

Valeria Barbosa Moreira
Angela Santos Ferreira
Porphirio José Soares
José Manoel Gabetto
Cristóvão Clemente Rodrigues

Relevância do lavado broncoalveolar na quantificação de partículas inaladas nas diversas formas de silicose

The role of bronchoalveolar lavage in quantifying inhaled particles in silicosis

Recebido para publicação/received for publication: 05.01.14

Aceite para publicação/accepted for publication: 05.07.21

Resumo

A silicose é uma doença causada pela inalação e deposição de partículas de sílica cristalina, que induz uma reacção tissular fibrosa. O lavado broncoalveolar (LBA) é um procedimento pouco invasivo que permite a identificação de partículas, caracterizando, desta maneira, a exposição à poeira

Abstract

Silicosis is a disease caused by inhalation and deposition of crystalline silica that produces a fibrous tissue reaction. Bronchoalveolar lavage is a noninvasive technique that allows identifying particles, thus characterizing exposure to mineral dust. The aim of this work was to study bronchoalveolar

¹ Médica do Serviço de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Antônio Pedro (UFF). Mestre em pneumologia pela UFF/*Respiratory Endoscope Service doctor at the Antônio Pedro University Hospital (UFF). MsC in Pulmonology from UFF*

² Prof. Adjunto do Departamento de Medicina Clínica -Pneumologia- da Universidade Federal Fluminense. Doutor em pneumologia pela UFRGS/*Assistant Prof. at the Clinical Medicine – Pulmonology – Department at the Fluminense Federal University. PhD in Pulmonology from UFRGS*

³ Prof. Adjunto do Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense. Mestre em patologia pela UFF/*Assistant Prof. at the Pathology Department at the Fluminense Federal University. MsC in pathology from UFF.*

⁴ Prof. Titular do Departamento de Radiologia da Universidade Federal Fluminense/*Prof. at the Department of Radiology at the Fluminense Federal University*

⁵ Prof. Adjunto do Departamento de Medicina Clínica – Pneumologia - da Universidade Federal Fluminense. Mestre em pneumologia pela UFF/*Assistant Prof. at the Clinical Medicine – Pulmonology – Department at the Fluminense Federal University. MsC in Pulmonology from UFF.*

Trabalho realizado no/*Study produced at the Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense – Niterói – Rio de Janeiro – Brasil.*

Correspondência/*Correspondence to:* Dra. Valéria Barbosa Moreira

Rua Marquês de Valença, 56 apto 104, Tijuca. Rio de Janeiro - Brasil.

CEP: 20550-030 Telefone/*Telephone:* (21)2264-9088-Fax: (21)2610-7070

email: valeriamoreira@mls.com.br

mineral. Este trabalho teve por objectivo estudar o lavado broncoalveolar como meio de estimar a quantidade de partículas alveolares nas diversas formas de silicose. A lavagem broncoalveolar foi realizada em 27 doentes silicóticos com as formas simples (n = 12), complicada (n = 13) e aguda (n = 2) da doença e em 7 indivíduos-controlo. Os macrófagos foram contados enumerando-se o percentagem de células positivas para partículas utilizando-se a microscopia óptica com luz polarizada. Os pacientes silicóticos apresentaram maior quantidade de partículas nas células do LBA em relação aos indivíduos-controlo, porém, não houve diferença significativa quando se comparou os grupos de silicose simples e complicada. Os doentes com silicose aguda, com exposição intensa à poeira de sílica, apresentaram mais de 70% dos macrófagos acometidos por partículas. Quando avaliados o tempo de exposição e o afastamento à poeira de sílica, foi observada correlação inversa entre a duração de exposição e a quantidade de poeira alveolar e uma tendência ao menor comprometimento dos macrófagos com maior tempo de afastamento do trabalho. Esses resultados sugerem que a análise das partículas no LBA pode ser útil para determinar a natureza e intensidade da exposição.

Rev Port Pneumol 2005; XI (5): 457-475

Palavras-chaves: Partículas de sílica, macrófagos alveolares, lavado broncoalveolar.

lavage as a mean of estimating the amount of alveolar particles in different forms of silicosis. Bronchoalveolar lavage was carried out in 27 silicotic patients with simple (n = 12), complicated (n = 13), and acute (n = 2) forms of the disease and 7 healthy individuals as a control group. Macrophages were scored enumerating the percentage of cells with particles by polarizing light microscopy. Silicotic patients showed a marked increase in BAL cell particles compared to control population, however, relating simple to complicated silicosis, no significant difference was observed. In acute silicotic patients with massive silica dust exposure, more than 70% of BAL alveolar macrophages contained dust particles. When duration of exposure and retirement from work were evaluated, an inverse correlation between duration of exposure and the amount of alveolar dust, and a tendency to a smaller involvement on macrophages with the greater period of retirement from work were observed. These results suggest that particle analysis in BAL may be important in order to establish the nature and intensity of exposure.

Rev Port Pneumol 2005; XI (5): 457-475

Key-words: Silica particles, alveolar macrophages, bronchoalveolar, lavage.

Introdução

A lavagem broncoalveolar tornou o pulmão um órgão acessível por meios poucos invasivos, permitindo a recuperação de células e componentes solúveis do tracto respiratório inferior e o estudo *in vivo* dos mecanismos envolvidos na patogénese e injúria inflamatória de muitas doenças¹.

Na silicose, o lavado broncoalveolar pode ser utilizado para: a) identificar e documentar a exposição ao mineral; b) auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos na patogénese da doença; c) eliminar outras causas de doença pulmonar, como tuberculose e cancro do pulmão; d) no diagnóstico da silicose aguda².

A exposição à sílica cristalina induz alterações morfológicas e funcionais nos macrófagos alveolares. Estudos com lavado broncoalveolar (LBA) obtidos de animais e doentes com doença relacionada à exposição à sílica indicam que os macrófagos alveolares são importantes mediadores da fibrose, participando activamente na fagocitose das partículas de sílica e, provavelmente, na libertação de factores quimiotáticos para outras células.

Na literatura existem poucos dados disponíveis relacionados com a quantificação da carga de sílica alveolar^{3,4,5,6}. Neste sentido, a análise do material do LBA pode ser útil para determinar a natureza e intensidade de exposição e, possivelmente, contribuir para a compreensão da fisiopatogenia da doença.

O presente estudo teve por objectivos: comparar a percentagem de macrófagos alveolares com as partículas nos doentes silicóticos e no grupo-controlo de indi-

Introduction

Bronchoalveolar lavage renders the lung accessible to non-invasive techniques, allowing cell and soluble element recovery from the lower respiratory tract and the *in vivo* study of the mechanisms involved in the pathogenesis and inflammation injury of many diseases¹.

Bronchoalveolar lavage can be used in silicosis a) to identify and record exposure to the mineral; b) to help define the mechanisms involved in the disease's pathogenesis; c) to eliminate other causes of lung disease such as tuberculosis and lung cancer; d) in the diagnosis of acute silicosis².

Exposure to crystalline silica causes morphological and functional changes in the alveolar macrophages. Studies of the bronchoalveolar lavage (BAL) obtained from animals and patients with silica-exposure related disease indicate that the alveolar macrophages are important mediators of fibrosis, are active participants in the phagocytosis of silica particles and probably in the release of chemiotactic factors to other cells.

