta, L. A. 1986. Transient expression of type IV collagenolytic metalloproteinase by human mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 261:2369–2375.
- Garn, H., Friedetzky, A., Davis, G. S., Hemenway, D. R., and Gemsa, D. 1997. T-lymphocyte activation in the enlarged thoracic lymph nodes of rats with silicosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16:309–316.
- Garn, H., Friedetzky, A., Kirchner, A., Jager, R., and Gemsa, D. 2000. Experimental silicosis: A shift to a preferential IFN-gamma-based Th1 response in thoracic lymph nodes. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278:L1221–L1230.
- Gasse P, Mary C, Guenon I, et al. 2007. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 117: pp. 3786-3799
- Gaudichet, A., Pairon, J. C., Malandain, O., Couste, B., Brochard, P., and Bignon, J. 1987. [Mineralogical study of non-fibrous particles in bronchoalveolar lavage fluid]. *Rev. Mal. Respir.* 4:237–243.



- Gauldie, J., Jordana, M., and Cox, G. 1993. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Thorax* 48:931–935.
- Gaultier, M., Guyotjeannin, C., and Fournier, E. 1959. [Research on C-reactive protein of patients with pulmonary silicosis.]. *Arch. Mal. Prof.* 20:90–94.
- Gavella, M., Lipovac, V., Car, A., Vucic, M., Sokolic, L., and Rakos, R. 2003. Serum sialic acid in subjects with impaired glucose tolerance and in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol.* 40:95–100.
- Gery, I., Davies, P., Derr, J., Krett, N., and Barranger, J. A. 1981. Relationship between production and release of lymphocyte-activating factor (interleukin 1) by murine macrophages. 1. Effects of various agents. *Cell. Immunol.* 64:293–303.
- Ghio, A. J., and Quigley, D. R. 1994. Complexation of iron by humic-like substances in lung tissue: Role in coal workers' pneumoconiosis. *Am. J. Physiol.* 267:L173–L179.
- Ghio, A. J., Jaskot, R. H., and Hatch, G. E. 1994. Lung injury after silica instillation is associated with an accumulation of iron in rats. *Am. J. Physiol.* 267:L686–L692.



Ghio, A. J., Kennedy, T. P., Schapira, R. M., Crumbliss, A. L., and Hoidal, J. R. 1990. Hypothesis: Is lung disease after silicate inhalation caused by oxidant generation? *Lancet* 336:967–969.

Ghio, A. J., Kennedy, T. P., Whorton, A. R., Crumbliss, A. L., Hatch, G. E., and Hoidal, J. R. 1992. Role of surface complexed iron in oxidant generation and lung inflammation induced by silicates. *Am. J. Physiol.* 263:L511–L518.

Ghio, A. J., Pritchard, R. J., Lehmann, J. R., Winsett, D. W., and Hatch, G. E. 1996. Lung inflammation after exposure to nonfibrous silicates increases with chelatable [Fe³⁺]. *J. Toxicol. Environ. Health* 49:11–28.

Ghislandi, E. 1958. [C reactive protein in silicosis and silicotuberculosis.]. *Med. Lav.* 49:173–181. Giamello, E., Fubini, B., Volante, M., and Costa, D. 1990. Surface oxygen radicals originating via redox reactions during the mechanical activation of crystalline SiO₂ in hydrogen peroxide. *Colloids Surfaces* 45:155–165.

Gieseg, S. P., Whybrow, J., Glubb, D., and Rait, C. 2001. Protection of U937 cells from free radical damage by the



macrophage synthesized antioxidant 7,8-dihydroneopterin. *Free Radical Res.* 35:311–318.

Gilligan, D. M., O'Connor, C. M., Ward, K., Moloney, D., Bresnihan, B., and FitzGerald, M. X. 1990. Bronchoalveolar lavage in patients with mild and severe rheumatoid lung disease. *Thorax* 45:591–596.

Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U. P. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 74:111–122.

Gossart, S., Cambon, C., Orfila, C., Seguelas, M. H., Lepert, J. C., Rami, J., Carre, P., and Pipy, B. 1996. Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF α production in rat lung inflammation induced by silica. *J. Immunol.* 156:1540–1548.

Gosset, P., Lassalle, P., Vanhee, D., Wallaert, B., Aerts, C., Voisin, C., and Tonnel, A. B. 1991. Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 by human alveolar macrophages exposed in vitro to coal mine dust. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:431–436.



- Graves IA. 2000. Not-so-simple silicosis: a case for public health action. *Am J Ind Med.*37:245-51.
- Greaves IA. Not so simple silicosis. 2000. A case for public health action. *Am J Ind Med.* 37:245-51.
- Greenberg MI, Waksman J, and Curtis J. 2007. Silicosis: a review. *Dis Mon.* 53: pp. 394-416
- Greenberg, D. A. 1993. Linkage analysis of “necessary” disease loci versus “susceptibility” loci. *Am. J. Hum. Genet.* 52:135–143.
- Greenberger, M. J., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Danforth, J. M., Goodman, R. E., and Standiford, T. J. 1995. Neutralization of IL-10 increases survival in a murine model of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Immunol.* 155:722–729.
- Gronhagen-Riska, C. 1979. Angiotensin-converting enzyme. I. Activity and correlation with serum lysozyme in sarcoidosis, other chest or lymph node diseases and healthy persons. *Scand. J. Respir. Dis.* 60:83–93.
- Gronhagen-Riska, C., Kurppa, K., Fyhrquist, F., and Selroos, O. 1978. Angiotensin-converting enzyme and lysozyme in silicosis and asbestosis. *Scand. J. Respir. Dis.* 59:228–231.



Guidelines for the use of the ILO International Classification of Radiographs of Pneumoconioses. Occupational Safety and Health series No 22. Rev 2011. Geneva International Labour Office.

Gulumian, M. 1999. The role of oxidative stress in diseases caused by mineral dusts and fibres: Current status and future of prophylaxis and treatment. *Mol. Cell. Biochem.* 196:69–77.

Guo, W. X., Li, G. H., Zheng, S. Q., and Lin, Z. N. 1995. Effects of silica on serum phospholipid, lipid peroxide and morphological characteristics of rat lung. *Biomed. Environ. Sci.* 8:169–175.

Guoping, C., Fan, P., Jingxi, S., Xiaoping, L., Shiqin, J., and Yuri, L. 1997. Purification and characterization of a silica-induced bronchoalveolar lavage protein with fibroblast growth-promoting activity. *J. Cell. Biochem.* 67:257–264.

Gupta, G. S., and Kaw, J. L. 1982. Formation of lipid peroxides in the subcellular fractions of silicotic lungs in rats. *Eur. J. Respir. Dis.* 63:183–187.

Gurujeyalakshmi, G., and Giri, S. N. 1995. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in



bleomycin-mouse model of lung fibrosis: Downregulation of TGF-beta and procollagen I and III gene expression. *Exp. Lung Res.* 21:791–808.

Habu,H.,Saito,N.,Sato,Y.,Takeshita,K.,Sunagawa,M., Endo, M.1990. Results of surgery in patients with gastric cancer extending to the adjacent organs. *Hepatogastroenterology* 37, 417–420

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T et al. 2008. The NLRP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.* 9: 857–865

Hamada, H., Vallyathan, V., Cool, C. D., Barker, E., Inoue, Y., and Newman, L. S. 2000. Mast cell basic fibroblast growth factor in silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:2026–2034.

Hamilton RF, Thakur SA, and Holian A. 2008. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med.* 44: pp. 1246-1258

Haq, M., Haq, S., Tutt, P., and Crook, M. 1993. Serum total sialic acid and lipid-associated sialic acid in normal individuals and patients with myocardial infarction, and



their relationship to acute phase proteins. *Ann. Clin. Biochem.* 30(Pt 4):383–386.

Harris, H. 1980. *Principles of human biochemical genetics*. Amsterdam: Elsevier North Holland.

Hata, J., Aoki, K., Mitsuhashi, H., and Uno, H. 2003. Change in location of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINCs) in pulmonary silicosis. *Exp. Mol. Pathol.* 75:68–73.

Hausladen, J. M., Davis, E. C., Pierce, R. A., and Mecham, R. P. 1998. Formation of the pulmonary vasculature: Elastic fiber proteins as markers of cellular differentiation and vascular development. *Chest* 114:6S.

Health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica. 2002. Cincinnati, OH: Department of Health and Human Services.

Health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica. 2002. Cincinnati, OH: Department of Health and Human Services.

Hedenborg, M., and Klockars, M. 1989. Quartz-dust-induced production of reactive oxygen metabolites by human granulocytes. *Lung* 167:23–32.



- Hemenway, D. R., Absher, M. P., Trombley, L., and Vacek, P. M. 1990. Comparative clearance of quartz and cristobalite from the lung. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 51:363–369.
- Henderson, R. F. 1984. Use of bronchoalveolar lavage to detect lung damage. *Environ. Health Perspect.* 56:115–129.
- Henderson, R. F., Harkema, J. R., Hotchkiss, J. A., and Boehme, D. S. 1991. Effect of blood leucocyte depletion on the inflammatory response of the lung to quartz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109:127–136.
- Henson, P. M. 2003. Possible roles for apoptosis and apoptotic cell recognition in inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29:S70–S76.
- Heppleston, A. G., and Styles, J. A. 1967. Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. *Nature* 214:521–522.
- Hering KG, Tuengerthal S, Kraus T. 2004. Standardized CT/HRCT classification of the German Federal Republic for work and environmental related thoracic diseases. *Radiologe.* 44:500-11.



Hermans, C., Petrek, M., Kolek, V., Weynand, B., Pieters, T., Lambert, M., and Bernard, A. 2001. Serum Clara cell protein (CC16), a marker of the integrity of the air–blood barrier in sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 18:507–514.

Hibbs, M. S., Hoidal, J. R., and Kang, A. H. 1987. Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 80:1644–1650.

Hirota JA, Hirota SA, Warner SM, et al. 2012. The airway epithelium nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3 inflammasome is activated by urban particulate matter. *J Allergy Clin Immunol.* 129(4):1116-1125

Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, et al. 2009. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.*124(4):779-785.

Hiwada, K., Inoue, Y., Takada, Y., Hashimoto, A., Akutsu, H., Kitatani, F., and Kokubu, T. 1987. Direct radioimmunoassay of angiotensin-converting enzyme in sera from patients with pulmonary diseases. *Lung* 165:27–35.



- Hnizdo E, Vallyathan V. 2003. Chronic obstructive pulmonary disease due to occupational exposure to silica dust: a review of epidemiological and pathological evidence. *Occup Environ Med.* Apr;60(4):237-43
- Hochberg, I., Roguin, A., Nikolsky, E., Chanderashekhar, P. V., Cohen, S., and Levy, A. P. 2002. Haptoglobin phenotype and coronary artery collaterals in diabetic patients. *Atherosclerosis* 161:441–446. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells síndrome. *Nat Genet.* Nov;29(3):301-5.
- Hohlbaum, A. M., Moe, S., and Marshak-Rothstein, A. 2000. Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J. Exp. Med.* 191:1209–1220.
- Holley, J. A., Janssen, Y. M., Mossman, B. T., and Taatjes, D. J. 1992. Increased manganese superoxide dismutase protein in type II epithelial cells of rat lungs after inhalation of crocidolite asbestos or cristobalite silica. *Am. J. Pathol.* 141:475–485.



Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NLRP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 9: pp. 847-856

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, et al. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NLRP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* 9(8):847-856.

Hu, W., Zhang, Q., Su, W. C., Feng, Z., Rom, W., Chen, L. C., Tang, M., and Huang, X. 2003. Gene expression of primary human bronchial epithelial cells in response to coal dusts with different prevalence of coal workers' pneumoconiosis. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66:1249–1265.

