

## Presencia de cuerpos ferruginosos y expresión de marcadores del metabolismo del hierro en pulmones humanos

Marco Daniel Fernández-Castillo<sup>1</sup>, David Rodrigo Quintero-Casas<sup>1</sup>, Rosa María Rivera-Rosales<sup>3</sup>,  
 María Eugenia Vázquez-Manríquez<sup>2</sup>, Mario Pérezpeña-Díazcont<sup>4</sup>,  
 Eva Ramón-Gallegos<sup>2</sup>, Francisco Arenas-Huertero<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Simón Bolívar

<sup>2</sup>Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

<sup>4</sup>Hospital Infantil de México Federico Gómez

### Resumen

La contaminación del aire es producida por fuentes naturales e industriales. Son pocos los estudios que relacionan contaminantes naturales como el hierro (Fe) con enfermedades pulmonares; además no existe información del tema en nuestro país. El objetivo del trabajo fue documentar la presencia de cuerpos ferruginosos (CF) aislados de pulmón con tuberculosis (Tb), fibrosis (Fib) y cáncer pulmonar, por la técnica de digestión en blanqueador comercial. También se evaluó la expresión por RT-PCR semicuantitativo del RNAm de 3 marcadores del metabolismo de Fe: la ferritina (Fer), el receptor de la lactoferrina (Lfr) y la hemo-oxigenasa-1 (HOX-1). Los resultados mostraron que los casos de Tb presentaron una expresión 1.37 y 1.8 veces más para Fer y Lfr, respectivamente, que la observada en pulmones de niños. Los casos de Fib redujeron 0.22 veces más la expresión de HOX-1. Con relación a los CF, 9/30 (30%) casos de Tb presentaron CF con 17 CF/g, y sólo en 4/29 (13.8%) casos de Fib se verificaron los CF con 42.5 CF/g. Los resultados demuestran la presencia de partículas inorgánicas, además de que los 3 marcadores pueden ser útiles para confirmar el diagnóstico de enfermedades como la Tb y la Fib pulmonar.

**Palabras clave:** tuberculosis, ferritina, hierro.

### Abstract

Air pollution is produced by different sources: natural and industrial emissions. In Mexico there is little information about the relationship between iron as a natural contaminant and lung diseases. One of the main concerns of this paper was to prove the presence of ferruginous bodies (FB) as markers of inorganic pollution in lung tissue with tuberculosis (Tb), fibrosis (Fib) and lung cancer. FB were isolated by the tissue digestion technique in sodium hypochlorite. Also, mRNA expression of ferritin (Fer), lactoferrin receptor (Lfr) and hemo-oxigenase-1 (HOX-1) were evaluated by semiquantitative RT-PCR. The results showed that in Tb there was an increase of 1.37- and 1.8-fold of Fer and Lfr, respectively, from the levels presented in children's lungs. Fib cases decreased to 0.22-fold the expression of HOX-1. In relation to FB, 9/30 cases (30%) with Tb were positive with 17 FB/g, and only 4/29 cases (14%) of Fib had FB with 42.5 FB/g. The results above verify the presence of inorganic particles inside the lungs and the potential use of these three molecular markers to diagnose lung diseases as Tb and Fib.

**Keywords:** tuberculosis, ferritin, iron.

## Introducción

La actividad humana en las grandes urbes, como la ciudad de México, produce un fuerte impacto en el ciclo regional y global de los metales, induciendo su acumulación en la atmósfera y provocando contaminación importante en el aire que respiramos (Turi et.al., 2004; Chauveau, 2004). El fierro (Fe) es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre, por lo que todos los organismos debieron desarrollar mecanismos para mantener su homeostasis, desde bacterias hasta mamíferos como el ser humano (Ghio et.al., 2006; Turi et.al., 2004).

De esta manera, el pulmón tiene que metabolizar el Fe contenido en las partículas o polvo diario del aire que respiramos. Al no ser eliminado, el Fe en el interior del organismo debe conjugarse con la ferritina (Fer) (Ghio et.al., 2006; Turi et.al., 2004). Primero debe ser transportado al interior celular vía transferrina (Tf) y de la interacción con su receptor (TfR). También lo puede hacer vía lactoferrina (Lf) y su receptor (LfR) (Turi, 2004; Ghio, et.al., 2004). Debido a que la Lf se localiza más en sitios del organismo que tienen contacto con el medio externo, por ejemplo en epitelios secretores, se sugiere que la Lf juega un papel en la desintoxicación del Fe (Turi et.al., 2004) y de la ferroproteína 1 (FP-1) en células epiteliales de la vía aérea (Yang et.al., 2005). La Lf y su receptor LfR, presentan un considerable incremento posterior a la exposición al Fe (Turi et.al., 2004), siendo éstos los dos mecanismos de desintoxicación con que cuenta el pulmón.