There is little data available in studies into the measurements of amounts of alveolar silica^{3,4,5,6}. This being the case, analysis of BAL matter could be useful in determining the nature and intensity of the exposure and could possibly add to the understanding of the physiopathogenesis of the disease.

This study aims to compare the percentage of alveolar macrophages in the silicotic patients with those in the healthy, non-exposed control group and measure the difference in the percentage of virulent macrophages in the different radiological

A lavagem broncoalveolar tornou o pulmão um órgão acessível por meios poucos invasivos

Na silicose o lavado broncoalveolar pode ser utilizado

A exposição à sílica cristalina induz alterações morfológicas e funcionais nos macrófagos alveolares

Existem poucos dados disponíveis relacionados com a quantificação da carga de sílica alveolar

víduos sadios não expostos; verificar a diferença na percentagem de macrófagos acometidos nas diversas formas radiológicas de silicose (simples, complicada e aguda).

Doentes e métodos

Foram incluídos neste estudo 27 doentes portadores de silicose provenientes do ambulatório de pneumopatias ocupacionais do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) da Universidade Federal Fluminense (UFF), no período de Março de 1995 a Outubro de 1997. Todos os doentes eram do sexo masculino, com média de idade de 43,7 anos (21-62 anos) e predominio da cor branca (66,7 %). *Do grupo de doentes silicóticos estudados, 51,8% eram fumadores ou ex-fumadores e 48,1% negaram tabagismo.* A maioria dos doentes estudados (77,8%) era de extractores de areia, trabalhadores de estaleiros situados na orla da baía de Guanabara (Rio de Janeiro). O tempo de exposição à poeira de sílica variou de 3 a 28 anos, com mediana de 17 anos, sendo que o tempo de afastamento do trabalho variou de 0 a 25 anos, com mediana de 4 anos.

O diagnóstico de silicose foi feito baseado na história ocupacional de exposição à sílica e na radiografia de tórax apresentando alterações radiológicas compatíveis com a doença⁷. De acordo com os achados radiológicos do tórax, os doentes foram distribuídos em 3 grupos: Grupo 1 (n=12): doentes com silicose simples, apresentando pequenas opacidades no parênquima pulmonar; Grupo 2 (n=13): doentes com silicose complicada, caracterizada pela presença de grandes opacidades no parênquima pulmonar; Grupo

forms (simple, complicated and acute) of silicosis.

Patients and methods

The study contains 27 silicotic patients being followed up in work-related Pulmonology out-patients appointments at the Antônio Pedro University Hospital (HUAP) of the Fluminense Federal University (UFF) between March 1995 and October 1997. All the patients were male, their average age was 43.7 years (21-62 years) and they were mainly Caucasian (66.7 %). Of this study group of silicotic patients, 51.8% were smokers or ex-smokers and 48.1% were non-smokers. The majority of these patients studied (77.8%) were sand workers from the building sites of the borders of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. Their exposure to silica dust varied from 3 to 28 years, with an average of 17 years. The time they had been retired from work varied from 0 to 25 years, with an average of 4 years.

The diagnoses of silicosis were made based on the patients' work-related exposure to silica and on their chest X-rays which showed radiological alterations compatible with the disease⁷. The patients were divided into 3 groups, based on the findings of the chest x-ray: Group 1 (n=12): patients with simple silicosis, presenting small opacities in the lung parenchyma; Group 2 (n=13): patients with complicated silicosis, characterised by the presence of large opacities in the lung parenchyma; Group 3 (n=2): patients with acute silicosis, with the chest x-ray showing predominant alveolar compromise. There was no need to perform pulmonary biopsy in the cases of simple and compli-

O diagnóstico de silicose foi feito baseado na história ocupacional de exposição à sílica e na radiografia de tórax

3 (n=2): doentes com silicose aguda, com comprometimento predominantemente alveolar na radiografia de tórax.

Não houve indicação de biópsia pulmonar nos casos de silicose simples e complicada porque a história ocupacional foi bem documentada e as alterações radiológicas eram compatíveis com silicose segundo a Classificação Internacional das Radiografias de Pneumoconioses da OIT (ILO, 1980). No entanto, nos casos de silicose aguda, o diagnóstico foi feito pelo lavado broncoalveolar com o achado de material lipoproteínico, PAS positivo, no interior e fora do citoplasma dos macrófagos alveolares, e confirmado através da microscopia electrónica que evidenciou estruturas tubulares multilameladas semelhantes à mielina, além de corpos lamelares e electrondensos. Sete voluntários sadios não expostos à poeira de sílica foram seleccionados como grupo-controlo. Todos do sexo masculino, não tabagistas, com média de idade de 32,4 anos (25 a 42 anos), sendo 5 indivíduos brancos e 2 pretos.

De acordo com as normas de bioética, todos os doentes e voluntários normais seleccionados forneceram consentimento por escrito para participar na pesquisa após serem informados detalhadamente sobre os procedimentos.

Lavagem broncoalveolar

As broncofibroscopias foram sistematicamente realizadas pelo mesmo profissional. O broncofibroscópio *Pentax FB 18X* foi cuidadosamente introduzido pela cavidade oral e fixado no subsegmento do lobo médio ou língula, nos casos de comprometimento difuso à radiografia de tórax ou na área em que a doença era mais proeminente. A lavagem foi realizada com a infusão de 100 ml (cinco volumes de 20 ml) de solução salina estéril através do ca-

cated silicosis as the work history was well documented and the radiological alterations were compatible with silicosis according to the International Classification of Pneumoconiosis X rays of ILO (ILO, 1980). Diagnosis was made in the acute silicosis cases, however, by bronchoalveolar lavage of PAS positive lipoprotein matter found in the interior and exterior of the alveolar macrophages cytoplasm. This was confirmed using an electronic microscope which showed multilamellar tubular structures similar to myelin except in their lamella and electrondense bodies.

Seven healthy volunteers who had not been exposed to silica dust were selected as the control group. They were all male, non-smokers, and their average age was 32.4 years (25 to 42 years). 5 were Caucasian and 2 black. In line with bio-ethical norms, all the patients and healthy volunteers selected gave their written consent to participating in this research after being fully informed about the proceedings.

Bronchoalveolar lavage

The same trained professional carried out all the bronchofibroscopies. The *Pentax FB 18X* bronchofibroscope was carefully introduced into the oral cavity and centred in the sub segment of the median pulmonary lobe or lingula, in cases in which the chest x-ray had shown diffuse compromise or in the area in which the disease was more severe. The lavage was carried out with a 100 ml (five 20 ml volumes) infusion of sterile saline solution through the bronchofibroscope canal. The liquid from the lavage, carefully aspirated by manual suction, was col-

Não houve indicação de biópsia pulmonar nos casos de silicose simples e complicada porque a história ocupacional foi bem documentada e as alterações radiológicas eram compatíveis com silicose

nal do broncofibroscópio. O líquido de lavagem, cuidadosamente aspirado por sucção manual, foi recolhido em tubos de polipropileno, acondicionados em banho de gelo.