Huang, C., Li, J., Zhang, Q., and Huang, X. 2002. Role of bioavailable iron in coal dust-induced activation of activator protein-1 and nuclear factor of activated T cells: Difference between Pennsylvania and Utah coal dusts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27:568–574.

Huang, S. L., Su, C. H., and Chang, S. C. 1997. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:1436–1439.



- Huang, X., and Zhang, Q. 2003. Coal-induced interleukin-6 gene expression is mediated through ERKs and p38 MAPK pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191:40–47.
- Huang, X., Fournier, J., Koenig, K., and Chen, L. C. 1998. Buffering capacity of coal and its acid-soluble Fe²⁺ content: Possible role in coal workers' pneumoconiosis. *Chem. Res. Toxicol.* 11:722–729.
- Huang, X., Laurent, P. A., Zalma, R., and Pezerat, H. 1993. Inactivation of alpha 1-antitrypsin by aqueous coal solutions: Possible relation to the emphysema of coal workers. *Chem. Res. Toxicol.* 6:452–458.
- Huang, X., Zalma, R., and Pezerat, H. 1999. Chemical reactivity of the carbon-centered free radicals and ferrous iron in coals: Role of bioavailable Fe²⁺ in coal workers pneumoconiosis. *Free Radical Res.* 30:439–451.
- Huax F. 2007. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 7: pp. 168-173
- Huax, F., Liu, T., McGarry, B., Ullenbruch, M., and Phan, S. H. 2003. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J. Immunol.* 170:2083–2092.



Huaux, F., Louahed, J., Hudspith, B., Meredith, C., Delos, M., Renauld, J. C., and Lison, D. 1998. Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18:51–59.

Hubbard, A. K., Timblin, C. R., Shukla, A., Rincon, M., and Mossman, B. T. 2002. Activation of NF-kappaB-dependent gene expression by silica in lungs of luciferase reporter mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282:L968–L975.

Huffman, L. J., Judy, D. J. and Castranova, V. 1998. Regulation of nitric oxide production by rat alveolar macrophages in response to silica exposure. *J. Toxicol. Environ. Health A* 53:29–46.

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 68: silica, some silicates, coal dust and para-aramid fibrils. Lyon. 1997. International Agency for Research on Cancer

Identification, cellular localization, isolation, and characterization of human Clara cell-specific 10 KD protein. *J. Histochem. Cytochem.* 36:73–80.



- Igic, R., Erdos, E. G., Yeh, H. S., Sorrells, K., and Nakajima, T. 1972. Angiotensin I converting enzyme of the lung. *Circ. Res.* 31 (suppl. 2):51–61.
- Ilyer, R., Hamilton, R. F., Li, L., and Holian, A. 1996. Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages.
- Ilzecka, J. 1996. The biological role of haptoglobin and behaviour of this protein in different diseases, with special attention paid to brain stroke. *Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska [Med.]* 51:115–121.
- Imaoka H, Hoshino T, Takei S, et al. 2008. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur Respir J.* 31(2):287-297.
- Inoue, Y., Hashimoto, A., Takada, Y., Nishimura, K., Hiwada, K., and Kokubu, T. 1987. Angiotensin converting enzyme in sarcoidosis and in silicosis. *Clin. Exp. Hypertens. A* 9:481–485.
- Jagirdar, J., Begin, R., Dufresne, A., Goswami, S., Lee, T. C., and Rom, W. N. 1996. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154:1076–1081.



Jajte, J., Lao, I., and Wisniewska-Knypl, J. M. 1987. Enhanced lipid peroxidation and lysosomal enzyme activity in the lungs of rats with prolonged pulmonary deposition of crocidolite asbestos. *Br. J. Ind. Med.* 44:180–186.

Jajte, J., Lao, I., Wisniewska-Knypl, J. M., and Wronska-Nofer, T. 1988. Silica earth provoked lung fibrosis with stimulation of lysosomal enzymes and lipid peroxidation in rats. *Br. J. Ind. Med.* 45:239–245.

Jalloul AS, and Banks DE. 2007. The health effects of silica exposure. In Rom WN (eds): *Environmental and occupational medicine*, 4th edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 365-387

Jalloul AS, and Banks DE. 2007. The health effects of silica exposure. In Rom WN (eds): *Environmental and occupational medicine*, 4th edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 365-387

Janssen, Y. M., Engelen, J. J., Giancola, M. S., Low, R. B., Vacek, P., and Borm, P. J. 1992a. Serum type III procollagen N-terminal peptide in coal miners. *Exp. Lung Res.* 18:1–8.



Janssen, Y. M., Marsh, J. P., Absher, M. P., Hemenway, D., Vacek, P. M., Leslie, K. O., Borm, P. J., and Mossman, B. T. 1992b. Expression of antioxidant enzymes in rat lungs after inhalation of asbestos or silica. *J. Biol. Chem.* 267:10625–10630.

Ji X, Hou Z, Wang T, et al. 2012. Polymorphisms in inflammasome genes and risk of coal workers' pneumoconiosis in a Chinese population. *PLoS ONE.* 7(10):e47949

Jiang PR, Cao Z, Qiu ZL, Pan JW, Zhang N, Wu YF. 2015. Plasma levels of TNF α and MMP-9 in patients with silicosis. *European Review for medical and pharm Sci.* 19:1716-1720.

Johnson RM, Ho YS, Yu D, Kuypers FA, Ravindranath Y, Goyette GW. 2009. The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 48: 519-525.

Johnson, N. F., Haslam, P. L., Dewar, A., Newman-Taylor, A. J., and Turner-Warwick, M. 1986. Identification of inorganic dust particles in bronchoalveolar lavage



macrophages by energy dispersive x-ray microanalysis. *Arch. Environ. Health* 41:133–144.

Johnston, C. J., Driscoll, K. E., Finkelstein, J. N., Baggs, R., O'Reilly, M. A., Carter, J., Gelein, R., and Oberdorster, G. 2000. Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. *Toxicol. Sci.* 56:405–413.

Jordana, M., Ohno, I., Xing, Z., and Gauldie, J. 1993. Cytokines in lung and airways fibrosis. *Reg. Immunol.* 5:201–206.

Jorna, T. H., Schins, R. P., Lenaerts, L., Derhaag, T. J., Wouters, E. F., and Borm, P. J. 1994. Airflow obstruction and monocyte TNF release in coal workers. *Exp. Lung Res.* 20:421–431.

Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. 2005. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid. Redox Signal.* 7:395-403.

Kahlenberg JM, Dubyak GR. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. 2004. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C1100-B.



- Kamal, A. A., Gomaa, A., el Khafif, M., and Hammad, A. S. 1989. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dusts. *Environ. Res.* 49:173–180.
- Kampschmidt, R. F., Worthington, M. L., 3rd, and Mesecher, M. I. 1986. Release of interleukin-1 (IL-1) and IL-1-like factors from rabbit macrophages with silica. *J. Leukocyte Biol.* 39:123–132.
- Kang, J. H., Lewis, D. M., Castranova, V., Rojanasakul, Y., Banks, D. E., Ma, J. Y., and Ma, J. K. 1992. Inhibitory action of tetrandrine on macrophage production of interleukin-1 (IL-1)-like activity and thymocyte proliferation. *Exp. Lung Res.* 18:715–729.
- Kang, J. L., Go, Y. H., Hur, K. C., and Castranova, V. 2000a. Silica-induced nuclear factor-kappaB activation: Involvement of reactive oxygen species and protein tyrosine kinase activation. *J. Toxicol. Environ. Health A* 60:27–46.
- Kang, J. L., Pack, I. S., Hong, S. M., Lee, H. S., and Castranova, V. 2000b. Silica induces nuclear factor-kappa B activation through tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha in RAW264.7 macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169:59–65.



Katsnelson BA, Polzik EV, Privalova LI. 1986. Some aspects of the problem of individual predisposition to silicosis. *Environ Health Perspect.* 68:175-85.

Keane, M. P., Belperio, J. A., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. 2001. IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281:L92–L97.

Keller M, Rüegg A, Werner S, and Beer HD. 2008. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* 132: pp. 818-831

Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer Hd. 2008. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell.* 132:818-831.

Kelley, J. 1990. Cytokines of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:765–788.

Kelly, M., Kolb, M., Bonniaud, P., and Gauldie, J. 2003. Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Curr. Pharm. Design* 9:39–49.

Kilian, P. L., Kaffka, K. L., Stern, A. S., Woehle, D., Benjamin, W. R., Dechiara, T. M., Gubler, U., Farrar, J. J., Mizel, S. B., and Lomedico, P. T. 1986. Interleukin 1 alpha



and interleukin 1 beta bind to the same receptor on T cells. *J. Immunol.* 136:4509–4514.

Kim, J. K., Lee, W. K., Lee, E. J., Cho, Y. J., Lee, K. H., Kim, H. S., Chung, Y., Kim, K. A., and Lim, Y. 1999a. Mechanism of silica- and titanium dioxide-induced cytotoxicity in alveolar macrophages. *J. Toxicol. Environ. Health A* 58:437–450.

Kim, K. A., Cho, Y. Y., Cho, J. S., Yang, K. H., Lee, W. K., Lee, K. H., Kim, Y. S., and Lim, Y. 2002. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in coal workers' pneumoconiosis. *Mol. Cell Biochem.* 234–235:205–209.

Kim, K. A., Lim, Y., Kim, J. H., Kim, E. K., Chang, H. S., Park, Y. M., and Ahn, B. Y. 1999b. Potential biomarker of coal workers' pneumoconiosis. *Toxicol. Lett.* 108:297–302.

Kim, K. A., Park, C. Y., Lim, Y., and Lee, K. H. 2000. Recent advances in particulate-induced pulmonary fibrosis: For the application of possible strategy experimentally and clinically. *Curr. Drug Targets* 1:297–307.

Kinsella N, Iler NL, Vdal S, Staples C, Abboud RT, Chan-Yeug M. 1990. Emphysema insilicosis: a comparison of smokers with nonsmokers using pulmonary function



testing and computed tomography. *Am Rev Respir Dis.* 141: 1497-500.

Klauser, R. J., Robinson, C. J., Marinkovic, D. V., and Erdos, E. G. 1979. Inhibition of human peptidyl dipeptidase (angiotensin I converting enzyme: kininase II) by human serum albumin and its fragments. *Hypertension* 1:281–286.

Knaapen, A. M., Albrecht, C., Becker, A., Hohr, D., Winzer, A., Haenen, G. R., Borm, P. J., and Schins, R. P. 2002. DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: Role of surface reactivity and neutrophilic inflammation. *Carcinogenesis* 23:1111–1120.

Knaapen, A. M., Borm, P. J., Albrecht, C., and Schins, R. P. 2004. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *Int. J. Cancer* 109:799–809.

Kolb, M., Margetts, P. J., Anthony, D. C., Pitossi, F., and Gauldie, J. 2001. Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 107:1529–1536.