Existe otra forma de metabolizar el Fe proveniente de fuentes endógenas como el de las proteínas tipo hemo. Su degradación la realiza la hemo-oxigenasa-1 (HOX-1) que genera  $\text{Fe}^{2+}$  y biliverdina. Este  $\text{Fe}^{2+}$  puede sufrir oxidación a  $\text{Fe}^{+3}$  y formar un complejo con la Fer (Keel et.al., 2008). Por otro lado, el  $\text{Fe}^{3+}$  es un inductor importante de formación de radicales libres y especies de oxígeno reactivas que pueden inducir daño pulmonar, por lo que debe ser conjugado intracelularmente (Ghio et.al., 2006; Turi et.al., 2004; Ghio et.al., 2004). Este estrés oxidativo generado sinergiza el daño pulmonar que pueden provocar exposiciones al humo del cigarro, endotoxinas bacterianas, partículas inorgánicas, ozono, así como agentes químicos (Turi et.al., 2004).

Por otro lado, las alteraciones en la homeostasis del Fe en el tracto respiratorio a nivel alveolar, generalmente se presentan en padecimientos pulmonares como neumonías, fibrosis quística, sarcoidosis, EPOC

(enfermedad pulmonar obstructiva crónica), enfermedad intersticial, síndrome de insuficiencia respiratoria progresiva y en el carcinoma broncogénico (Turi et.al., 2004). Finalmente, el pulmón debe reaccionar al contacto con partículas inorgánicas y parte de esa reacción es recubrirlas con ferroproteínas, que lejos de prevenir efectos nocivos como se pensaba, activan vías de inducción de daño por el mecanismo tóxico del Fe, al formarse hemosiderina más que Fer, generando los cuerpos ferruginosos (CF) (Ghio et.al., 2004).

## Objetivo

Gran parte de las descripciones de los genes que participan en el metabolismo del Fe están basados en modelos animales y en cultivo de células bronquiales, expuestos a altas dosis de diferentes formas de Fe, de tal manera que los sistemas responden a esta inducción (Brain, et.al., 2006). Pero no existe ningún trabajo que describa cómo se altera la expresión de estos marcadores en tejido de la población en general con enfermedad pulmonar, debido al desconocimiento de las formas en que se metaboliza el Fe en los pulmones de los mexicanos. Además solamente existen algunos datos de su respuesta a partículas inorgánicas (Arenas-Huertero et.al., 1994).

Por esta razón, el presente estudio tiene por objeto determinar la presencia de CF como indicadores de contaminación ambiental por partículas inorgánicas, además como fuentes importantes de Fe en estado oxidativo como hemosiderina. También se evaluó la expresión de algunos marcadores del metabolismo del Fe en tejido pulmonar de casos con tuberculosis (Tb), fibrosis (Fib) y cáncer pulmonar (Ca).

## Método

**Tejido pulmonar humano.** Se incluyeron para la cuantificación de los CF 30 casos de autopsia con diagnóstico de Tb, 29 casos con Fib y 28 casos con Ca pulmonar, del banco de autopsias realizadas en el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), perteneciente a la Secretaría de Salud (SS). Estos casos fueron de adultos mayores de 20 años de edad que fallecieron por complicaciones respiratorias. Se conformó un segundo grupo de 40 casos para el análisis de expresión de los marcadores del metabolismo del Fe: 10 casos de cada una de las 3 enfermedades pulmonares descritas; 5 casos de tejido

pulmonar de mineros que laboraron por más de 20 años y 5 casos de tejido pulmonar de niños menores de 2 años de edad, que fallecieron por causas no relacionadas a enfermedad pulmonar. Dichos casos se obtuvieron del Departamento de Patología de Hospital Infantil de México Federico Gómez, S.S. y se incluyeron como tejido pulmonar con menor exposición a contaminantes.