Processamento do LBA

Após medida do volume total do LBA, 20 ml do líquido foram filtrados em gaze estéril e o restante processado para pesquisa de bacilos álcool-ácido-resistente, fungos, células neoplásicas e pesquisa de cristais de sílica. O filtrado, distribuído em tubos *Falcon* (Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA) de fundo cônico, foi centrifugado a 200xg, durante 10 minutos, em centrifugação refrigerada de bancada (*spin VI*, Incibrás, São Paulo, Brasil). O sobrenadante foi guardado a -80° C. O botão celular foi ressuspensão em PBS (tampão fosfato salina) pH 7,2 contendo 2% de soro fetal bovino (Cultilab, São Paulo, Brasil), a celularidade total determinada em câmara de Neubauer e a viabilidade celular verificada pelo teste de exclusão com azul *tripan*. A concentração final foi ajustada para 2x10 células/ml e a contagem diferencial realizada em preparações de citocentrífuga (*Shandon Cytospin 2*, Japão) coradas pelo Wright-Giemsa. Foram contadas pelo menos 200 células, não sendo enumeradas células epiteliais e eritrócitos.

Microscopia com luz polarizada

Através da microscopia óptica, utilizando o microscópio *Zeiss*, modelo *Axioskop 20* com condensador plano-acromático com lente frontal e objectivas plano-acromáticas acopladas a filtro polarizador e analisador, foram contados 300 macrófagos em esfere-

lected in polypropylene tubes kept in a bath of ice.

Processing the BAL

The total volume of the BAL was measured. Next, 20ml of the liquid was filtered through sterile gauze and the outcome processed for study of the alcohol and acid resistant bacillus, fungus, neoplastic cells and study of the silica crystals. The filtered liquid, put into conical bottomed Falcon tubes (Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA), was centrifuged at 200xg for 10 minutes in a refrigerated bench centrifuge (*spin VI*, Incibrás, São Paulo, Brazil). The outcome was stored at -80° C. The cellular button was re-suspended in sterile phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, containing 2% foetal bovine serum (Cultilab, São Paulo, Brazil). The total cell count was determined in a Neubauer counting chamber and the cellular viability verified through an exclusion test with trypan blue. The final concentration was adjusted for 2x10 cells/ml and the differential count carried out in cytocentrifuge preparations (*Shandon Cytospin 2*, Japan) with Wright-Giemsa stain. At least 200 cells were counted, with epithelia and erythrocyte cells not included.

Polarized light microscope

300 macrophages in smears prepared in cytocentrifuge were counted, via optical microscopy using a model 20 *Axioskop Zeiss* microscope with plano-achromatic condenser with front lens and plano-achromatic objectives connected to a polarized and analysing filter. A 400x amplitude in clear field was used for the study

gaços preparados em citocentrifugação. Utilizou-se para o estudo amplitude de 400x em campo claro e respectivamente a mesma área, aleatoriamente escolhida, foi analisada à luz polarizada. Foram enumerados os macrófagos contendo partículas e, posteriormente, os macrófagos alveolares foram classificados em cruzes, de acordo com o número de partículas refringentes no seu interior: Foi utilizado o seguinte critério: + → 1 a 2 partículas; ++ → 3 a 4 partículas; +++ → mais de 5 partículas.

Análise estatística

A comparação dos níveis medianos das variáveis quantitativas entre dois grupos foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney; e, entre três grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis; a correlação entre o número de macrófagos com partículas e os tempos de exposição e de afastamento foi dada pelo coeficiente de correlação de Spearman; a associação entre as variáveis categóricas foi feita pelo teste de qui-quadrado ou pelo teste exacto de Fisher. Foram utilizados testes não paramétricos devido à natureza das variáveis e à grande variabilidade dos dados. A mediana foi a medida mais adequada para expressar os dados. O nível de significância adoptado foi de 5 %.

Resultados

A broncofibroscopia foi inteiramente normal nos doentes silicóticos e indivíduos-controlo. Apenas 2 doentes apresentaram febre, acima de 37,5°C, após o exame. A lavagem broncoalveolar foi realizada no segmento medial do brônquio do lobo médio em todos os doentes, com excepção dos 2 agudos, nos quais foram lavados o

and the same area, chosen at random, was analysed under polarized light. The macrophages containing particles were counted and after the alveolar macrophages were classified into crosses according to the number of refringent particles they contained inside. The following criteria were used: + → 1 to 2 particles; ++ → 3 to 4 particles; +++ → over 5 particles.

Statistical analysis

The Mann-Whitney Test was used to compare the average levels of the quantitative variables of the two groups while the Kruskal-Wallis test was used to compare those of the three groups. The correlation between the number of the macrophages with particles and the duration of exposure and time away from exposure was given by Spearman's rho and the Fisher exact chi-squared test was used to make the association between the categorical variables. Non-parametric tests were used due to the nature of the variables and the great variability of the data. The median was the most suitable average for expressing the data. The level of significance used was 5%.

Results

The bronchfibroscopy was completely normal in both the silicotic patients and the control individuals. Only 2 patients had a high temperature over 37.5°C after the exam. The bronchoalveolar lavage was carried out in the medial segment of the median bronchial lobe in all of the patients, with the exception of the 2 acute patients. These patients had their bronchoalveolar lavages performed in the

Os doentes portadores de silicose apresentaram (...) aumento significativo (...) da celuridade total do lavado broncoalveolar

segmento anterior do lobo inferior direito, por ser o local onde as lesões predominavam.

Os doentes portadores de silicose apresentaram, em relação ao grupo-controlo, um aumento significativo ($p < 0,05$) da celularidade total do lavado broncoalveolar. Entretanto, a contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar não mostrou diferença estatística significativa nas percentagens das células recuperadas entre os indivíduos do grupo-controlo e os silicóticos ($p > 0,05$). Houve, porém, uma tendência do grupo para silicótico apresentar aumento do número de linfócitos com diminuição da população de macrófagos.

O tabagismo não alterou as variáveis analisadas no lavado broncoalveolar, pois não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de doentes fumadores e ex-fumadores ($p > 0,05$).

Quando comparadas com as mesmas variáveis nos grupos de doentes com silicose simples e complicada, observou-se que a mediana do volume de líquido recuperado, celularidade total e diferencial foi semelhante nos dois grupos, não mostrando diferença significativa ($p > 0,05$).

Os doentes com silicose aguda apresentaram pleocitose acentuada no lavado broncoalveolar, com evidente alteração na relação macrófago-linfócito (Quadro I).

Quando comparados com o grupo-controlo, os doentes silicóticos apresentaram diferença significativa em relação ao número de macrófagos acometidos por partículas ($p < 0,05$) (Fig. 1).

Quando os macrófagos foram classificados em cruzes de acordo com o número de partículas no seu citoplasma, observou-se

anterior segment of the right inferior lobe as this was the area with more lesions.

The silicotic patients showed a significant increase ($p < 0.05$) in the total amount of cells found in the bronchoalveolar lavage in comparison with the control group.

The differential count of cells in the bronchoalveolar lavage did not, however reveal a statistically different difference in the percentages of cells recovered from the silicotic and control groups ($p > 0.05$). The silicotic group did, however, present an increase in the number of lymphocytes and a decrease in the macrophage population. Smoking did not alter the variables analysed in the bronchoalveolar lavage and no significant differences between groups of patients who were smokers and those who were non-smokers were found ($p > 0.05$).