Kopinski P, Balicka-Slusarczyk B, Dyczek A, Szpenchcinski A, Przybylski G, Jarzemska A, Wandtke T, Jankowski M,



- Iwaniec T, Chorostowska-Wynimko J. 2011. Enhanced expression of Fas Ligand (FasL) in the lower airways of patients with fibrotic interstitial lung diseases (ILDs). *Folia Histochemica et cytobiológica*. Vol. 49;4:636-645
- Koskinen, H., Jarvisalo, J., Huuskonen, M. S., Koivula, T., Mutanen, P., and Pitkanen, E. 1983a. Serum lysosomal enzyme activities in silicosis and asbestosis. *Eur. J. Respir. Dis.* 64:182–188.
- Koskinen, H., Jarvisalo, J., Pitkanen, E., Mutanen, P., and Zitting, A. 1984a. Serum beta-N-acetylglucosaminidase and beta-glucuronidase activities in silicosis patients and in workers exposed to silica dust. *Br. J. Dis. Chest* 78:217–224.
- Koskinen, H., Nordman, H., and Froseth, B. 1984b. Serum lysozyme concentration in silicosis patients and workers exposed to silica dust. *Eur. J. Respir. Dis.* 65:481–485.
- Koskinen, H., Tiilikainen, A., and Nordman, H. 1983b. Increased prevalence of HLA-Aw19 and of the phenogroup Aw19, B18 in advanced silicosis. *Chest* 83:848–852.



Kotloff, R. M., Little, J., and Elias, J. A. 1990. Human alveolar macrophage and blood monocyte interleukin-6 production. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3:497–505.

Kovacs, E. J. 1991. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol. Today* 12:17–23.

Kovacs, E. J., and DiPietro, L. A. 1994. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 8:854–861.

Kovarova M, Hesker PR, Jania L, et al. 2012. NLRP1-dependent pyroptosis leads to acute lung injury and morbidity in mice. *J Immunol.* 189(4):2006-2016

Krein, P. M., and Winston, B. W. 2002. Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease. *Chest* 122:289S–293S.

Kreiss, K., Danilovs, J. A., and Newman, L. S. 1989. Histocompatibility antigens in a population based silicosis series. *Br. J. Ind. Med.* 46:364–369.

Kuempel, E. D., Attfield, M. D., Vallyathan, V., Lapp, N. L., Hale, J. M., Smith, R. J., and Castranova, V. 2003. Pulmonary inflammation and crystalline silica in respirable coal mine dust: Dose-response. *J. Biosci.* 28:61–69.



- Kuhn, D. C., and Demers, L. M. 1992. Influence of mineral dust Surface chemistry on eicosanoid production by the alveolar macrophage. *J. Toxicol. Environ. Health* 35:39–50.
- Kumar, R. K., Bennett, R. A., and Brody, A. R. 1988. A homologue of platelet-derived growth factor produced by rat alveolar macrophages. *FASEB J.* 2:2272–2277.
- Kumar, R. K., Velan, G. M., and O’Grady, R. 1994. Epidermal growth factor-like activity in bronchoalveolar lavage fluid in experimental silicosis. *Growth Factors* 10:163–170.
- Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Chensue, S. W., Basha, M., Standiford, T., Ham, J., and Remick, D. G. 1990. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-8 and chemotactic cytokines. *Prog. Clin. Biol. Res.* 349:433–444.
- Kurihara N, and Wada O. 2004. Silicosis and smoking strongly increase lung cancer risk in silica-exposed workers. *Ind Health.* 42: pp. 303-314
- Lacy, F., Gough, D. A., and Schmid-Schönbein, G. W. 1998. Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production.



Free Radic. Biol. Med. 25:720–727.doi: 10.1016/S0891-5849(98)00154-3

Lapenas, D. J., Davis, G. S., Gale, P. N., and Brody, A. R. 1982. Mineral dusts as etiologic agents in pulmonary fibrosis: The diagnostic role of analytical scanning electron microscopy. *Am. J. Clin. Pathol.* 78:701–706.

Lapp, N. L., and Castranova, V. 1993. How silicosis and coal workers' pneumoconiosis develop—A cellular assessment. *Occup. Med.* 8:35–56.

Lardot, C., Delos, M., and Lison, D. 1998. Upregulation of urokinase in alveolar macrophages and lung tissue in response to silica particles. *Am. J. Physiol.* 274:L1040–L1048.

Larivee, P., Cantin, A., Dufresne, A., and Begin, R. 1990. Enzyme activities of lung lavage in silicosis. *Lung* 168:151–158.

Larsen, C. G., Anderson, A. O., Oppenheim, J. J., and Matsushima, K. 1989. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology.* 68:31–36.



- Laskin, D. L., Kimura, T., Sakakibara, S., Riley, D. J., and Berg, R. A. 1986. Chemotactic activity of collagen-like polypeptides for human peripheral blood neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* 39:255–266.
- Lassale, P., Gosset, P., Aerts, C., Benhamou, M., Fortin, F., Wallaert, B., Tonnel, A. B., and Voisin, C. 1989. Alveolar macrophages secretory dysfunctions in coal workers' pneumoconiosis and progressive massive fibrosis. In *Effects of mineral dusts in cells*, eds. B. T.
- Law YW, Leung MC, Leung CC, Yu TS, and Tam CM. 2001. Characteristics of workers attending the pneumoconiosis clinic for silicosis assessment in Hong Kong: retrospective study. *Hong Kong Med J*
- Lee GS, Subramanian N, Kim AI, et al. 2012. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP. *Nature.* 492(7427):123-127
- Lee KS, Jin SM, Lee H, Lee YC. 2004. Imbalance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in toluene diisocyanate-induced asthma. *Clin Exp Allergy.* 34:276-284.



Leigh, J., Wang, H., Bonin, A., Peters, M., and Ruan, X. 1997. Silica-induced apoptosis in alveolar and granulomatous cells in vivo. *Environ. Health Perspect.* 105(suppl. 5):1241–1245.

Lemaire, I., and Ouellet, S. 1996. Distinctive profile of alveolar macrophage-derived cytokine release induced by fibrogenic and nonfibrogenic mineral dusts. *J. Toxicol. Environ. Health* 47:465–478.

Lepe-Zuniga, J. L., and Gery, I. 1984. Production of intra- and extracellular interleukin-1 (IL-1) by human monocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 31:222–230.

LeRoy, E. C., Trojanowska, M. I., and Smith, E. A. 1990. Cytokines and human fibrosis. *Eur. Cytokine Netw.* 1:215–219.

Lesur, O. J., Mancini, N. M., Humbert, J. C., Chabot, F., and Polu, J. M. 1994. Interleukin-6, interferon-gamma, and phospholipid levels in the alveolar lining fluid of human lungs. Profiles in coal worker's pneumoconiosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 106:407–413.

Lesur, O., Bernard, A., Aarsalane, K., Lauwerys, R., Begin, R., Cantin, A., and Lane, D. 1995. Clara cell protein (CC-



16) induces a phospholipase A2-mediated inhibition of fibroblast migration in vitro. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:290–297.

Lesur, O., Cantin, A. M., Tanswell, A. K., Melloni, B., Beaulieu, J. F., and Begin, R. 1992a. Silica exposure induces cytotoxicity and proliferative activity of type II pneumocytes. *Exp. Lung Res.* 18:173–190.

Lesur, O., Melloni, B., Cantin, A. M., and Begin, R. 1992b. Silica-exposed lung fluids have a proliferative activity for type II epithelial cells: A study on human and sheep alveolar fluids. *Exp. Lung Res.* 18:633–654.

Leung CC, Chang KC, Law WS, et al. 2005. Determinants of spirometric abnormalities among silicotic patients in Hong Kong. *Occup Med (Lond).* 55: pp. 490-493.

Leung CC, Chang KC, Law WS, et al. 2005. Determinants of spirometric abnormalities among silicotic patients in Hong Kong. *Occup Med (Lond).* 55: pp. 490-493

Leung CC, Yew WW, Law WS, et al. 2007. Smoking and tuberculosis among silicotic patients. *Eur Respir J.* 29: pp. 745-750



Leung CC, Yew WW, Law WS, et al. 2007: Smoking and tuberculosis among silicotic patients. *Eur Respir J.* 29: pp. 745-750

Li, W., Kumar, R. K., O'Grady, R., and Velan, G. M. 1992. Role of lymphocytes in silicosis: regulation of secretion of macrophage-derived mitogenic activity for fibroblasts. *Int. J. Exp. Pathol.* 73:793–800.

Liebetrau, G., Strausz, J., van Zglinicki, T., and Wiesner, B. 1987. [Initial results with x-ray absorption spectrometry in lung fibrosis]. *Z. Erkr. Atmungsorgane.* 169:33–37.

Lim, Y., Kim, J. H., Kim, K. A., Chang, H. S., Park, Y. M., Ahn, B. Y., and Phee, Y. G. 1999. Silica-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Toxicol. Lett.* 108:335–339.

Lim, Y., Kim, K.-A., and Yun, I.-G. 1998. The measurement of IL-1, IL-8, and TNF α for the diagnosis of pneumoconiosis. In *Advances in the prevention of occupational respiratory diseases*, eds. K. Chiyotani, Y. Hosoda, and Y. Aizawa, pp. 845–848. Amsterdam: Elsevier Science.



- Limper, A. H., and Roman, J. 1992. Fibronectin. A versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection. *Chest* 101:1663–1673.
- Lin, J. 1990. [Studies on serum angiotensin-I-converting enzyme activity of experimental silicosis in rats]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 24:274–276.
- Lindenschmidt, R. C., Driscoll, K. E., Perkins, M. A., Higgins, J. M., Maurer, J. K., and Belfiore, K. A. 1990. The comparison of a fibrogenic and two nonfibrogenic dusts by bronchoalveolar lavage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 102:268–281.
- Liu F, Liu J, Weng D, et al. 2010. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells depletion may attenuate the development of silica-induced lung fibrosis in mice. *PLoS One*. 5: pp. e15404
- Liu, B. C., You, B. R., Liu, Y. Y., Wang, G. F., Miao, Q., and Li, Y. R. 1995a. Ceruloplasmin or fibronectin synergism with quartz dust on stimulating collagen gene transcription in human 2BS fibroblast. *Biomed. Environ. Sci.* 8:246–253.



Liu, K., Situ, R., and Liao, J. 1995b. [The effect of anti basic fibroblast growth factor on the development of experimental silicosis bacillus]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 18:351–353, 383. Lugano, E. M., Dauber, J. H., Elias, J. A., Bashey, R. I., Jimenez, S. A., and Daniele, R. P. 1984. The regulation of lung fibroblast proliferation by alveolar macrophages in experimental silicosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129:767–771.

Lommatzsch M, Cicko S, Müller T, et al. 2010. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 181(9):928-934.

Lopes AJ, Mogami R, Capone D, Tessarollo B, de Melo PL, and Jansen JM. 2008. High-resolution computed tomography in silicosis: correlation with chest radiography and pulmonary function tests. *J Bras Pneumol.* 34: pp. 264-272

Lopes AJ, Mogami R, Capone D, Tessarollo B, de Melo PL, and Jansen JM. 2008. High-resolution computed tomography in silicosis: correlation with chest radiography and pulmonary function tests. *J Bras Pneumol.* 34: pp. 264-272



- Luisetti, M., Bulgheroni, A., Bacchella, L., Pasturenzi, L., and Aprile, C. 1990. Elevated serum procollagen III aminopeptide levels in sarcoidosis. *Chest* 98:1414–1420.
- Lusuardi, M., Capelli, A., Donner, C. F., Capelli, O., and Velluti, G. 1992. Semi-quantitative X-ray microanalysis of bronchoalveolar lavage samples from silica-exposed and nonexposed subjects. *Eur. Respir. J.* 5:798–803.
- Maclaren WM, Soutar CA. 1985. Progressive massive fibrosis and simple pneumoconiosis in exminers, *Br J Ind Med.* 42: 734-40)
- Maly, E. R. 1988. Generation of free oxygen radicals from human polymorphonuclear granulocytes by cytokines from human mononuclear cells, treated with quartz dust DQ12 or coal mine dust TF-1—New aspects in pathogenesis of pneumoconiosis. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg B* 187:142–165.
- Mannetje A, Steenland K, Attfield et al. 2002. Exposure-response analysis and risk assessment for silica and silicosis mortality in a pooled analysis of six cohorts. *Occup Environ Med.* 59:723-28.