**Aislamiento de los CF de pulmón humano.** Un gramo de tejido pulmonar fresco, preferentemente libre de lesión, se sometió a digestión en 20 ml de hipoclorito de sodio al 7% (blanqueador comercial), prefiltrado. La fracción inorgánica liberada se centrifugó durante 5 minutos a 3 000 rpm para concentrar los CF. Posteriormente se realizó un lavado en volúmenes iguales de etanol (Baker) al 50% y cloroformo (Baker), centrifugando en las mismas condiciones anteriores. Al término, se colectó el carbón y residuos grasos en la interfase, para eliminar el etanol al 50% remanente. Posteriormente, se resuspendió la fracción de los CF del fondo del tubo con 1 ml de etanol al 90%. Se realizaron 2 lavados más con el mismo volumen de etanol y los CF totales se concentraron por filtración en membranas de 0.45 mm (Millipore). Finalmente las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente, se aclararon con xileno (Baker) y se montaron en portaobjetos con resina sintética para observarlas en microscopio de campo claro y cuantificar los CF totales por caso.

**Diseño de los iniciadores de los genes de estudio.** Los números de acceso del GenBank de cada uno de los genes de estudio fueron: cadena pesada de la ferritina, BC073750; receptor de la lactoferrina, AF271386; hemo-oxigenasa-1, NM\_002133; gliceraldehído fosfato-deshidrogenasa, gen constitutivo (GAPDH), AF261085. Las secuencias de los iniciadores se diseñaron en base al cDNA y fueron: Fer-F: 5'-TCGCAGGTGCGCCAGA-3', Fer-R: 5'-GCAAAGTTCTTCAAAGCCACAT-3'; LfR-F: 5'-TAAGTCCCCCATGCAGCACT-3', LfR-R: 5'-GTCCAACACTTCTTCTCCA-3'; GAPDH-F: 5'-TCCCATCACCATCTCCAG-3', GAPDH-R: 5'-ATGAGTCCTCCACGATACC-3'.

**Aislamiento del RNAm de cortes histológicos incluidos en parafina.** Tres cortes de 8 mm de tejido pulmonar con Tb, Fib, Ca, de mineros y de niños menores de 2 años de edad, fueron desparafinados con xileno a 50° C y posteriormente con 2 cambios de alcohol absoluto, hasta secarlos durante 15 min. Se realizó la extracción del RNAm de acuerdo a la descripción contenida en el *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation* (AMBION). Posteriormente se eluyó el RNA limpio de la resina con 30 ml de agua libre de RNAsas, precalentada a

95° C. Este paso se repitió una vez más para asegurar un mayor rendimiento del proceso. Finalmente el RNA aislado de tejido se almacenó a -20° C con 1 ml de inhibidor de RNAsas.

**Síntesis de cDNA y amplificación de los fragmentos de los genes de Fer, LfR, HOX-1 y GAPDH.** Diez ml de cada RNA se sometieron a síntesis de cDNA de acuerdo con la condiciones descritas en el "First Strand cDNA Síntesis Kit" (Fermentas). Las reacciones de amplificación de los fragmentos de los genes de estudio se realizaron en un termociclador Biometra Tpersonal thermocycler (Whatman), en un volumen final de 20 ml. Las condiciones de la amplificación fueron: desnaturalización inicial, 95°C/5 min; ciclo de amplificación, desnaturalización 95°C/45 seg.; alineamiento Tm de cada iniciador/45 seg.; elongación 72°C/45 seg.; elongación final 72°C/5 min y salida 20°C/3 min. Se siguieron las condiciones de reacción de acuerdo a las especificaciones del kit de *GoTaq* (PROMEGA). El tamaño de los fragmentos amplificados fue: Fer, 140 pb; LfR, 141 pb; HOX-1, 108 pb; GAPDH, 208 pb. El análisis final se realizó a 30 ciclos de amplificación, en las cuales no existió saturación de la reacción.