When a comparison of the same variables in the groups of patients with simple and complicated silicosis was made, it was seen that the average of the recovered volume of liquid and the total and differential cell count were similar in both groups. There was no significant difference ($p > 0.05$). The patients with acute silicosis presented attenuated pleocytosis in the bronchoalveolar lavage, with marked change in the macrophage-lymphocytes relationship (Table I).

In comparison with the control group, the silicotic patients showed a significant difference in relation to the number of macrophages affected by particles ($p < 0.05$) (Fig.1).

When the macrophages were classified into crosses according to the number of particles in their cytoplasm, it was seen that the majority of individuals in the control group who had particle-contain-

O tabagismo não alterou as variáveis analisadas no lavado broncoalveolar

Os doentes silicóticos apresentaram diferença significativa em relação ao número de macrófagos acometidos por partículas

RELEVÂNCIA DO LAVADO BRONCOALVEOLAR NA QUANTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS INALADAS NAS DIVERSAS FORMAS DE SILICOSE

Valeria Barbosa Moreira, Ângela Santos Ferreira Porphiro José Soares, José Manoel Gabetto, Cristóvão Clemente Rodrigues

Quadro I – Variáveis do LBA na silicose simples, complicada, aguda e grupo-controlo

Variáveis	Simples n = 12	Complicada n = 13	Aguda n = 2	Controlo n = 7
V Rec (ml)	57 (39 - 71)	60 (43 - 75)	53,5 (38,5 - 68)	63 (55 - 75)
Viab (%)	93 (89 - 98)	97 (89-99)	97,5 (97 - 98)	99 (96 - 100)
Total cels. X 10 ⁶	62 (17 - 128)	59 (13 - 149)	139,5 (125 - 154)	18 (11 - 56)
Cels/ml x 10 ³	895 (355 - 1970)	1025 (305 - 2725)	3435 (3270 - 3600)	295 (204 - 770)
Macrófagos %	87,5 (61 - 98)	88 (52 - 97)	70,5 (70 - 71)	93 (77 - 98)
Linfócitos %	6,5 (1 - 39)	11 (3 - 18)	19,5 (13 - 27)	7 (2 - 22)
Neutrófilos %	0,5 (1 - 10)	1 (0 - 19)	9,5 (3 - 16)	0 (0 - 2)
Eosinófilos %	0 (0 - 16)	0 (0 - 1)	0	0

Resultados expressos em mediana (valor mínimo e máximo). O grupo agudo não foi comparado por ser composto por apenas 2 indivíduos.

Table I – Variables in the BAL of the simple, complicated and acute silicosis groups and the control group

Variables	Simple n = 12	Complicated n = 13	Acute n = 2	Control n = 7
Rec V (ml)	57 (39 - 71)	60 (43 - 75)	53.5 (38.5 - 68)	63 (55 - 75)
Viab (%)	93 (89 - 98)	97 (89-99)	97.5 (97 - 98)	99 (96 - 100)
Total cells X 10 ⁶	62 (17 - 128)	59 (13 - 149)	139.5 (125 - 154)	18 (11 - 56)
Cels/ml x 10 ³	895 (355 - 1970)	1025 (305 - 2725)	3435 (3270 - 3600)	295 (204 - 770)
Macrophages %	87.5 (61 - 98)	88 (52 - 97)	70.5 (70 - 71)	93 (77 - 98)
Lymphocytes %	6.5 (1 - 39)	11 (3 - 18)	19.5 (13 - 27)	7 (2 - 22)
Neutrophils %	0.5 (1 - 10)	1 (0 - 19)	9.5 (3 - 16)	0 (0 - 2)
Eosinophils %	0 (0 - 16)	0 (0 - 1)	0	0

Results expressed in averages (minimum and maximum amounts). The acute patient group was not compared as it was composed of only 2 individuals.

que a maioria dos indivíduos-controlo com macrófagos positivos para partículas, apresentava-se com apenas 1 ou 2 partículas no seu interior enquanto o grupo silicótico apresentou 34,7% das células classificadas como 2 ou 3 cruces (Quadro II). A análise comparativa entre os grupos de

ning macrófagos presented only 1 or 2 particles whereas the silicotic group presented 34.7% of the cells classified with 2 or 3 crosses (Table II).

Comparative analysis between the group of patients with simple silicosis and complicated silicosis shows that there is no

RELEVÂNCIA DO LAVADO BRONCOALVEOLAR NA QUANTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS INALADAS NAS DIVERSAS FORMAS DE SILICOSE

Valeria Barbosa Moreira, Ângela Santos Ferreira Porphirio José Soares, José Manoel Gabetto, Cristóvão Clemente Rodrigues

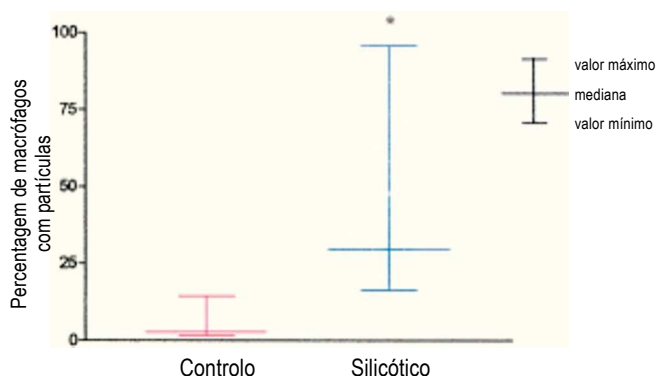


Fig. 1. Percentagem de macrófagos alveolares no LBA dos controlos e silicóticos que continham partículas

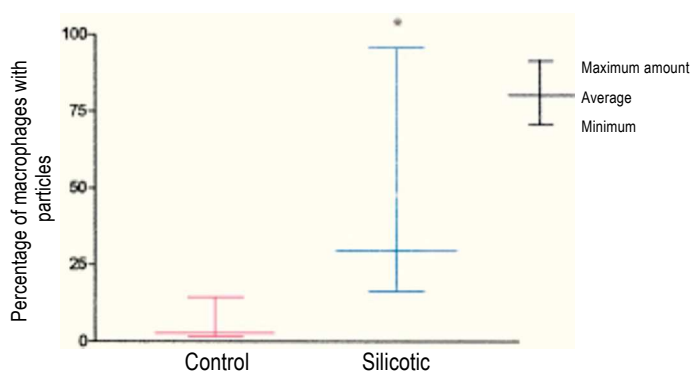


Fig. 1 – Percentage of alveolar macrophages in the BAL of the control and silicotic individuals which contain particles

Quadro II – Macrófagos positivos para partículas no grupo-controlo e doentes silicóticos (número absoluto e percentual)

Variáveis	Controlo n = 7	Silicóticos n = 27
MA partículas		
nº absoluto	8 (5 – 43,5)	89 (49 – 287)
Percentagem	2,7% (1,7 – 14,5)	29,7% (16,3 – 95,7)
MA (+)		
nº absoluto	8 (5 – 42,5)	58 (38,5 - 159)
Percentagem	100% (97,7 – 100)	64% (31,5 - 94,9)
MA (++)		
nº absoluto	0 (0 - 1)	24 (2,5 - 84)
Percentagem	0% (0 - 2,3)	26,4% (5,1 - 41,6)
MA (+++)		
nº absoluto	0	8 (0 - 72)
Percentagem	0 %	8,3% (0 - 34)