- Mannetje A, Steenland K, Checkoway H, et al. 2002. Development of quantitative exposure data for a pooled exposure-response analysis of 10 silica cohorts. *Am J Ind Med.* 42: pp. 73-86
- Mariani, T. J., Arikan, M. C., and Pierce, R. A. 1999. Fibroblast tropoelastin and alpha-smooth-muscle actin expression are repressed by particulate-activated macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha in experimental silicosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21:185–192.
- Mariani, T. J., Crouch, E., Roby, J. D., Starcher, B., and Pierce, R. A. 1995. Increased elastin production in experimental granulomatous lung disease. *Am. J. Pathol.* 147:988–1000.
- Mariani, T. J., Roby, J. D., Mecham, R. P., Parks, W. C., Crouch, E., and Pierce, R. A. 1996. Localization of type I procollagen gene expression in silica-induced granulomatous lung disease and implication of transforming growth factor-beta as a mediator of fibrosis. *Am. J. Pathol.* 148:151–164.
- Mariani, T. J., Sandefur, S., Roby, J. D., and Pierce, R. A. 1998. Collagenase-3 induction in rat lung fibroblasts



requires the combined effects of tumor necrosis factor-alpha and 12-lipoxygenase metabolites: A model of macrophage-induced, fibroblast-driven extracellular matrix remodeling during inflammatory lung injury. *Mol. Biol. Cell.* 9:1411–1424.

Marinelli, W. A., Polunovsky, V. A., Harmon, K. R., and Bitterman, P. B. 1991. Role of platelet-derived growth factor in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:503–504.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* Aug;10(2):417-26.

Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NLRP3 inflammasome. *Nature.* 440: 237–241.

Martinon, F. 2010. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur. J. Immunol.* 40, 616–619. doi:10.1002/eji.200940168



Maselli, R., Grembiale, R. D., Pelaia, G., Cuda, G. 2002. Oxidative stress and lung diseases. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 57:180–181.

Matsushima, K., and Oppenheim, J. J. 1989. Interleukin 8 and MCAF: Novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* 1:2–13.

May, L. T., Ghrayeb, J., Santhanam, U., Tatter, S. B., Sthoeger, Z., Helfgott, D. C., Chiorazzi, N., Grieninger, G., and Sehgal, P. B. 1988.

May, L. T., Santhanam, U., Tatter, S. B., Ghrayeb, J., and Sehgal, P. B. 1989. Multiple forms of human interleukin-6. Phosphoglycoproteins secreted by many different tissues. *Ann. NY Acad. Sci.* 557:114–119; discussion 119–121.

McCanlies E, Landsittel DP, Yucesoy B, Vallyathan V, Luster ML, Sharp DS. 2002. Significance of genetic information in risk assessment and individual classification using silicosis as a case model. *Ann Occup Hyg.* Jun;46(4):375-81

McCanlies, E., Landsittel, D. P., Yucesoy, B., Vallyathan, V., Luster, M. L., and Sharp, D. S. 2002. Significance of genetic information in risk assessment and individual



classification using silicosis as a case model. *Ann. Occup. Hyg.* 46:375–381.

McDonald, J. W., and Roggli, V. L. 1995. Detection of silica particles in lung tissue by polarizing light microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119:242–246.

McGowan, S. E. 1992a. Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *FASEB J.* 6:2895–2904.

McGowan, S. E. 1992b. Influences of endogenous and exogenous TGF-beta on elastin in rat lung fibroblasts and aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 263:L257–L263.

Melloni, B., Lesur, O., Bouhadiba, T., Cantin, A., and Begin, R. 1994. Partial characterization of the proliferative activity for fetal lung epithelial cells produced by silica-exposed alveolar macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 55:574–580.

Melloni, B., Lesur, O., Bouhadiba, T., Cantin, A., Martel, M., and Begin, R. 1996. Effect of exposure to silica on human alveolar macrophages in supporting growth activity in type II epithelial cells. *Thorax* 51:781–786.



Mendall, M. A., Patel, P., Ballam, L., Strachan, D., and Northfield, T. C. 1996. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: A population based cross sectional study. *Br. Med. J.* 312:1061–1065.

Merget R, Bauer T, Küpper HU, et al.. 2002. Health hazards due to the inhalation of amorphous silica. *Arch Toxicol*; 75: pp. 625-634

Misra HP, Fridovich I. 1972. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J Biol Chem.* 247 (10): 3170-3175

Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, et al. 2010. GABRIEL Consortium. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 363(13):1211-1221.

Mohr, C., Davis, G. S., Graebner, C., Hemenway, D. R., and Gemsa, D. 1992. Enhanced release of prostaglandin E2 from macrophages of rats with silicosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6:390–396.

Mohr, C., Gemsa, D., Graebner, C., Hemenway, D. R., Leslie, K. O., Absher, P. M., and Davis, G. S. 1991. Systemic macrophage stimulation in rats with silicosis:



enhanced release of tumor necrosis factor-alpha from alveolar and peritoneal macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:395–402.

Monso, E., Carreres, A., Tura, J. M., Ruiz, J., Fiz, J., Xaus, C., Llatjos, M., and Morera, J. 1997. Electron microscopic microanalysis of bronchoalveolar lavage: A way to identify exposure to silica and silicate dust. *Occup. Environ. Med.* 54:560–565.

Monteverde, A., and Fumagalli, E. 1960. [C-reactive proteins and mucoproteins in silicosis and silicotuberculosis]. *Folia Med. (Napoli)* 43:813–831.

Morfeld, P., Borm, P. J. A., Schins, R. P. F., Lenarts, H., Witte, B., Derwall, R., and Piekarski, C. 2001. Cross sectional study on cytokine production (TNF α , IL-8) in German coalminers with progressive massive fibrosis and in control miners using a rapid wholeblood assay. *Biomarkers* 6:428–439.

Morgenroth, K. 1979. [Determination of organic elements in histological sections (author's transl.)]. *Prax. Klin. Pneumol.* 33 (suppl. 1):615–618.



Mosiewicz J, Myśliński W, Złomaniec G, Czabak-Garbacz R, Krupski W, and Dzida G. 2004. Diagnostic value of high resolution computed tomography in the assessment of nodular changes in pneumoconiosis in foundry workers in Lublin. *Ann Agric Environ Med.* 11: pp. 279-284

Mossman and R. O. Begin, pp. 65–71. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. Lee, H. G., Choi, I., Pyun, K. H., and Park, K. W. 1995. Peritoneal lavage fluids stimulate NIH3T3 fibroblast proliferation and contain increased tumour necrosis factor and IL-6 in experimental silica-induced rat peritonitis. *Clin. Exp. Immunol.* 100:139–144.

Mossman BT, and Churg A. 1998. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 157: pp. 1666-1680.

Mossman BT, Churg A. 1998. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 157: pp. 1666-1680

Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., and Modolell, M. 1998. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187:2103–2108.



- Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez GK. 2013. K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 38(6):1142-1153
- Murillo L, Crusius JB, van Bodegraven AA, Alizadeh BZ, Pena AS. 2002. CARD15 gene and the classification of Crohn's disease. *Immunogenetics*. 54: 59–61
- Murr, C., Baier-Bitterlich, G., Fuchs, D., Werner, E. R., Esterbauer, H., Pfeleiderer, W., and Wachter, H. 1996. Effects of neopterin-derivatives on H₂O₂-induced luminol chemiluminescence: mechanistic aspects. *Free Radical Biol. Med.* 21:449–456.
- Murr, C., Fuchs, D., Gossler, W., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Esterbauer, H., and Wachter, H. 1994. Enhancement of hydrogen peroxide-induced luminol-dependent chemiluminescence by neopterin depends on the presence of iron chelator complexes. *FEBS Lett.* 338:223–226.
- Murr, C., Fuith, L. C., Widner, B., Wirleitner, B., Baier-Bitterlich, G., and Fuchs, D. 1999. Increased neopterin concentrations in patients with cancer: Indicator of oxidative stress? *Anticancer Res.* 19:1721–1728.



Muzemboa BA, Dumavibhata N, Ngatua NR, Eitokua M, Hirota R, Kondo S, et al. 2013. Serum selenium and selenoprotein P in patients with silicosis. *J Trace Elem Med Biol.* 27:40-4

Nadif, R., Bourgkard, E., Dusch, M., Bernadac, P., Bertrand, J. P., Mur, J. M., and Pham, Q. T. 1998. Relations between occupational exposure to coal mine dusts, erythrocyte catalase and $\text{Cu}^{++}/\text{Zn}^{++}$ superoxide dismutase activities, and the severity of coal workers' pneumoconiosis. *Occup. Environ. Med.* 55:533–540.

Nadif, R., Jedlicka, A., Mintz, M., Bertrand, J. P., Kleeberger, S., and Kauffmann, F. 2003. Effect of $\text{TNF}\alpha$ and LTA polymorphisms on biological markers of response to oxidative stimuli in coal miners: a model of gene–environment interaction. Tumour necrosis factor and lymphotoxin alpha. *J. Med. Genet.* 40:96–103.

Nadif, R., Oryszczyn, M. P., Fradier-Dusch, M., Hellier, G., Bertrand, J. P., Pham, Q. T., and Kauffmann, F. 2001. Cross sectional and longitudinal study on selenium, glutathione peroxidase, smoking, and occupational exposure in coal miners. *Occup. Environ. Med.* 58:239–245.



- Nagata, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33:29–55.
- Nagelschmidt G. 1960: The relation between lung dust and lung pathology in pneumoconiosis. *Br J Ind Med.* 17: pp. 247-259
- Nakae S, Komiyama Y, Yokoyama H, et al. 2003. IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int Immunol.*15(4):483-490.
- Nakahira, K, Haspel J, Rathinan VA, Lee SJ, Dolina T, Lam H et al. 2006. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol*; 12:222-230. Doi: 10.1038/ni.1980
- Nakamura, H., Yoshimura, K., Jaffe, H. A., and Crystal, R. G. 1991. Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 266:19611–19617.
- Nario, R. C., and Hubbard, A. K. 1996. Silica exposure increases expression of pulmonary intercellular adhesion



molecule-1 (ICAM-1) in C57Bl/6 mice. *J. Toxicol. Environ. Health* 49:599–617.

Nigam, S. K., Saiyed, H. N., Malaviya, R., Suthar, A. M., Desai, U. M., Venkaiah, K., Sharma, Y. K., and Kashyap, S. K. 1990. Role of circulating immune complexes in the immunopathogenesis of silicosis. *Toxicol. Lett.* 51:315–320.

Norboo T, Angchuk PT, Yahya M, et al. 1991. Silicosis in a Himalayan village population: role of environmental dust. *Thorax*; 46: pp. 341-343.

Nordman, H., Koskinen, H., and Froseth, B. 1984. Increased activity of serum angiotensin-converting enzyme in progressive silicosis. *Chest* 86:203–207.

Nugent, K. M., Dodson, R. F., Idell, S., and Devillier, J. R. 1989. The utility of bronchoalveolar lavage and transbronchial lung biopsy combined with energy-dispersive X-ray analysis in the diagnosis of silicosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140:1438–1441.