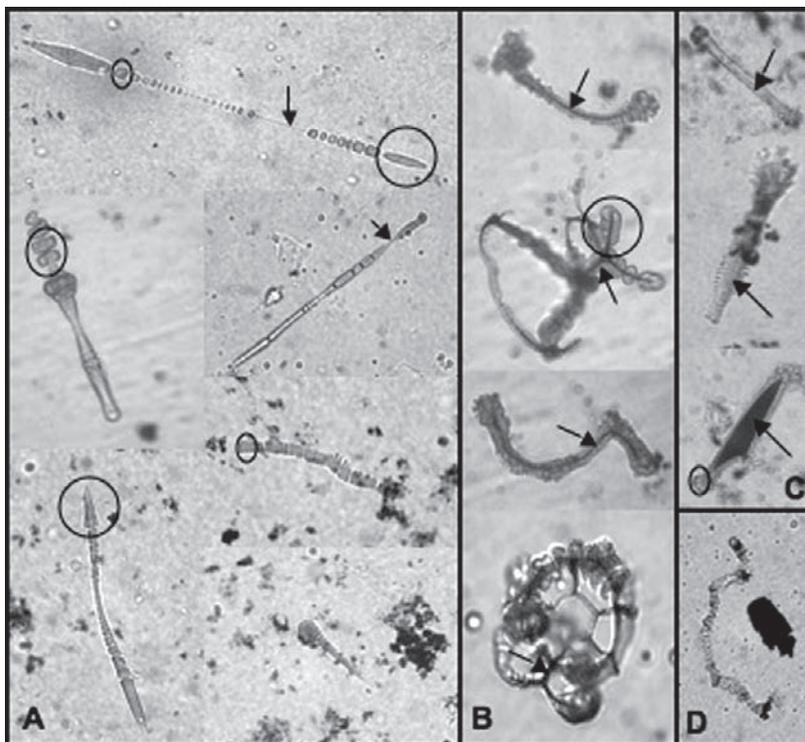
**Análisis de las bandas de amplificación, densitometría de los productos y obtención de la relación de expresión.** Las bandas de amplificación de cada gen se revelaron en geles de poliacrilamida al 12% mediante la tinción de plata. Previamente los geles se fijaron en etanol 10%-ácido acético 0.5% durante 10 min con agitación. A continuación se expusieron en la solución de tinción de nitrato de plata al 0.2% preparada en la misma solución fijadora durante 5 min con agitación. Finalmente, las proteínas se revelaron en hidróxido de sodio al 3%-formaldehído 0.15% hasta la aparición de las bandas. De cada gel se obtuvieron imágenes digitales y en éstas se cuantificó por densitometría la intensidad de cada banda, utilizando el programa ImageJ. Finalmente se obtuvo la relación de expresión dividiendo la densidad integrada de cada gen problema entre la obtenida del gen constitutivo, GAPDH.

**Análisis estadístico.** Se obtuvo la relación de expresión de cada gen y se evaluaron las diferencias de expresión de cada grupo problema: Tb, Fib y Ca, con la relación de expresión obtenida del pulmón de niños menores de 2 años, como control de exposición a Fe. Estas diferencias se evaluaron realizando la prueba "t" de student. Las diferencias en las medianas de CF entre los 3 grupos se evaluaron utilizando la prueba de Mann-Whitney. Se consideraron significativas cuando el valor de p fue menor a 0.05.

## Resultados

En todos los casos con enfermedad pulmonar se aislaron CF del tejido. Se observaron todos los tipos, desde los denominados típicos que tienen composición de asbesto (ver figura 1A). Es evidente el pleomorfismo de todos estos CF, en algunos lo es aún más la presencia de la fibra inorgánica (flecha) y en todos se encuentra el recubrimiento con ferroproteína que pueden ser esféricos o poligonales (círculo). Algunos CF presentaron centro de carbón (ver figura 1B), placas probablemente de silicatos no asbestos (ver figura 1C) y de ceniza de Diesel (ver figura 1D).

Figura 1. Cuerpos ferruginos aislados de digeridos pulmonares.



Se muestran los diferentes tipos morfológicos: A. CF típicos; B. atípicos con centro de carbón; C. atípicos con centro de silicatos no asbestos; D. cenizas de producto de combustión de diesel. Todos tomados a 40X. Se ilustra el centro o fibra (flechas) y las subunidades de recubrimiento proveniente del macrófago alveolar (círculos). Nótese el pleomorfismo de los CF.

Estas subunidades del recubrimiento tienen un color amarillo-dorado característico que les permite reconocerlos fácilmente en el microscopio de campo claro. De acuerdo con la enfermedad pulmonar, 9/30 casos con Tb presentaron CF (30%) y su mediana de concentración fue de 17 CF/g. Esta mediana contrastó con la observada en Fib y Ca, aunque el número de casos positivos a CF fueron menores (ver tabla 1). Estas diferencias no fueron significativas; sin embargo, es patente la presencia de estas partículas.