Resultados expressos em mediana (valor mínimo e valor máximo)
MA = Macrófagos

Table II – Particle positive macrophages in the control group and the silicotic patients (absolute number and percentage)

Variables	Control n = 7	Silicotics n = 27
MA particles		
absolute nº	8 (5 – 43,5)	89 (49 – 287)
Percentage	2.7% (1.7 – 14.5)	29.7% (16.3 – 95.7)
MA (+)		
absolute nº	8 (5 – 42.5)	58 (38.5 - 159)
Percentage	100% (97.7 – 100)	64% (31.5 – 94.9)
MA (++)		
absolute nº	0 (0 - 1)	24 (2.5 - 84)
Percentage	0% (0 - 2.3)	26.4% (5.1 – 41.6)
MA (+++)		
absolute nº	0	8 (0 - 72)
Percentage	0 %	8.3% (0 - 34)

Results expressed in averages (minimum and maximum amounts)
MA = Macrophages

RELEVÂNCIA DO LAVADO BRONCOALVEOLAR NA QUANTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS INALADAS NAS DIVERSAS FORMAS DE SILICOSE

Valeria Barbosa Moreira, Ângela Santos Ferreira Porphiro José Soares, José Manoel Gabetto, Cristóvão Clemente Rodrigues

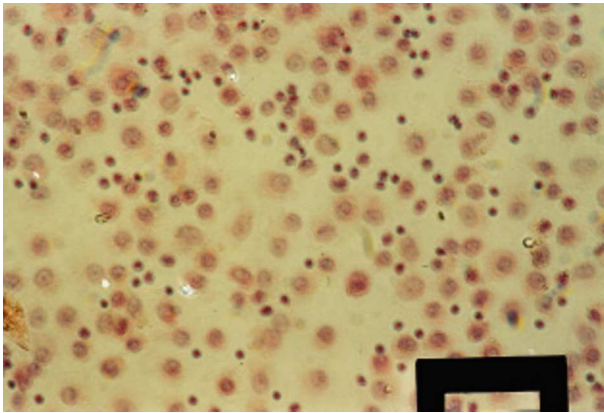


Fig. 2 – Partículas refringentes no LBA de um indivíduo-controlo
Preparação em citocentrifugação do LBA. Coloração pelo Papanicolaou vista à luz polarizada mostra raras partículas refringentes no interior dos macrófagos alveolares.

*Fig. 2 – Refringent particles in the BAL of a control individual
Preparation in BAL cyto centrifuge. Papanicolaou staining seen in polarized light shows few refringent particles in the interior of the alveolar macrophages.*

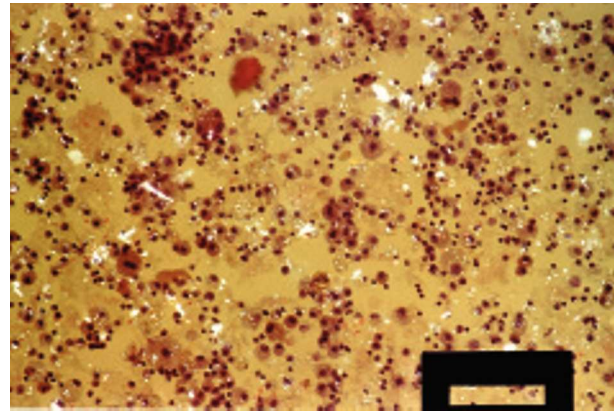


Fig. 3 – Partículas refringentes no LBA de um paciente com silicose aguda

Preparação em citocentrífuga do LBA. Coloração pelo Papanicolaou mostra à luz polarizada acentuado número de partículas refringentes no interior dos macrófagos alveolares.

*Fig. 3 – Refringent particles in the BAL of a patient with acute silicosis
Preparation in BAL cyto centrifuge. Papanicolaou staining seen in polarized light shows a marked number of refringent particles in the interior of the alveolar macrophages.*

Fig. 4 – Percentagem de macrófagos com partículas refringentes em relação ao tempo exposto à sílica livre

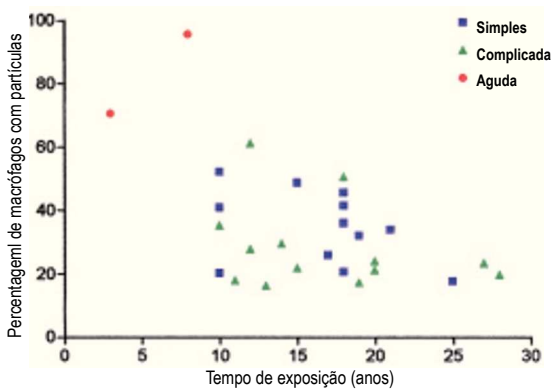
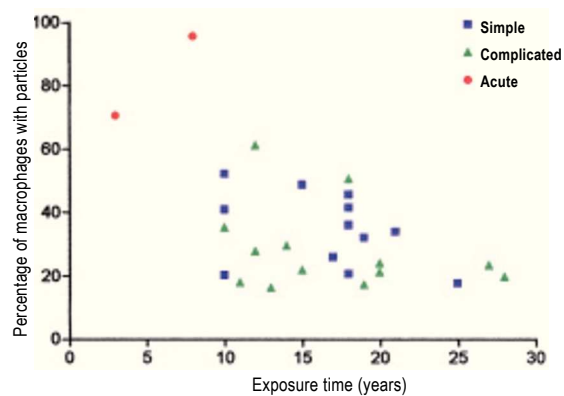


Fig. 4 – Percentage of macrophages with refringent particles in relation to the time exposed to free silica



pacientes com silicose simples e complicada mostra não haver diferença significativa em relação à percentagem de células acometidas ($p > 0,05$). Os doentes com silicose aguda apresentaram um grande número de

significant difference in the percent of cells affected ($p > 0.05$). The patients with acute silicosis presented a great number of macrophages with particles; almost 95% of the cells contained refringent par-

RELEVÂNCIA DO LAVADO BRONCOALVEOLAR NA QUANTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS INALADAS NAS DIVERSAS FORMAS DE SILICOSE

Valeria Barbosa Moreira, Ângela Santos Ferreira Porphirio José Soares, José Manoel Gabetto, Cristóvão Clemente Rodrigues

Quadro III – Macrófagos positivos para partículas na silicose simples, complicada e aguda