Obayashi, Y., Fujita, J., Nishiyama, T., Yoshinouchi, T., Kamei, T., Yamadori, I., Hojo, S., Ohtsuki, Y., Hirashima, M., and Takahara, J. 2000. Role of carbohydrate antigens



- sialyl Lewis (a) (CA19-9) in bronchoalveolar lavage in patients with pulmonary fibrosis. *Respiration* 67:146–152.
- Oettl, K., Wirleitner, B., Baier-Bitterlich, G., Grammer, T., Fuchs, D., and Reibnegger, G. 1999. Formation of oxygen radicals in solutions of 7,8-dihydroneopterin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264:262–267.
- Oghiso, Y., and Kubota, Y. 1986. Enhanced interleukin 1 production by alveolar macrophages and increase in Ia-positive lung cells in silica-exposed rats. *Microbiol. Immunol.* 30:1189–1198.
- Oghiso, Y., and Kubota, Y. 1987. Interleukin 1 production and accessory cell function of rat alveolar macrophages exposed to mineral dust particles. *Microbiol. Immunol.* 31:275–287.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R et al. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 411: 603–606.
- Ohta, K., Nakano, J., Nishizawa, M., Kaneta, M., Nakagome, K., Makino, K., Suzuki, N., Nakajima, M., Kawashima, R., Mano, K., and Miyashita, H. 1997. Suppressive effect of



antisense DNA of platelet-derived growth factor on murine pulmonary fibrosis with silica particles. *Chest* 111:105S.

Ohtsuka, Y., Munakata, M., Ukita, H., Takahashi, T., Satoh, A., Homma, Y., and Kawakami, Y. 1995. Increased susceptibility to silicosis and TNF α production in C57BL/6J mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:2144–2149.

Olbruck, H., Seemayer, N. H., Voss, B., and Wilhelm, M. 1998. Supernatants from quartz dust treated human macrophages stimulate cell proliferation of different human lung cells as well as collagen-synthesis of human diploid lung fibroblasts in vitro. *Toxicol. Lett.* 96–97:85–95.

Ooi CG. 2008. Silicosis and coal workers' pneumoconiosis. En: Müller N.L., Silva C.I., editors. *Imaging of the Chest.* 1st ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier. 1117-36.

Ooi GC, Tsang KW, Cheung TF, et al. 2003. Silicosis in 76 men: qualitative and quantitative CT evaluation—clinical-radiologic correlation study. *Radiology.* 228: pp. 816-825

Orfanos, S. E., Armaganidis, A., Glynos, C., Psevdi, E., Kaltsas, P., Sarafidou, P., Catravas, J. D., Dafni, U. G., Langleben, D., and Roussos, C. 2000. Pulmonary



capillary endothelium-bound angiotensin-converting enzyme activity in acute lung injury. *Circulation* 102:2011–2018.

Orfila, C., Lepert, J. C., Gossart, S., Frisach, M. F., Cambon, C., and Pipy, B. 1998. Immunocytochemical characterization of lung macrophage surface phenotypes and expression of cytokines in acute experimental silicosis in mice. *Histochem. J.* 30:857–867.

Ortiz, L. A., Lasky, J., Gozal, E., Ruiz, V., Lungarella, G., Cavarra, E., Brody, A. R., Friedman, M., Pardo, A., and Selman, M. 2001. Tumor necrosis factor receptor deficiency alters matrix metalloproteinase 13/tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in murine silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:244–252.

Oryszczyn, M. P., Godin, J., Frette, C., Hellier, G., Bertrand, J. P., Pham, Q. T., and Kauffmann, F. 1996. Decrease in selenium status in relation to coal dust exposure. *Am. J. Ind. Med.* 30:281–284.

Otsuki, T., Ichihara, K., Tomokuni, A., Sakaguchi, H., Aikoh, T., Matsuki, T., Isozaki, Y., Hyodoh, F., Kusaka, M., Kita, S., and Ueki, A. 1999. Evaluation of cases with silicosis



using the parameters related to Fas-mediated apoptosis. *Int. J. Mol. Med.* 4:407–411.

Otsuki, T., Sakaguchi, H., Tomokuni, A., Aikoh, T., Matsuki, T., Kawakami, Y., Kusaka, M., Ueki, H., Kita, S., and Ueki, A. 1998. Soluble Fas mRNA is dominantly expressed in cases with silicosis. *Immunology* 94:258–262.

Otsuki, T., Sakaguchi, H., Tomokuni, A., Aikoh, T., Matsuki, T., Isozaki, Y., Hyodoh, F., Kawakami, Y., Kusaka, M., Kita, S., and Ueki, A. 2000. Detection of alternatively spliced variant messages of Fas gene and mutational screening of Fas and Fas ligand coding regions in peripheral blood mononuclear cells derived from silicosis patients. *Immunol. Lett.* 72:137–143.

Overall, C. M., Wrana, J. L., and Sodek, J. 1989. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 264:1860–1869.

Oxman AD, Muir DCF, Shannon HS, Stock SR, Hnizdo E, Lange HJ. 1993. Occupational dust exposure and Chronic pulmonary disease: a systematic overview of the evidence. *Am Rev Respir Dis.* 148: 38-48.



- Ozaki, Y., Ohashi, T., and Kume, S. 1987. Potentiation of neutrophil function by recombinant DNA-produced interleukin 1a. *J. Leukocyte Biol.* 42:621–627.
- Paravicini, T.M, Touyz,R.M. 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *DiabetesCare* 31(Suppl.2), S170–S180.doi:10.2337/dc08-s247
- Pardo, A., Perez-Ramos, J., Segura-Valdez, L., Ramirez, R., and Selman, M. 1999. Expression and localization of TIMP-1, TIMP-2, MMP-13, MMP-2, and MMP-9 in early and advanced experimental lung silicosis. *Ann. NY Acad. Sci.* 878:587–589.
- Pariente, R., Berry, J. P., Gal, P., Cayrol, E., and Brouet, G. 1970. [Study of pulmonary dust particles under the electron microscope and with electronic probe micro analyzer]. *Presse Med.* 78:1627–1628.
- Pariente, R., Berry, J. P., Galle, P., Cayrol, E., and Brouet, G. 1972. A study of pulmonary dust deposits using the electron microscope in conjunction with the electron sound analyser. *Thorax* 27:80–82.



Park HH, Girdler-Brown BV, Churchyard GJ, White NW, Ehrlich RI. 2009. Incidence of tuberculosis and HIV and progression of silicosis and lung function impairment among former Basotho gold miners. *Am J Ind Med* 2009; 52: pp. 901-908

Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Hom A, Bredle, Reinhart K. 1998. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med* Vol. 26. No 4

Patt, L. M., and Houck, J. C. 1983. Role of polypeptide growth factors in normal and abnormal growth. *Kidney Int.* 23:603–610.

Pauwels NS, Bracke KR, Dupont LL, et al. 2011. Role of IL-1[alpha] and the Nlrp3/caspase-1/IL-1[beta] axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD. *Eur Respir J.* 38(5):1019-1028.

Pellaud, J., Schote, U., Arvinte, T., and Seelig, J. 1999. Conformation and self-association of human recombinant transforming growth factor-beta3 in aqueous solutions. *J. Biol. Chem.* 274:7699–7704.



Pendergrass EP. Caldwell Lecture. 1958. 1957- Silicosis and a few of the other pneumoconioses: observation on certain aspects of the problem, with emphasis on the role of the radiologist. *Am J Roentgenol.* 80: 1-41.

Perez-Ramos, J., de Lourdes Segura-Valdez, M., Vanda, B., Selman, M., and Pardo, A. 1999. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160:1274–1282.

Peri, A., Cordella-Miele, E., Miele, L., and Mukherjee, A. B. 1993. Tissue-specific expression of the gene coding for human Clara cell 10- kD protein, a phospholipase A2-inhibitory protein. *J. Clin. Invest.* 92:2099–2109.

Perna, F., Iavarone, M., Skrimpas, S., Mazzarella, G., and Sanduzzi, A. 2002. Detection and qualitative identification of mineral fibers and particles in alveolar macrophages of BAL fluid by SEM and EDXA. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 57:193–195.

Pernis, B., and Vigliani, E. C. 1982. The role of macrophages and immunocytes in the pathogenesis of pulmonary diseases due to mineral dusts. *Am. J. Ind. Med.* 3:133–137.



Perrin-Nadif, R., Auburtin, G., Dusch, M., Porcher, J. M., and Mur, J. M. 1996. Blood antioxidant enzymes as markers of exposure or effect in coal miners. *Occup. Environ. Med.* 53:41–45.

Perrin-Nadif, R., Porcher, J. M., Dusch, M., Mur, J. M., and Auburtin, G. 1998. Erythrocyte antioxidant enzyme activities in coal miners from three French regions. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 71:257–262.

Petrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. 2007. Activation of the NLRP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* 14:1583-9

Petruska, J. M., Wong, S. H., Sunderman, F. W., Jr., and Mossman, B. T. 1990. Detection of lipid peroxidation in lung and in bronchoalveolar lavage cells and fluid. *Free Radical Biol. Med.* 9:51–58.

Pierce, R. A., Mariani, T. J., and Senior, R. M. 1995. Elastin in lung development and disease. *Ciba Found. Symp.* 192:199–212; discussion 212–214.

Pierini, G. 1982. [The use of scanning electron microscopy (SEM) and microanalysis for the detection of crystalline or



amorphous particles in the pulmonary parenchyma]. *G. Ital. Med. Lav.* 4:279–282.

Piguet, P. F. 1990. Is “tumor necrosis factor” the major effector of pulmonary fibrosis? *Eur. Cytokine Netw.* 1:257–258.

Piguet, P. F., and Vesin, C. 1994. Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. *Eur. Respir. J.* 7:515–518.

Piguet, P. F., Collart, M. A., Grau, G. E., Sappino, A. P., and Vassalli, P. 1990. Requirement of tumour necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis. *Nature* 344:245–247.

Piguet, P. F., Kaufman, S., Barazzone, C., Muller, M., Ryffel, B., and Eugster, H. P. 1997. Resistance of TNF/LT α double deficient mice to bleomycin-induced fibrosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 78:43–48.

Pilger, A., Germadnik, D., Schaffer, A., Theiler, A., Pils, P., Sluka, F., Winker, N., and Rudiger, H. W. 2000. 8-Hydroxydeoxyguanosine in leukocyte DNA and urine of



quartz-exposed workers and patients with silicosis. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 73:305–310.

Pintar, K., Funahashi, A., and Siegesmund, K. A. 1976. A diffuse form of pulmonary silicosis in foundry workers. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 100:535–538.

Podor, T. J., Jirik, F. R., Loskutoff, D. J., Carson, D. A., and Lotz, M. 1989. Human endothelial cells produce IL-6. Lack of responses to exogenous IL-6. *Ann. NY Acad. Sci.* 557:374–385; discussion 386–387.

Pohl, W. R., Thompson, A. B., Kohn, H., Losch, S., Umek, H., Legenstein, E., Kummer, F., Rennard, S. I., and Klech, H. 1992. Serum procollagen III peptide levels in subjects with sarcoidosis. A 5-year follow-up study. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:412–417.

Polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter may predispose to severe silicosis in black South African miners. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165:690–693.

Porcher, J. M., Lafuma, C., el Nabout, R., Jacob, M. P., Sebastien, P., Borm, P. A., Honnons, S., and Auburtin, G. 1993. Biological markers as indicators of exposure and



pneumoconiotic risk: Prospective study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 65:S209–S213.

Porcher, J. M., Oberson, D., Viseux, N., Sebastien, P., Honnons, S., and Auburtin, G. 1994. Evaluation of tumor necrosis factor-alpha (TNF) as an exposure or risk marker in three French coal mining regions. *Exp. Lung Res.* 20:433–443.

Porter, D. W., Hubbs, A. F., Mercer, R., Robinson, V. A., Ramsey, D., McLaurin, J., Khan, A., Battelli, L., Brumbaugh, K., Teass, A., and Castranova, V. 2004. Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation. *Toxicol. Sci.* 79:370–380.