Tabla 1. Medianas de concentración de CF en tejido pulmonar humano con diferentes enfermedades.

ENFERMEDAD	INTERVALO (CF)	CON CF (%)	MEDIANA*
Tuberculosis	0-153	9/30 (30)	17 CF/g
Fibrosis	0-204	4/29 (14)	42.5 CF/g
Cáncer	0-306	6/28 (21)	34 CF/g

\* Expresada en número de CF por gramo de tejido en peso seco.

**Tabla 2.** Índice de expresión de los genes de Fer, Lfr y HOX-1, y su variación en tejido pulmonar humano.

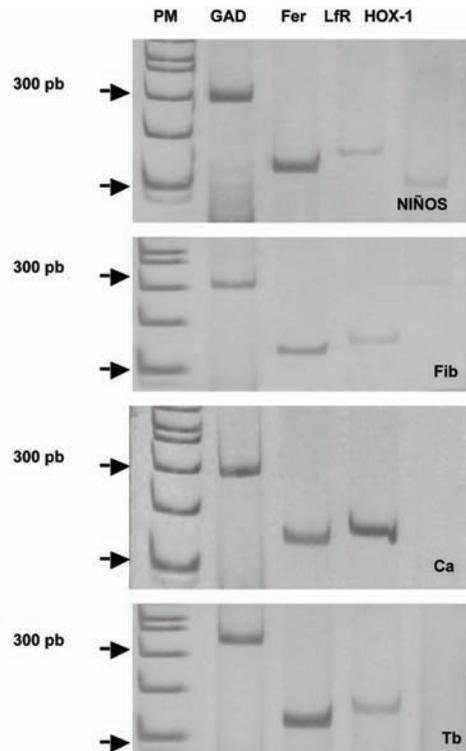
TIPO DE TEJIDO	Fer	VAR*	Lfr	VAR*	HOX-1	VAR*
Tuberculosis	1.06	1.04	0.33	1.8	0.11	0.64
Fibrosis	0.9	1.16	0.2	1.1	0.038	0.22
Cáncer	0.74	1.0	0.19	1.0	0.16	0.94
Mineros	0.77	1.0	0.22	1.1	0.2	1.17
Niños**	0.77	-----	0.18	-----	0.17	-----

\* VAR, variación en base a la expresión obtenida en pulmones de niños.

\*\* Menores de 2 años de edad.

Se estudiaron todos los casos que expresaron el gen constitutivo, GADPH, (ver figura 2). Se analizaron originalmente 6 marcadores del metabolismo del Fe, y sólo se observó la expresión de tres de ellos en pulmón: Fer, Lfr y HOX-1 (ver figura 2). El análisis se realizó a 30 ciclos de amplificación. Se tomó como índice de expresión basal de cada marcador el obtenido de pulmones de niños menores de 2 años. De esta manera se evaluó la variación del índice de expresión de cada gen por enfermedad pulmonar. La Fer y el Lfr se incrementaron 1.4 y 1.8 veces más del observado en niños (ver tabla 2). En esta última la diferencia fue estadísticamente significativa. Finalmente se observó una disminución importante en la expresión de la HOX-1 en los casos con Fib, de 0.22 veces menos que la observada en niños. Esta diferencia fue significativa. No se observaron variaciones en los índices de expresión tanto en pulmones de mineros como en los casos de cáncer pulmonar.

**Figura 2.** Amplificación de fragmentos de los genes Fer, Lfr y HOX-1 de tejido pulmonar con enfermedades pulmonares: Fib, Ca y Tb



También se muestra el patrón de expresión de pulmón de niños menores de 2 años. GAD, gliceraldehído fosfato-deshidrogenasa como control constitutivo. PM, marcador de 100 pares de bases. A la izquierda se indica el peso (flechas) de algunas bandas. Productos separados en gel de poliacrilamida y teñidos con plata.

## Discusión

El indicador de CF como contaminante ambiental se utilizó para verificar la exposición a polvos inorgánicos que son las fuentes principales de Fe. De tal manera que la hipótesis de trabajo fue que aquellas enfermedades con más casos con CF y altas concentraciones, pueden verificar la posible exposición al Fe del polvo ambiental.