Variáveis	Simple n = 12	Complicada n = 13	Aguda n = 2
MA partículas			
nº absoluto	105,2 (53,5 - 157)	70,5 (49 - 184)	249,5 (212 - 287)
Percentagem	35 %(17,8 - 52,3)	23,5% (16,3 - 61,3)	83,2% (70,7 - 95,7)
MA (+)			
nº absoluto	60,8 (41 - 106,5)	56,5 (38,5 - 90,5)	115 (71-159)
Percentagem	62,2% (41,3 - 84,8)	68,9% (31,5 - 94,9)	44,4 % (33,5 - 55,4)
MA (++)			
nº absoluto	31,3 (9,5 - 61)	19,5 (2,5 - 69,5)	76,5 (69 - 84)
Percentagem	26 %(15,2 - 41,6)	25,7% (5,1 - 37,8)	31% (29,2 - 32,5)
MA (+++)			
nº absoluto	9,5 (0 - 27,5)	2,5 (0 - 56,5)	58 (44 - 72)
Percentagem	9% (0 - 22,3)	3,7% (0 - 30,7)	24,6% (15,3 - 34)
MA (++) + (+++)			
nº absoluto	42 (9,5 - 86)	21,5 (2,5 - 126)	128 - 141
Percentagem	37,8% (15,2 - 58,7)	31,1% (5,1 - 68,5)	55,5% (44,6 - 66,5)

Resultados expressos em mediana (valor mínimo e máximo). O grupo agudo não foi comparado por ser composto por apenas 2 indivíduos.

macrófagos com partículas praticamente 95% das células continham partículas refringentes (Quadro III). Na Fig. 2 pode observar-se a pequena quantidade de partículas no interior dos macrófagos alveolares no LBA de um indivíduo-controlo, contrastando com o acentuado acometimento no doente com silicose aguda (Fig. 3).

Quando foi correlacionado o número total de macrófagos acometidos no LBA dos

particles (Table III). In Fig. 2, the small amount of particles inside the interior of the alveolar macrophages in the BAL of one of the control group individuals can be seen, contrasted with the greater amount affected found in the patient with acute silicosis (Fig. 3).

When the total number of affected macrophages in the BAL of silicotic patients is correlated with the duration of time the patient was exposed to silica dust (Fig. 4),

RELEVÂNCIA DO LAVADO BRONCOALVEOLAR NA QUANTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS INALADAS NAS DIVERSAS FORMAS DE SILICOSE

Valeria Barbosa Moreira, Ângela Santos Ferreira Porphiro José Soares, José Manoel Gabetto, Cristóvão Clemente Rodrigues

Table III – Particle positive macrophages in the simple, complicated and acute silicosis

Variables	Simple n = 12	Complicated n = 13	Acute n = 2
MA particles			
absolute nº	105.2 (53.5 - 157)	70.5 (49 - 184)	249.5 (212 - 287)
Percentage	35 % (17.8 - 52.3)	23.5% (16.3 - 61.3)	83.2% (70.7 - 95.7)
MA (+)			
absolute nº	60.8 (41 - 106.5)	56.5 (38.5 - 90.5)	115 (71-159)
Percentage	62.2% (41.3 - 84.8)	68.9% (31.5 - 94.9)	44.4 % (33.5 - 55.4)
MA (++)			
absolute nº	31.3 (9.5 - 61)	19.5 (2.5 - 69.5)	76.5 (69 - 84)
Percentage	26 % (15.2 - 41.6)	25.7% (5.1 - 37.8)	31% (29.2 - 32.5)
MA (+++)			
absolute nº	9.5 (0 - 27.5)	2.5 (0 - 56.5)	58 (44 - 72)
Percentage	9% (0 - 22.3)	3.7% (0 - 30.7)	24.6% (15.3 - 34)
MA (++) + (+++)			
absolute nº	42 (9.5 - 86)	21.5 (2.5 - 126)	128 - 141
Percentage	37.8% (15.2 - 58.7)	31.1% (5.1 - 68.5)	55.5% (44.6 - 66.5)

Results expressed in averages (minimum and maximum amounts). The acute patient group was not compared as it was composed of only 2 individuals.

pacientes silicóticos com o tempo de exposição à poeira de sílica (Fig. 4) observou-se que houve correlação significativa inversa entre estas variáveis ($r = -0,43$). Em relação ao tempo de afastamento do trabalho, não houve correlação significativa com acometimento dos macrófagos, mas observou-se uma tendência dos doentes com maior tempo de afastamento apresentarem menor número de macrófagos alveolares com partículas (Fig. 5).

an inverse significant correlation between these variables is seen ($r = -0.43$).

In relation to the length of retirement from work, there was no significant correlation to the affected number of macrophages but it was seen that patients retired from work for the greater amounts of time presented a lesser number of alveolar macrophages with particles (Fig. 5).

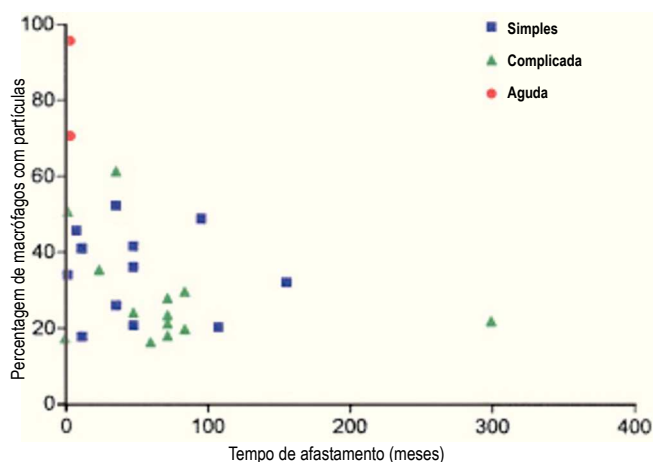


Fig. 5 – Percentagem de macrófagos com partículas em relação ao tempo de afastamento à poeira mineral

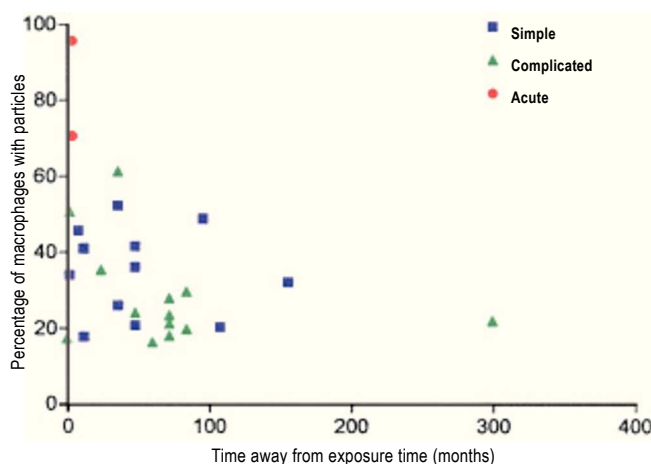


Fig. 5 – Percentage of macrophages with particles in relation to time away from exposure to mineral dust

Discussão

No estudo das pneumopatias ocupacionais, o lavado broncoalveolar tem sido utilizado para identificação de partículas e fibras, para descartar doença infecciosa associada, e vem contribuindo para o esclarecimento da patogénese destas doenças⁸.

Embora a presença de partículas no LBA não estabeleça o diagnóstico de doença ocupacional, porque apenas documenta exposição, a sua demonstração num doente com doença pulmonar intersticial difusa de causa indeterminada significa que este diagnóstico deve ser seriamente considerado e a exposição ocupacional cuidadosamente investigada⁹. Nos doentes com exposição conhecida, inúmeras partículas podem ser detectadas no LBA, tanto à microscopia óptica como à microscopia electrónica. Naqueles em que não há história conhecida de exposição ou nos casos de exposição mista, a análise

Discussion

In the study of work-related pneumopathies, bronchoalveolar lavage has been used to identify particles and fibres, to eliminate associated infectious diseases and add to the understanding of the pathogenesis of these diseases⁸.