Porter, D. W., Millecchia, L., Robinson, V. A., Hubbs, A., Willard, P., Pack, D., Ramsey, D., McLaurin, J., Khan, A., Landsittel, D., Teass, A., and Castranova, V. 2002a. Enhanced nitric oxide and reactive oxygen species production and damage after inhalation of silica. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283:L485–L493.

Porter, D. W., Ramsey, D., Hubbs, A. F., Battelli, L., Ma, J., Barger, M., Landsittel, D., Robinson, V. A., McLaurin, J., Khan, A., Jones, W., Teass, A., and Castranova, V. 2001. Time course of pulmonary response of rats to inhalation of



crystalline silica: Histological results and biochemical indices of damage, lipidosiis, and fibrosis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20 (suppl. 1):1–14.

Porter, D. W., Ye, J., Ma, J., Barger, M., Robinson, V. A., Ramsey, D., McLaurin, J., Khan, A., Landsittel, D., Teass, A., and Castranova, V. 2002b. Time course of pulmonary response of rats to inhalation of crystalline silica: NF-kappa B activation, inflammation, cytokine production, and damage. *Inhal. Toxicol.* 14:349–367.

Potential role in acute silica-induced lung injury. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:1213–1219.

Pulmonary fibroblast expression of interleukin-8: A model for alveolar macrophage-derived cytokine networking. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:493–501.

Rahman I, Biswas S, Kode A: Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. 2006. *Eur J Pharmacol.* 533: 222-239.

Raines, E. W., Dower, S. K., and Ross, R. 1989. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGFAA. *Science* 243:393–396.



Ramón F, Martínez C, Quero A, Blanco JJ, Carazo L, Prieto A. 2015. Normativa para el diagnóstico y seguimiento de la silicosis. *Arch Bronconeumol*.51:86-93

rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol*. 8:311–318.

Ray, A., Tatter, S. B., Santhanam, U., Helfgott, D. C., May, L. T., and Sehgal, P. B. 1989. Regulation of expression of interleukin-6. Molecular and clinical studies. *Ann. NY Acad. Sci.* 557:353–361; discussion 361–362.

Razzaque, M. S., and Taguchi, T. 2003. Pulmonary fibrosis: Cellular and molecular events. *Pathol. Int.* 53:133–145.

Rees D, and Murray J. 2007. Silica, silicosis and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 11: pp. 474-484

Rego G, Piñeiro L, Rodríguez Menéndez C, Rodríguez Pandiella J. 1997. Silicosis acelerada en un trabajador de canteras de granito. *Medicina del trabajo.* 6:215-218.

Rehn, B., Seiler, F., Rehn, S., Bruch, J., and Maier, M. 2003. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: Untreated and surface treated. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189:84–95.



Reiser, K. M., Haschek, W. M., Hesterberg, T. W., and Last, J. A. 1983. Experimental silicosis. II. Long-term effects of intratracheally instilled quartz on collagen metabolism and morphologic characteristics of rat lungs. *Am. J. Pathol.* 110:30–40.

Rich, E. A., Panuska, J. R., Wallis, R. S., Wolf, C. B., Leonard, M. L., and Ellner, J. J. 1989. Dyscoordinate expression of tumor necrosis factor-alpha by human blood monocytes and alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:1010–1016.

Ridker, P. M. 2003. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for screening and primary prevention. *Am. J. Cardiol.* 92:17K–22K.

Rohatgi, P. K. 1982. Serum angiotensin converting enzyme in pulmonary disease. *Lung* 160:287–301.

Rojanasakul, Y., Ye, J., Chen, F., Wang, L., Cheng, N., Castranova, V., Vallyathan, V., and Shi, X. 1999. Dependence of NF-kappaB activation and free radical generation on silica-induced TNF-alpha production in macrophages. *Mol. Cell. Biochem.* 200:119–125.



Rokita, H., Bereta, J., Koj, A., Gordon, A. H., and Gauldie, J. 1990. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta differently modulate the acute phase response elicited by interleukin-6 in cultured liver cells from man, rat and mouse. *Comp. Biochem. Physiol. A* 95:41–45.

Rolfe, M. W., Kunkel, S. L., Standiford, T. J., Chensue, S. W., Allen, R. M., Evanoff, H. L., Phan, S. H., and Strieter, R. M. 1991.

Rollins, B. J., Walz, A., and Baggiolini, M. 1991. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* 78:1112–1116.

Rom, W. N. 1991. Relationship of inflammatory cell cytokines to disease severity in individuals with occupational inorganic dust exposure. *Am. J. Ind. Med.* 19:15–27.

Rom, W. N., Bitterman, P. B., Rennard, S. I., Cantin, A., and Crystal, R. G. 1987. Characterization of the lower respiratory tract inflammation of nonsmoking individuals with interstitial lung disease associated with chronic inhalation of inorganic dusts. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:1429–1434.



Romano, C., Sulotto, F., Peruccio, G., Pavan, I., and Parola, S. 1985. Serum angiotensin-converting enzyme level in silicosis. *Med. Lav.* 76:366–370.

Rosenman KD, Reilly MJ, and Gardiner J. 2010. Results of spirometry among individuals in a silicosis registry. *J Occup Environ Med.* 52: pp. 1173-1178

Rosenman KD, Reilly MJ, Gardiner J. 2010. Results of spirometry among individuals in a silicosis registry. *J Occup Environ Med.* 52: pp. 1173-1178

Rossi, L., Colicchio, G., and Balletta, A. 1962. [On the behavior of the serum level of sialic acid in normal, silicotic and chronic bronchitic subjects]. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 38:699–700.

Rossi, L., Colicchio, G., and Balletta, A. 1965. [Behavior of blood sialic acid in normal, bronchial disease and silicotic subjects]. *Folia Med. (Napoli)* 48:155–163.

Rotaru, G., Barhad, B., and Petrescu, L. 1967. Studies of the sialic acid participation in the histogenesis of experimental silicotic lung lesions. *Med. Lav.* 58:272–278.

Rothkrantz-Kos, S., van Dieijen-Visser, M. P., Mulder, P. G., and Drent, M. 2003. Potential usefulness of inflammatory



markers to monitor respiratory functional impairment in sarcoidosis. *Clin. Chem.* 49:1510–1517.

Roux-Lombard, P. 1998. The interleukin-1 family. *Eur. Cytokine Netw.* 9:565–576.

Rozenberg, P. A. 1966. [The silicon content of the blood and urine at different stages of silicosis]. *Gig. Tr. Prof. Zabol.* 10:46.

Ruberti, G., Cascino, I., Papoff, G., and Eramo, A. 1996. Fas splicing variants and their effect on apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 406:125–134.

Rushton L. 2007: Chronic obstructive pulmonary disease and occupational exposure to silica. *Rev Environ Health.* 22: pp. 255-272

Sa PM, Faria AD, Ferreira AS, Lopes AJ, Jansen JM, and Melo PL. 2010. Validation of the Forced Oscillation Technique in the diagnostic of respiratory changes in patients with silicosis. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 1: pp. 398-401 5.

Sacks, M., Gordon, J., Bylander, J., Porter, D., Shi, X. L., Castranova, V., Kaczmarczyk, W., Van Dyke, K., and Reasor, M. J. 1998. Silica induced pulmonary



- inflammation in rats: Activation of NF-kappa B and its suppression by dexamethasone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253:181–184.
- Saldeen, T., Ryan, J. W., and Berryer, P. 1981. A peptide derived From fibrin(ogen) inhibits angiotensin converting enzyme and potentiates the effects of bradykinin. *Thromb. Res.* 23:465–470.
- Savici, D., He, B., Geist, L. J., Monick, M. M., and Hunninghake, G. W. 1994. Silica increases tumor necrosis factor (TNF) production, in part, by upregulating the TNF promoter. *Exp. Lung Res.* 20:613–625.
- Schaaf, B. M., Seitzer, U., Pravica, V., Aries, S. P., and Zabel, P. 2001. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter gene polymorphism and increased tumor necrosis factor serum bioactivity in farmer's lung patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:379–382.
- Schins, R. 1996. Multiple cytokines as biomarkers in coal dust exposure and pneumoconiosis: TNF-alpha, IL-6, and TGF-beta, pp. 109–119. Department of Health Risk Analysis and Toxicology. University of Maastricht, Maastricht, The Netherlands.



- Schins, R. P. F., and Donaldson, K. 2000. Nuclear factor kappa-B activation by particles and fibres. *Inhal. Toxicol.* 12(suppl. 3):317–326.
- Schins, R. P. F., Derlaag, T. J. J. M., De Jong, J., Bast, A., and PJA, B. 1994. Serum total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) in coal workers. *Clin. Chem.* 40:470–472.
- Schins, R. P., and Borm, P. J. 1994. Serum procollagen type III peptide in coal workers' pneumoconiosis: A five-year follow-up study. *Exp. Lung Res.* 20:445–455.
- Schins, R. P., and Borm, P. J. 1995a. Epidemiological evaluation of release of monocyte TNF-alpha as an exposure and effect marker in pneumoconiosis: A five year follow up study of coal workers. *Occup. Environ. Med.* 52:441–450.
- Schins, R. P., and Borm, P. J. 1995b. Plasma levels of soluble tumour necrosis factor receptors are increased in coal miners with pneumoconiosis. *Eur. Respir. J.* 8:1658–1663.



- Schins, R. P., and Borm, P. J. 1999. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: A review. *Ann. Occup. Hyg.* 43:7–33.
- Schins, R. P., Knaapen, A. M., Cakmak, G. D., Shi, T., Weishaupt, C., and Borm, P. J. 2002. Oxidant-induced DNA damage by quartz in alveolar epithelial cells. *Mutat. Res.* 517:77–86.
- Schins, R. P., Lamers, R. J., Preat, B., and Borm, P. J. 1995a. Evaluation of serum type III procollagen peptide as an exposure marker in retired coal workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 66:413–419.
- Schins, R. P., McAlinden, A., MacNee, W., Jimenez, L. A., Ross, J. A., Guy, K., Faux, S. P., and Donaldson, K. 2000. Persistent depletion of I kappa B alpha and interleukin-8 expression in human pulmonary epithelial cells exposed to quartz particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167:107–117.
- Schins, R. P., Schilderman, P. A., and Borm, P. J. 1995b. Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int Arch. Occup. Environ. Health* 67:153–157.



- Schins, R. P., van Hartingsveldt, B., and Borm, P. J. 1996. Ex vivo cytokine release from whole blood. A routine method for health effect screening. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48:494–496.
- Schmidt, J. A., Oliver, C. N., Lepe-Zuniga, J. L., Green, I., and Gery, I. 1984. Silica-stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin 1. A potential role for interleukin 1 in the pathogenesis of silicosis. *J. Clin. Invest.* 73:1462–1472.
- Schmidt, RL, Lenz,L.L. 2012. Distinct licensing of IL-18 and IL-1 β secretion in response to NLRP3 inflammasome activation. *Plos ONE* 7:e45186.doi:10.1371/Journal.pone.0045186.
- Schobersberger, W., Hoffmann, G., Hobisch-Hagen, P., Bock, G., Volkl, H., Baier-Bitterlich, G., Wirleitner, B., Wachter, H., and Fuchs, D. 1996. Neopterin and 7,8-dihydroneopterin induce apoptosis in the rat alveolar epithelial cell line L2. *FEBS Lett.* 397:263–268.
- Schreck, R., Albermann, K., and Baeuerle, P. A. 1992. Nuclear factor kappa B: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radical Res. Commun.* 17:221–237.



Schroder K, Zhou R and Tschopp J. 2010. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?. *Science*. 327:296-300.