Ninguno de los tres grupos presentó más del 50% de los casos con CF, como sucede en otras series, lo que sugiere al menos en estos grupos una exposición muy baja a polvos inorgánicos. Utilizando a los CF como indicadores de contaminación, se sabe que concentraciones menores de los 100 CF/g corresponden a exposiciones de la población en general (Arenas-Huertero et.al., 1992a). Los 3 grupos presentaron concentraciones por debajo de este parámetro. Sin embargo, se pueden discutir puntos importantes. El número de casos con Fib y Ca positivos a CF fue menor pero su concentración fue alta en comparación de la observada en casos con Tb. Los casos con Fib en otra serie analizada en México (Arenas et.al., 1992b) fueron los que presentaron mayores concentraciones de CF/g.

La retención de partículas inorgánicas puede estar relacionada al desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, para el caso de cáncer pulmonar, no parece correlacionar que las altas concentraciones de CF estén participando en el desarrollo del cáncer, observado también en otras series estudiadas de México (Arenas-Huertero et.al., 1992b; Arenas-Huertero et.al., 1994) y en Estados Unidos (Churg y Warnock, 1977). Desgraciadamente, no existen trabajos que analicen tejido pulmonar de población en general, en los últimos 10 años. Los estudios se han centrado más al análisis de casos expuestos, ya sea de manera natural u ocupacionalmente.

El hecho de que en la serie de casos con Tb se presentaran bajas concentraciones de CF, puede reflejar que la variación en el índice de expresión de los marcadores moleculares del metabolismo del Fe esté más relacionada a los mecanismos propios de la enfermedad. Además, el tejido pulmonar utilizado en el estudio molecular de las tres enfermedades fue de zonas con lesiones. Esto puede explicar por qué los casos con Tb presentaron una elevación de los índices de expresión de los genes de Fer y LfR.

Estos resultados correlacionan con los reportes descritos por Monfeli y Beeson (2008), Basaraba et.al. (2007) y Weinberg (2008), quienes puntualizan la importancia de la expresión de proteínas de unión al Fe en la patogenicidad de la bacteria de la tuberculosis.

El LfR también es inducido por exposición a Lf y cenizas en pulmones humanos (Ghio et.al., 1999), por lo tanto, el incremento del índice de expresión de Fer y LfR en estos casos de Tb, puede estar relacionado con el estado y progresión de la enfermedad. Además, el Fe en esta enfermedad puede provenir más de fuentes endógenas, propiamente de macrófagos que se activan con Fe proveniente del hemo, para activar los mecanismos de defensa contra la bacteria (Monfeli y Besson, 2007).

No es fácil explicar la disminución en el índice de expresión del gen HOX-1 en los casos de Fib. Éste puede explicarse en parte por la baja cantidad de tejido pulmonar "funcional" en estas muestras. Este resultado es importante, porque puede utilizarse como marcador de estado terminal de fibrosis pulmonar, de muestras de líquido de lavados bronquiolo-alveolares de pacientes. También el marcador de LfR puede utilizarse, ya que dependiendo de los niveles de expresión pueden reflejar el grado y la magnitud de la enfermedad activa.

No se observaron variaciones en los índices de expresión de los tres genes en los casos de Ca y de mineros. Para el caso del Ca pulmonar, Kondo et.al. (1990) analizaron la expresión por inmunohistoquímica del LfR en diferentes grados de diferenciación de adenocarcinoma pulmonar. Sus resultados mostraron una alta frecuencia de expresión del LfR, en tumores altamente proliferativos y poco diferenciados. Sin embargo, en el presente estudio no se encontró variación en los índices de expresión de los genes estudiados. Variaciones raciales pueden también estar participando en generar diferencias en los patrones genéticos expresados. Finalmente, estos resultados son importantes, porque permiten hacer extensivo el estudio a un mayor número de casos, especialmente al estudiar los diferentes tipos de cáncer pulmonar, y por otro lado al correlacionar las variaciones en los índices de expresión de estos genes, en muestras biológicas obtenidas por métodos menos invasores.

## Conclusión

De los resultados obtenidos del presente estudio, se puede concluir que:

Los pacientes con enfermedades pulmonares estudiados en esta serie, retienen CF como indicadores de exposición a polvos inorgánicos. Son bajas las concentraciones y el número de casos positivos. Por lo que es probable que también sean bajos los niveles de exposición al Fe ambiental.

Los casos con Fib presentaron mayores concentraciones de CF que la observada en los casos con Tb y Ca.