While the presence of particles in the BAL does not establish the diagnosis of a work-related disease as it only documents exposure, its being present in a patient with diffuse interstitial lung diseases of an undetermined cause means that this diagnosis must be seriously considered and the work-related exposure carefully investigated⁹. In patients with known exposure, many particles can be detected in the BAL, with the optical microscope and the electronic microscope. In patients with no known history of exposure or in cases of mixed exposure, mineralogical analysis, electronic microscope techniques and x ray diffraction can be used to identify the agent^{10,11}.

mineralógica, empregando-se técnicas de microscopia electrónica e de difracção de raios X, pode ser utilizada para identificação do agente^{10,11}.

A presença de partículas refringentes no citoplasma dos macrófagos alveolares pode ser visualizada através da microscopia óptica com luz polarizada em pessoas com exposição ocupacional crónica, assim como na exposição ambiental incidental a silicatos. Embora 90% dos macrófagos alveolares, obtidos do LBA de trabalhadores com exposição ocupacional à sílica, possam conter partículas, geralmente menos de 5% dos macrófagos estarão acometidos na exposição ambiental¹². Esta diferença marcante na percentagem de macrófagos acometidos, entre indivíduos-controlo e silicóticos, foi relatada por alguns autores^{4,6}.

No estudo realizado por Christman et al⁴ avaliando 44 trabalhadores de granito, fumadores e não fumadores, verificou-se a influência do fumo, intensidade, duração e afastamento da exposição na quantidade de poeira recuperada das células do LBA. Os autores observaram que uma pequena fracção dos macrófagos alveolares dos controlos continha partículas visíveis à microscopia óptica com luz polarizada, e as partículas eram em pequeno número. A média de macrófagos com partículas foi de apenas 4,35%, sendo que 4 dos 42 controlos tinham mais de 5% das suas células com partículas. Os trabalhadores de granito apresentaram grande variação na percentagem de células com poeira, sendo que 33 trabalhadores tiveram mais que 10% dos macrófagos acometidos e 6 mais de 50% das células com partículas. O grupo de trabalhadores também apre-

The presence of refringent particles in the cytoplasm of the alveolar macrophages can be seen via an optical microscope with polarized light in people with chronic work-related exposure and in incidental environmental exposure to silica. Although 90% of the alveolar macrophages obtained through the BAL of workers with work-related exposure to silica may contain particles, generally less than 5% of the macrophages are affected via environmental exposure¹². This marked difference in the percentage of affected macrophages in control and silicotic individuals has been documented by several authors^{4,6}.

In a study carried out by Christman et al⁴ into 44 granite workers, both smokers and non-smokers, the influence of tobacco smoke, its intensity, duration and time away from exposure were seen in the amount of dust recovered from the cells of these patients' BAL. The authors noted that a small fraction of the alveolar macrophages of the control group individuals contained particles visible under an optical polarized light microscope and that there were only a small amount of particles. The average number of macrophages with particles was 4.35%, with only 4 of the 42 control group individuals having more than 5% of their cells with particles. The granite workers presented a great variety in the percentage of cells with dust, with 33 of the workers having more than 10% of their macrophages affected and 6 over 50% of their cells with particles. The group of workers also had a larger number of cells with a great amount of particles inside. Tobacco smoke did not affect the amount of dust

O fumo não interferiu com a quantidade de poeira presente.

sentou uma maior proporção de células com grande carga de partículas no seu interior. O fumo não interferiu com a quantidade de poeira presente. A percentagem de células positivas para partículas relacionou-se com a intensidade da exposição, porém fracamente com a duração da exposição, com grande variação entre os indivíduos. O afastamento levou a uma diminuição do conteúdo mineral no LBA.

Possível distinguir a exposição ocupacional da ambiental.

No presente estudo foram observados resultados semelhantes. A população de silicóticos foi significativamente diferente dos controlos em relação à percentagem de macrófagos positivos para partículas ($p < 0,05$) sendo, portanto, possível distinguir a exposição ocupacional da ambiental. Nos doentes com silicose, 29,7% dos macrófagos foram positivos, enquanto apenas 2,7% dos macrófagos alveolares do grupo--controlo estavam acometidos. No grupo--controlo, apenas 1 indivíduo apresentou mais de 5% das células positivas. No grupo de silicóticos, 22 doentes tinham mais do que 20% dos macrófagos com partículas e 5 mais do que 50% das células acometidas. Nos doentes com silicose aguda, a percentagem de macrófagos com partículas foi muito elevado (70,7% e 95,7%), confirmando a importância da intensidade da exposição na carga de poeira recuperada. Os doentes com silicose tiveram uma grande proporção de macrófagos classificados como 2 e 3 cruces, contrastando com os controlos dos quais apenas 1 indivíduo apresentou células na classificação de 2 cruces. Neste estudo também não houve interferência do fumo nos níveis de retenção alveolar de partículas. Relativamente ao tempo de

Não houve interferência do fumo nos níveis de retenção alveolar de partículas.

present. The percentage of cells positive for particles was connected to the intensity of exposure, not strictly to the amount of time the individual had been exposed, and there was a great variety between the individuals. Time away from exposure led to a decrease in the mineral content of the BAL.

This study observed similar results. The silicotic population was significantly different to the control population in terms of the percentage of macrophages positive for particles ($p < 0.05$). In this way it was possible to single out work-related exposure from environmental exposure. 29.7% of the patients with silicosis had positive macrophages, whereas only 2.7% of the alveolar macrophages of the control group were affected. In the control group, only 1 individual presented more than 5% of positive cells. In the silicotic group, 22 patients had over 20% of macrophages with particles and 5 over 50% of cells affected. The percentage of macrophages with particles was very high in the patients with acute silicosis (70.7% and 95.7%), confirming the importance of the intensity of exposure in the amount of dust recovered. The patients with silicosis had a large proportion of macrophages classified as 2 or 3 crosses in contrast to the control individuals, only one of whom presented cells classified as 2 crosses.

This study showed that tobacco smoke had had no affect on the patients' levels of alveolar retention. An inverse significant correlation in relation to the amount of time the patient was exposed was seen, in that patients who had been less exposed presented a larger amount of recovered particles. This may be explained by the

exposição, observou-se uma correlação inversa significativa, ou seja, os doentes com menor tempo de exposição apresentaram uma maior carga de partículas recuperadas. Isto pode ser explicado pelo tipo de actividade exercida pelos trabalhadores, a maioria extractores de areia expostos a concentrações elevadas de sílica, denotando uma maior importância da intensidade da exposição em relação ao tempo em que ficam expostos. Os pacientes com silicose aguda que tiveram um curto tempo de exposição à sílica, porém de grande intensidade, apresentaram os macrófagos alveolares maciçamente preenchidos com cristais. Relativamente ao tempo de afastamento, os resultados foram semelhantes ao encontrado na literatura. Os doentes com maior tempo de afastamento apresentaram menor número de macrófagos positivos para partículas.