Schulte, P. 1995. The role of biomarkers in the prevention of occupational disease. In *Biomarkers and occupational health: Progress and perspectives*, ed. M. E. A. Mendelsohn, pp. 1–6. Washington, DC: Joseph Henry Press.

Schulte, P. A. 1991. Contribution of biological markers to occupational health. *Am. J. Ind. Med.* 20:435–446.

Scott AM, Saleh M. 2007. The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis. *Cell Death Differ.* 14:23-31.

Seiler, F., Rehn, B., Rehn, S., Hermann, M., and Bruch, J. 2001. Quartz exposure of the rat lung leads to a linear dose response in inflammation but not in oxidative DNA damage and mutagenicity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24:492–498.

Serbescu, A., and Paunescu, E. 1992. [The importance of assessing angiotensin-converting activity in silicosis patients]. *Pneumoftiziologia* 41:17–20.



- Shi, X. L., Dalal, N. S., and Vallyathan, V. 1988. ESR evidence for the hydroxyl radical formation in aqueous suspension of quartz particles and its possible significance to lipid peroxidation in silicosis. *J. Toxicol. Environ. Health* 25:237–245.
- Shi, X., Castranova, V., Halliwell, B., and Vallyathan, V. 1998. Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis. *J. Toxicol. Environ. Health B* 1:181–197.
- Shi, X., Ding, M., Chen, F., Wang, L., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V., and Castranova, V. 2001. Reactive oxygen species and molecular mechanism of silica-induced lung injury. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20(suppl. 1):85–93.
- Shi, X., Mao, Y., Daniel, L. N., Saffiotti, U., Dalal, N. S., and Vallyathan, V. 1994. Silica radical-induced DNA damage and lipid peroxidation. *Environ. Health Perspect.* 102(suppl. 10):149–154.
- Shi, X., Mao, Y., Daniel, L. N., Saffiotti, U., Dalal, N. S., and Vallyatha, V. 1995. Generation of reactive oxygen species by quartz particles and its implication for cellular damage. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 10:1138–1144.



Shijubo, N., Itoh, Y., Yamaguchi, T., Shibuya, Y., Morita, Y., Hirasawa, M., Okutani, R., Kawai, T., and Abe, S. 1997. Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein (CC10) levels and CC10-positive bronchiolar cells are decreased in smokers. *Eur. Respir. J.* 10:1108–1114.

Shimizu, Y., Hamada, T., Tanaka, Y., Sasaki, A., and Nemoto, T. 2002. Colocalization of CA19-9 and KL-6 to epithelial cells in dilated bronchioles in a patient with idiopathic pulmonary fibrosis complicated by diffuse alveolar damage. *Respirology* 7:281–284.

Shimokado, K., Raines, E. W., Madtes, D. K., Barrett, T. B., Benditt, E. P., and Ross, R. 1985. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell* 43:277–286.

Shoemaker, D. A., Pretty, J. R., Ramsey, D. M., McLaurin, J. L., Khan, A., Teass, A. W., Castranova, V., Pailles, W. H., Dalal, N. S., Miles, P. R., Bowman, L., Leonard, S., Shumaker, J., Vallyathan, V., and Pack, D. 1995. Particle activity and in vivo pulmonary response to freshly milled and aged alpha-quartz. *Scand. J. Work Environ. Health* 21(suppl. 2):15–18.



- Siegesmund, K. A., Funahashi, A., and Yorde, D. E. 1985. Morphometric and elemental microanalytical studies of human lung in health and disease. *Br. J. Ind. Med.* 42:36–42.
- Sime, P. J., Marr, R. A., Gauldie, D., Xing, Z., Hewlett, B. R., Graham, F. L., and Gauldie, J. 1998. Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factorbeta1 and myofibroblasts. *Am. J. Pathol.* 153:825–832.
- Singh, G., Singh, J., Katyal, S. L., Brown, W. E., Kramps, J. A., Paradis, I. L., Dauber, J. H., Macpherson, T. A., and Squeglia, N. 1988.
- Sjostrand, M., Absher, P. M., Hemenway, D. R., Trombley, L., and Baldor, L. C. 1991. Comparison of lung alveolar and tissue cells in silica-induced inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:47–52.
- Sjostrand, M., and Rylander, R. 1984. Enzymes in lung lavage fluid after inhalation exposure to silica dust. *Environ. Res.* 33:307–311.



Sjostrand, M., and Rylander, R. 1987. Lysosomal enzyme activity and fibroblast stimulation of lavage from guinea pigs exposed to silica dust. *Br. J. Exp. Pathol.* 68:309–318.

Smith, R. A., and Baglioni, C. 1987. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* 262:6951–6954.

Smith, R. E., Strieter, R. M., Zhang, K., Phan, S. H., Standiford, T. J., Lukacs, N. W., and Kunkel, S. L. 1995. A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J. Leukocyte Biol.* 57:782–787. SNP, C. 2003. Single nucleotide polymorphisms for biomedical research. <http://snp.cshl.org>. Snyderman, R., and Goetzl, E. J. 1981. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. *Science* 213:830–837.

Solini A, Menini S, Rossi C, Ricci C, Santini E, Blasetti Fantauzzi C et al. 2013: The purinergic 2X7 receptor participates in renal inflammation and injury induced by high-fat diet: posible role of NLRP3 inflammasome activation. *J. Pathol.* 231:342-353.

Spitsyn, V. A., Makarov, S. V., Pai, G. V., Kuz'mina, L. P., Bychkovskaia, L. S., and Kravchuk, O. I. 2000. [Genetic



polymorphism and occupational diseases: Results of 10-years studies]. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 5:27–32.

Srivastava, K. D., Rom, W. N., Jagirdar, J., Yie, T. A., Gordon, T., and Tchou-Wong, K. M. 2002. Crucial role of interleukin-1beta and nitric oxide synthase in silica-induced inflammation and apoptosis in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165:527–533.

Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Kasahara, K., Milia, M. J., Rolfe, M. W., and Strieter, R. M. 1991. Interleukin-8 gene expression From human alveolar macrophages: The role of adherence. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5:579–585.

Starcher, B. C., Kuhn, C., and Overton, J. E. 1978. Increased elastin and collagen content in the lungs of hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 117:299–305.

Steenland K, Mannetje A, Boffetta P, et al. 2001. Pooled exposure-response analysis and risk assessment for lung cancer in 10 cohorts workers: an IARC multicentre study. *Cancer Causes and Control.*12:773-784.

Strieter, R. M., Chensue, S. W., Basha, M. A., Standiford, T. J., Lynch, J. P., Baggiolini, M., and Kunkel, S. L. 1990.



Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor-alpha, lipopolysaccharide, and interleukin-1 beta. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2:321–326.

Studdy, P. R., Lapworth, R., and Bird, R. 1983. Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance—A review. *J. Clin. Pathol.* 36:938–947.

Suk, W. A., Collman, G., and Damstra, T. 1996. Human biomonitoring: research goals and needs. *Environ. Health Perspect.* 104(suppl. 3): 479–483.

Sun J, Weng D, Jin C, et al. 2008. The value of high resolution computed tomography in the diagnostics of small opacities and complications of silicosis in mine machinery manufacturing workers, compared to radiography. *J Occup Health.* 50: pp. 400-405

Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J. Biol. Chem.* 263:7760–7766.



- Szechinski, J. 1986. [Kinin aminopeptidase in lung tissue and activity of kininase II in the serum of patients with silicosis]. *Pol. Tyg. Lek.* 41:635–637.
- Szechinski, J., Skoczynska, A., Smolik, R., Zdrojewicz, Z., and Behal, F. J. 1986. Serum angiotensin-converting enzyme levels in patients with silicosis. *J. Toxicol. Environ. Health* 17:73–79.
- Tarlow, J. K., Clay, F. E., Cork, M. J., Blakemore, A. I., McDonagh, A. J., Messenger, A. G., and Duff, G. W. 1994. Severity of alopecia areata is associated with a polymorphism in the interleukin-1 receptor antagonist gene. *J. Invest. Dermatol.* 103:387–390.
- teWaternaude JM, Ehrlich RI, Churchyard GJ, et al. 2006. Tuberculosis and silica exposure in South African gold miners. *Occup Environ Med.* 63: pp. 187-192
- Thakur SA, Hamilton R, Pikkarainen T, and Holian A. 2010. Differential binding of inorganic particles to MARCO. *Toxicol Sci.* 107: pp. 238-246
- Thompson, A. B., Cale, W. F., and Lapp, N. L. 1991. Serum angiotensin-converting enzyme is elevated in association with underground coal mining. *Chest* 100:1042–1045.



- Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456–1462.
- Tiku, K., Tiku, M. L., and Skosey, J. L. 1986. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* 136:3677–3685.
- Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Vertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA et al. 2008: The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 28:285-287
- Tiwari RR, Karnik BB, Sharma YK. Silica Exposure and Serum Angiotensi Converting Enzyme Activity. *The International Journal of Environment and Occupational Medicine.* 2007;1:21-28.
- Tomokuni, A., Aikoh, T., Matsuki, T., Isozaki, Y., Otsuki, T., Kita, S., Ueki, H., Kusaka, M., Kishimoto, T., and Ueki, A. 1997. Elevated soluble Fas/APO-1 (CD95) levels in silicosis patients without clinical symptoms of autoimmune diseases or malignant tumours. *Clin. Exp. Immunol.* 110:303–309.
- Tomokuni, A., Otsuki, T., Isozaki, Y., Kita, S., Ueki, H., Kusaka, M., Kishimoto, T., and Ueki, A. 1999. Serum



- levels of soluble Fas ligand in patients with silicosis. *Clin. Exp. Immunol.* 118:441–444.
- Totani, Y., Demura, Y., Ameshima, S., Ishizaki, T., and Miyamori, I. 2000. [Silicosis characterized by increasing serum CA 19-9 in parallel with progression of lung fibrosis]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 38:137–142.
- Totani, Y., Demura, Y., Ameshima, S., Ishizaki, T., and Miyamori, I. 2001. Serum CA19-9 levels reflect bronchoalveolar lavage fluid neutrophil levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* 68:438.
- Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141:84–92. Izmerov, N. F., Kuzmina, L. P., and Tarasova, L. A. 2002. Genetic-biochemical criteria for individual sensitivity in development of occupational bronchopulmonary diseases. *Cent. Eur. J. Public Health* 10:35–41.
- Vallyathan V, Shi XL, Dalal NS, Irr W, and Castranova V. 1988. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust. Potential role in acute silica-induced lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 138: pp. 1213-1219
- Vallyathan, V., Castranova, V., Pack, D., Leonard, S., Shumaker, J., Hubbs, A. F., Shoemaker, D. A., Ramsey,



- D. M., Pretty, J. R., McLaurin, J. L., Khan, A., and Teass, A. 1995. Freshly fractured quartz inhalation leads to enhanced lung injury and inflammation. Potential role of free radicals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:1003–1009.
- Vallyathan, V., Goins, M., Lapp, L. N., Pack, D., Leonard, S., Shi, X., and Castranova, V. 2000. Changes in bronchoalveolar lavage indices associated with radiographic classification in coal miners. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:958–965.
- Vallyathan, V., Leonard, S., Kuppusamy, P., Pack, D., Chzhan, M., Sanders, S. P., and Zweir, J. L. 1997. Oxidative stress in silicosis: Evidence for the enhanced clearance of free radicals from whole lungs. *Mol. Cell. Biochem.* 168:125–132.
- Vallyathan, V., Shi, X. L., Dalal, N. S., Irr, W., and Castranova, V. 1988. Generation of free radicals from freshly fractured silica dust.
- Vallyathan, V., Shi, X., and Castranova, V. 1998. Reactive oxygen species: Their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 106(suppl. 5):1151–1155.