El incremento en el índice de expresión de los genes de Fer y LfR en los casos de tuberculosis puede estar más relacionado al proceso infeccioso de la enfermedad, que a la exposición ambiental al Fe.

La disminución del índice de expresión del gen HOX-1 en los casos con Fib puede reflejar la ausencia de tejido pulmonar funcional. Este puede ser un posible marcador de enfermedad terminal. 

## Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por la Coordinación de Investigación de la Universidad Simón Bolívar, de la convocatoria de apoyo a proyectos de investigación para el ciclo escolar 2007-2008.

## Referencias

- Arenas-Huertero, F., Salazar-Flores, M. y Osornio-Vargas, A. R. (1994). Ferruginous bodies as markers of environmental exposure to inorganic particles: experience with 270 autopsy cases in Mexico. *Env Res* 64: 10-17.
- Arenas-Huertero, F. J., Salazar-Flores, M. y Pasquel-García, P. (1992a). Ferruginous bodies in cases with occupational and non-occupational exposure to inorganic dusts. Study with 40 cases matched. *Arch Med Res* 23: 169-175.
- Arenas Huertero, F. J., Ramírez Hernández, A., Osornio Vargas, A. R., Pasquel García, P., Montoya Jiménez, B. A. y Salazar Flores, M. (1992b). Presencia de cuerpos ferruginosos en tejido pulmonar canceroso. *Salud Pública Méx* 34: 449-454.
- Basaraba, R. J., Bielefeldt-Ohmann, H., Eschelbach, E. K., Reisenhauer, C., Tolnay, A. E., Taraba, L. C., Shanley, C. A., Smith, E. A., Bedwell, C. L. y Chlipala, E. A. (2008). Increased expression of host iron-binding proteins precedes iron accumulation and calcification of primary lung lesions in experimental tuberculosis in the guinea pig. *Tuberculosis* 88: 69-79.
- Brain, J. D., Heilig, E., Donaghey, T. C., Knutson, M. D., Wessling-Resnick M. y Molina, R. M. (2006). Effects of Iron Status on Transpulmonary Transport and Tissue Distribution of Mn and Fe. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 330-337.
- Chauveau, L. (2004). *Petit atlas des risques écologiques*. Paris: Larousse.
- Churg, A. y Warnock, M. L. (1977). Analysis of the cores of ferruginous (asbestos) bodies from the general population. I. Patients with and without lung cancer. *Lab Invest* 37: 280-286.
- Ghio, A. J., Carter, J. D., Dailey, L. A., Devlin, R. B. y Samet, J. M. (1999). Respiratory epithelial cells demonstrate lactoferrin receptors that increase after metal exposure. *Am. J Physiol* 276: L933-L940.
- Ghio, A. J., Churg, A. y Roggli, V. L. (2004). Ferruginous bodies: implications in the mechanism of fiber and particle toxicity. *Tox Pathol* 32: 643-649.
- Ghio, A. J., Turi, J. L., Yang, F., Garrick, L. M. y Garrick, M. D. (2006). Iron homeostasis in the lung. *Biol Res* 39: 67-77.
- Keel, S B., Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblauch, S., Kingsley, P. D., De Domenico, I., Vaughn, M. B., Kaplan, J., Palis, J. y Abkowitz, J. L. (2008). A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science* 319: 825-859.
- Kondo, K., Noguchi, M., Mukai, K., Matsuno, Y., Sato, Y., Shimosato, Y. y Monden, Y. (1990). *Transferrin Receptor Expression in Adenocarcinoma of the Lung as a Histopathologic Indicator of Prognosis*. *Chest* 97:1367-1371.
- Monfeli, R. R. y Beeson, C. (2007). *Targeting iron acquisition by Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Disord Drug Targets* 7: 213-220.
- Turi, J. L., Yang, F., Garrick, M. D., Piantadosi, C. A. y Ghio, A. J. (2004). The iron cycle and oxidative stress in the lung. *Free Radic Biol Med* 7 (36): 850-857.
- Weinberg, E. D. (2008). Iron out-of-balance: a risk factor for acute and chronic diseases. *Hemoglobin* 32: 117-122.
- Yang, F., Harle, D. J., Wang, X., Dailey, L. A., Stonehuerner, J. G. y Ghio, A. J. (2005). Apical location of ferroprotein 1 in airway epithelia and its role in iron detoxification in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1 (289): L14-23.