Lusuardi et al⁵ quantificaram a carga de poeira alveolar no LBA de 23 doentes silicóticos, 12 expostos sem silicose e 10 indivíduos-controlo. Os autores relataram que a mediana do número de partículas refringentes por 100 macrófagos alveolares dos controlos foi de 13,5 (variação de 6 a 24), enquanto nos silicóticos e trabalhadores expostos não silicóticos os valores foram 76% e 65%, respectivamente. Silicóticos e expostos não mostraram diferença significativa entre si, mas ambos foram significativamente diferentes quando comparados com os controlos. Os autores também não observaram relação entre a quantidade de sílica e a duração da exposição ou o grau de envolvimento da radiografia de tórax.

Ainda não se conhecem os mecanismos pelos quais as partículas de sílica induzem

type of work carried out by these workers, the majority of whom were sand workers exposed to high concentrations of silica, which places great importance on the intensity of exposure in relation to the duration of time in which the individual was exposed. The patients with acute silicosis who had had a short time of exposure to silica, although to a great intensity, presented alveolar macrophages densely packed with crystals. In terms of time away from exposure, the results were similar to those arrived at in other studies. The patients who had had longer away from exposure presented a lesser number of macrophages positive for particles.

Lusuardi et al⁵ quantified the amount of alveolar dust in the BAL of 23 silicotic patients. 12 of these had been exposed without silicosis and 10 were control individuals. The authors report that the average number of refringent particles per 100 alveolar macrophages of the control individuals was 13.5 (variation from 6 to 24) while the silicotic patients had 76% and the non-silicotic workers who had been exposed had 65%. The silicotic and non-exposed individuals did not show significant difference between themselves, but both were significantly different when compared with the control group. In addition, the authors did not report a relationship between the quantity of silica and the duration of time of exposure or the degree of involvement in the chest radiography.

The mechanisms by which the silica particles cause injury to lung tissue, leading to inflamed cells and fibrosis, are not yet known. The interactions between the silica particles and the alveolar macrophages are

Não se conhecem os mecanismos pelos quais as partículas de sílica induzem a injúria do tecido pulmonar, recrutamento das células inflamatórias e fibrose.

a injúria do tecido pulmonar, recrutamento das células inflamatórias e fibrose. As interações entre as partículas de sílica e os macrófagos alveolares são consideradas como o evento central na patogénese da silicose, porque os macrófagos residentes e recrutados participam activamente desde a fagocitose inicial da partícula de sílica inalada até à modulação da fibrose no pulmão¹³.

A literatura é escassa no que se refere à quantificação de partículas no interior dos macrófagos alveolares nos casos de exposição à sílica com ou sem silicose. A possibilidade de se avaliar a carga de sílica alveolar pode ser de importante valor diagnóstico nos casos iniciais da doença e naqueles em que a história ocupacional, achados radiológicos ou ambos não são conclusivos. Da mesma forma, é importante definir os constituintes do LBA em trabalhadores expostos, sem evidência clínica ou radiológica de doença. Futuras investigações são necessárias para definir mais claramente o papel do LBA em estimar a carga de sílica alveolar.

Certamente, a análise comparativa do conteúdo tissular de partículas e das células do LBA será de grande interesse, e possivelmente o LBA poderá tornar-se um método mais útil na avaliação de trabalhadores com exposição ocupacional a várias poeiras minerais.

considered as the central event in the pathogenesis of silicosis, in that the resident and recruited macrophages actively participate from the initial phagocytosis of the inhaled silica particle to the modulation of the lung fibrosis¹³.

There is not much reported on the measurement of particles in the interior of the alveolar macrophages in cases of exposure to silica with or without silicosis. The possibility of evaluating the amount of alveolar silica could be an important diagnostic tool in the initial cases of the disease and in those cases in which either the work history, the radiological findings or both are inconclusive. In the same way, it is important to define the components of the BAL in exposed workers, without clinical or radiological evidence of the disease.

Further research is necessary to define more clearly the role of BAL in estimating the amount of alveolar silica.

It is certain that comparative analysis of the tissular content of the particles and the cells of the BAL would be extremely useful and that BAL could possibly become a more useful method in the evaluation of workers with work-related exposure to several types of mineral dust.

A possibilidade de se avaliar a carga de sílica alveolar pode ser de importante valor diagnóstico.

Bibliografia/Bibliography

1. Costabel, U. Bronchoalveolar lavage. Characteristics of the bronchiolar diseases. In: Epler, G.R. Disease of the bronchioles. New York, Raven Press 1994; p. 59-76.
2. Ferreira A. Doenças ocupacionais pulmonares. In: Corrêa da Silva, L.C. Endoscopia Respiratória. Rio

RELEVÂNCIA DO LAVADO BRONCOALVEOLAR NA QUANTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS INALADAS NAS DIVERSAS FORMAS DE SILICOSE

Valeria Barbosa Moreira, Ângela Santos Ferreira Porphiro José Soares, José Manoel Gabetto, Cristóvão Clemente Rodrigues

de Janeiro, Revinter 2002; p. 224-31.

3. Christman J W; Emerson R J; Graham W G B; Davis G S. Mineral dust and cell recovery from the bronchoalveolar lavage of healthy Vermont granite workers. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 393-9.

4. Christman, J W; Emerson R; Hemenway D R; Graham W G B; Davis G S. Effects of work exposure, retirement, and smoking on bronchoalveolar lavage measurements of lung dust in Vermont granite workers. *Am Rev Respir Dis* 1991;144: 1307-13.

5. Lusuardi M; Capelli A;Donner C F; Capelli O; Velluti G. Semi-quantitative X-ray microanalysis of bronchoalveolar lavage samples from silica-exposed and nonexposed subjects. *Eur Respir J* 1992: 5: 798-803.

6. Weber S L; Lapp N L; Vallyathan V; Castranova V; Shumaker J, Schivegler-Berry D. Role of cytokines and mineral particle profile in the development of coal workers pneumoconiosis as assessed by bronchoalveolar lavage. *Appl Occup Environ Hyg*1996; 11: 923-7.

7. International Labour Office. Guidelines for the use of ILO International Classification of Radiographs of Pneumoconiosis. Revised Edition 1980. Geneva. ILO, 1980. [Occupational Safety and Health Series No. 22].

8. Ferreira A S. Importância do lavado broncoalveolar no estudo do microambiente pulmonar na silicose. Porto Alegre, 1997a [Tese de doutoramento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul]

9. Algranti E. Métodos de investigação em doenças ocupacionais pulmonares. *J Pneumol*1994; 20 (4): 165-73.

10. Johnson N F; Haslam P L; Dewar A; Newmantaylor A J; Turner-warwick M. Identification of inorganic dust particles in bronchoalveolar lavage macrophages by energy dispersive x-ray microanalysis. *Arch Environ Health* 1986;41 (3): 133-44.

11. Klech H, Pohl W. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989; 2: 561-85.

12. Goldstein RA; Rohatgi D K; Bergofsky E H; Block E R; Daniele R P; Dantzker D R; Davis G. S; Hunninghake G W; King T E; Metzger W J; Rankin J A; Reynolds H Y; Turino G M. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1990;142: 481-6.

13. Mossman B T S. Churg A. Mechanisms in the Pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;156: 1666-80.