- Van Berlo D, Knaapen AM, van Schooten FJ, Schins RP, and Albrecht C. 2010. NF-kappaB dependent and independent mechanisms of quartz-induced proinflammatory activation of lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 7: pp. 13
- Van Dijk, W., and Mackiewicz, A. 1995. Interleukin-6-type cytokine-induced changes in acute phase protein glycosylation. *Ann. NY Acad. Sci.* 762:319–330.
- van Zyl Smit RN, Pai M, Yew WW, et al. 2010. Global lung health: the colliding epidemics of tuberculosis, tobacco smoking, HIV and COPD. *Eur Respir J.* 35: pp. 27-33
- Vanhee, D., Gosset, P., Boitelle, A., Wallaert, B., and Tonnel, A. B. 1995a. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal workers' pneumoconiosis. *Eur. Respir. J.* 8:834–842.
- Vanhee, D., Gosset, P., Marquette, C. H., Wallaert, B., Lafitte, J. J., Gosselin, B., Voisin, C., and Tonnel, A. B. 1995b. Secretion and mRNA expression of TNF alpha and IL-6 in the lungs of pneumoconiosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:298–306.



Vanhee, D., Gosset, P., Wallaert, B., Voisin, C., and Tonnel, A. B. 1994. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis. Increased production of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor type I, and transforming growth factor beta and relationship to disease severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:1049–1055.

Vanhee, D., Molet, S., Gosset, P., Tillie-Leblond, I., Boitelle, A., Wallaert, B., and Tonnel, A. B. 1996. Expression of leucocyte-endothelial adhesion molecules is limited to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the lung of pneumoconiotic patients: Role of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha). *Clin. Exp. Immunol.* 106:541–548.

Wachter, H., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., and Werner, E. R. 1989. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: Immunologic basis and clinical application. *Adv. Clin. Chem.* 27:81–141.

Wallace, W. E., Jr., Vallyathan, V., Keane, M. J., and Robinson, V. 1985. In vitro biologic toxicity of native and surface-modified silica and kaolin. *J. Toxicol. Environ. Health* 16:415–424.



- Wallaert, B., Deflandre, J., Ramon, P., and Voisin, C. 1985. Serum angiotensin-converting enzyme in coal worker's pneumoconiosis. *Chest* 87:844–845.
- Wallaert, B., Lassalle, P., Fortin, F., Aerts, C., Bart, F., Fournier, E., and Voisin, C. 1990. Superoxide anion generation by alveolar inflammatory cells in simple pneumoconiosis and in progressive massive fibrosis of nonsmoking coal workers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141:129–133.
- Wang X, Araki S, Yano E, Wang M, and Wang Z. 1995. Dyspnea and exercise testing in workers exposed to silica. *Ind Health.* 33: pp. 163-171
- Wang, T., Zhang, X., and Li, J. J. 2002. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int. Immunopharmacol.* 2:1509–1520.
- Ward, J. B., Jr., and Henderson, R. E. 1996. Identification of needs in biomarker research. *Environ. Health Perspect.* 104(suppl. 5):895–900.
- Watelet JB, Bachert C, Claeys C, Cauwenberge PV. 2004. Matrix Metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue



inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis. *Allergy*. 59:54-60.

Waterer, G. W., and Wunderink, R. G. 2003. Science review: Genetic variability in the systemic inflammatory response. *Crit. Care* 7:308–314.

Weber, S. L., Lapp, N. L., Vallyathan, V., Castranova, V., Shumaker, J., and Schwegler-Berry, D. 1996. Role of cytokines and mineral particle profile in the development of coal worker's pneumoconiosis as assessed by bronchoalveolar lavage. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 11:923–927.

Wede, I., Widner, B., and Fuchs, D. 1999. Neopterin derivatives modulate toxicity of reactive species on *Escherichia coli*. *Free Radical Res.* 31:381–388.

Weiss, G., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Semenz, E., Dierich, M. P., and Wachter, H. 1993. Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. *FEBS Lett.* 321:89–92.

Welgus, H. G., Campbell, E. J., Bar-Shavit, Z., Senior, R. M., and Teitelbaum, S. L. 1985. Human alveolar



macrophages produce a fibroblast-like collagenase and collagenase inhibitor. *J. Clin. Invest.* 76:219–224.

Wen, F. Q., Kohyama, T., Liu, X., Zhu, Y. K., Wang, H., Kim, H. J., Kobayashi, T., Abe, S., Spurzem, J. R., and Rennard, S. I. 2002. Interleukin-4- and interleukin-13-enhanced transforming growth factor- β 2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon-gamma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26:484–490.

Whyte, M., Hubbard, R., Meliconi, R., Whidborne, M., Eaton, V., Bingle, C., Timms, J., Duff, G., Facchini, A., Pacilli, A., Fabbri, M., Hall, I., Britton, J., Johnston, I., and Di Giovine, F. 2000. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:755–758.

Widner, B., Mayr, C., Wirleitner, B., and Fuchs, D. 2000. Oxidation of 7,8-dihydroneopterin by hypochlorous acid yields neopterin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275:307–311.

Williams, A. O., and Knapton, A. D. 1996. Hepatic silicosis, cirrhosis, and liver tumors in mice and hamsters: Studies



of transforming growth factor beta expression. *Hepatology* 23:1268–1275.

Williams, A. O., and Saffiotti, U. 1995. Transforming growth factor beta1, ras and p53 in silica-induced fibrogenesis and carcinogenesis. *Scand. J. Work Environ. Health* 21(suppl. 2):30–34.

Williams, A. O., Flanders, K. C., and Saffiotti, U. 1993. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in rats with experimental silicosis, alveolar type II hyperplasia, and lung cancer. *Am. J. Pathol.* 142:1831–1840.

Wirleitner, B., Czaputa, R., Oettl, K., Bock, G., Widner, B., Reibnegger, G., Baier, G., Fuchs, D., and Baier-Bitterlich, G. 2001. Induction of apoptosis by 7,8-dihydroneopterin: involvement of radical formation. *Immunobiology* 203:629–641.

Wirleitner, B., Obermoser, G., Bock, G., Neurauter, G., Schennach, H., Sepp, N., and Fuchs, D. 2003. Induction of apoptosis in human blood T cells by 7,8-dihydroneopterin: The difference between healthy controls and patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 107:152–159.



- Woessner, J. F., Jr. 1994. The family of matrix metalloproteinases. *Ann. NY Acad. Sci.* 732:11–21.
- Yamada, K. M. 1989. Fibronectins: structure, functions and receptors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1:956–963.
- Yamano, Y., Kagawa, J., Hanaoka, T., Takahashi, T., Kasai, H., Tsugane, S., and Watanabe, S. 1995. Oxidative DNA damage induced by silica in vivo. *Environ. Res.* 69:102–107.
- Yang, H. M., Barger, M. W., Castranova, V., Ma, J. K., Yang, J. J., and Ma, J. Y. 1999. Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbón black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: Evidence of DEP suppression of macrophage activity. *J. Toxicol. Environ. Health A* 58:261–278.
- Yano, E., Takeuchi, K., and Sato, M. 1987. Serum angiotensin converting enzyme activity in silicosis. *Ind. Health* 25:11–18.
- Ylisirnio S, Hoyhtya M, Paaakko P ,et al. 2001. Elevated serum levels of type I collagen degradation marker ICTP and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1 are



associated with poor prognosis in lung cancer. *Clin Cancer res.* 7:1633-7.

Yucesoy, B., Kashon, M. L., and Luster, M. I. 2003. Cytokine polymorphisms in chronic inflammatory diseases with reference to occupational diseases. *Curr. Mol. Med.* 3:39–48.

Yucesoy, B., Vallyathan, V., Landsittel, D. P., Sharp, D. S., Matheson, J., Burleson, F., and Luster, M. I. 2001a. Polymorphisms of the IL-1 gene complex in coal miners with silicosis. *Am. J. Ind. Med.* 39:286–291.

Yucesoy, B., Vallyathan, V., Landsittel, D. P., Sharp, D. S., Weston, A., Burleson, G. R., Simeonova, P., McKinstry, M., and Luster, M. I. 2001b. Association of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 gene polymorphisms with silicosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172:75–82.

Yucesoy, B., Vallyathan, V., Landsittel, D. P., Simeonova, P., and Luster, M. I. 2002. Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconioses. *Mol. Cell. Biochem.* 234–235:219–224.

Yuen, I. S., Hartsky, M. A., Snajdr, S. I., and Warheit, D. B. 1996. Time course of chemotactic factor generation and



- neutrophil recruitment in the lungs of dust-exposed rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15:268–274.
- Zay K, Loo S, Xie C, Devine DV, Wright J, Churo A. 1999. Role of neutrophils and alpha1-antitrypsin in coal- and silica-induced connective tissue breakdown. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276:269-279
- Zhai, R., Jetten, M., Schins, R. P., Franssen, H., and Borm, P. J. 1998. Polymorphisms in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene in coal miners. *Am. J. Ind. Med.* 34:318–324.
- Zhai, R., Liu, G., Ge, X., Bao, W., Wu, C., Yang, C., and Liang, D. 2002a. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6), and their soluble receptors in coal workers' pneumoconiosis. *Respir. Med.* 96:829–834.
- Zhai, R., Liu, G., Ge, X., Yang, C., Huang, C., Wu, C., and Christiani, D. C. 2002b. Genetic polymorphisms of MnSOD, GSTM1, GSTT1, and OGG1 in coal workers' pneumoconiosis. *J. Occup. Environ. Med.* 44:372–377.
- Zhang, K., and Phan, S. H. 1996. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Biol. Signals* 5:232–239.



- Zhang, Q., and Huang, X. 2002. Induction of ferritin and lipid peroxidation by coal samples with different prevalence of coal workers' pneumoconiosis: Role of iron in the coals. *Am. J. Ind. Med.* 42:171–179.
- Zhang, Q., Dai, J., Ali, A., Chen, L., and Huang, X. 2002. Roles of bioavailable iron and calcium in coal dust-induced oxidative stress: Possible implications in coal workers' lung disease. *Free Radical Res.* 36:285–294.
- Zhang, Q., Kusaka, Y., He, L., Zhang, Z., and Sato, K. 1996. Dynamic changes of constituents in bronchoalveolar lavage fluid in experimental silicotic rats. *Ind. Health* 34:379–388.
- Zhang, Z., Shen, H. M., Zhang, Q. F., and Ong, C. N. 1999. Critical role of GSH in silica-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 277:L743–L748.
- Zhang, Z., Shen, H. M., Zhang, Q. F., and Ong, C. N. 2000. Involvement of oxidative stress in crystalline silica-induced cytotoxicity and genotoxicity in rat alveolar macrophages. *Environ. Res.* 82:245–252.



- Zhestkov, A. V. 2000. [Immunological changes in dust-induced lung diseases]. *Gig. Sanit.* 30–33.
- Zhicheng, S., Zhiming, Y., Lata, A., and Yuhua, H. 1986. Serum angiotensin converting enzyme, ceruloplasmin, and lactic dehydrogenase in anthracosilicosis and anthracosilicotuberculosis. *Br. J. Ind. Med.* 43:642–643.
- Zhuo, Y., Zhang, J., Laboy, M., and Lasky, J. A. 2004. Modulation of PDGF-C and PDGF-D expression during bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286:L182–L188.
- Zitnik, R. J., Zheng, T., and Elias, J. A. 1993. cAMP inhibition of interleukin-1-induced interleukin-6 production by human lung fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 264:L253–L260.
- Zsoldos, T., Tigyi, A., Montsko, T., and Puppi, A. 1983. Lipid peroxidation in the membrane damaging effect of silica-containing dust on rat lungs. *Exp. Pathol.* 23:73–77.