

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

ARXIU DE LA SECCIÓ DE CIÈNCIES, LXXXIX

JOSEP M. TURA I SOTERAS

Dr. en Física. Membre de la Societat Catalana de Física

JOAN RODÉS I TEIXIDOR

Dr. en Medicina. Membre Agregat de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans
i Membre de la Societat Catalana de Biologia

ADOLF TRAVERIA I CROS

Dr. en Geologia. Membre de la Societat Catalana de Física
i de la Institució Catalana d'Història Natural

**ESTUDI PER TÈCNiques FÍSiques D'ANÀlisi
(SEM, EDX, SIMS, LAMMA, XRD I XRF) DE
MICROCRISTALLS EXÒGENS I ENDÒGENS I DE
TRACES METÀL·LIQUES EN PATOLOGIA HUMANA**

BARCELONA

1989

ESTUDI PER TÈCNIQUES FÍSIIQUES D'ANÀLISI
(SEM, EDX, SIMS, LAMMA, XRD I XRF) DE
MICROCRISTALLS EXÒGENS I ENDÒGENS I DE
TRACES METÀL·LIQUES EN PATOLOGIA HUMANA

INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

ARXIUS DE LA SECCIÓ DE CIÈNCIES, LXXXIX

JOSEP M. TURA I SOTERAS

Dr. en Física. Membre de la Societat Catalana de Física

JOAN RODÉS I TEIXIDOR

Dr. en Medicina. Membre Agregat de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans
i Membre de la Societat Catalana de Biologia

ADOLF TRAVERIA I CROS

Dr. en Geologia. Membre de la Societat Catalana de Física
i de la Institució Catalana d'Història Natural

**ESTUDI PER TÈCNIQUES FÍSQUES D'ANÀLISI
(SEM, EDX, SIMS, LAMMA, XRD I XRF) DE
MICROCRISTALLS EXÒGENS I ENDÒGENS I DE
TRACES METÀL·LIQUES EN PATOLOGIA HUMANA**

BARCELONA

1989

© Institut d'Estudis Catalans

ISBN: 84-727283-034-9

Dipòsit Legal: B. 33040-1987

Disseny: Maria Casassas i Figueras

Fotografia de la sobrecoberta: Imatge iònica (+) d'una trabècula òssia procedent d'un pacient amb insuficiència renal crònica sotmès a tractament mitjançant hemodiàlisi, la qual mostra la presència de $^{27}\text{Al}^+$ (verd), $^{23}\text{Na}^+$ (blau), $^{56}\text{Fe}^+$ (blanc) i $^{40}\text{Ca}^+$ (vermell).

Hom pot apreciar clarament que la major part del sodi, de l'alumini i del ferro es troben concentrats a la línia de calcificació.

Impressió: Altés, s.l., Caballero 87, 08029 Barcelona

La Secció de Ciències acordà l'any 1983 d'iniciar el programa de recerca número 2.213 intitulat «Estudi Físic de càlculs antropogènics», del qual foren designats ponents els senyors Josep Alsina i Bofill, membre de la Secció de Ciències, i Josep M. Tura i Soteras, membre de la Societat Catalana de Ciències Físiques, Químiques i Matemàtiques. En sessió ordinària de la Secció de Ciències del mes de gener de 1986 fou acordat que aquest treball fos coordinat per un secretariat de redacció format pels senyors Josep M. Tura i Soteras i Adolf Traveria i Cros, ambdós membres de la Societat Catalana de Ciències Físiques, Químiques i Matemàtiques, i el senyor Joan Rodés i Teixidor, agregat a la Secció de Ciències i membre de la Societat Catalana de Biologia.

En sessió plenària del dia 9 de desembre de 1986, l'Institut d'Estudis Catalans acordà la publicació d'aquest volum, el qual ha estat editat a cura del senyor Josep Alsina i Bofill, membre de la Secció de Ciències.

This One



HA1J-PTC-YYPH

TAULA - CONTENTS

| | |
|--|----|
| Llista d'autors / <i>List of Authors</i> | 5 |
| Presentació / <i>Preface</i> , per Josep Alsina i Bofill | 7 |
| | |
| MONSÓ, E., TURA, J.M., BORBON, J., FIGUERAS, A., MARSAL, M. i BERNADÓ, LI. Estudi, per microscòpia electrònica de rastreig i microanàlisi EDX, de tres casos de pneumoconiosi. <i>Three cases of pneumoconiosis identified by Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDXA)</i> | 9 |
| | |
| MONSÓ, E., TURA, J.M., BORBON, J., OLIVELLA, I., MARSAL, M. i VILASECA, J. Un cas d'argíria laboral. Estudi per Microscòpia Electrònica de Rastreig i per Microanàlisi de Raigs X. <i>A case of argyria identified by Scanning Electron Microscopy (SEM) and X-Ray Microanalysis</i> | 27 |
| | |
| TURA, J.M., RODÉS, J., TRAVERIA, A., BORBON, J., MARSAL, M. i OLIVELLA, I. Identificació de microstructures cristal·lines en un cas d'inges- tió voluntària de talc, per Microscòpia Electrònica de Rastreig, Difracció de Raigs X i Microanàlisi Dispersiva d'Energies de Raigs X. <i>Crystalline particles identified by SEM, EDXA and X-Ray Dif- fraction in a case of voluntary ingestion of talc</i> | 33 |
| | |
| ESTRUCH, R., TURA, J.M., URBANO-ISPIZUA, A., BRUGUERA, M., MARSAL, M. i URBANO-MÁRQUEZ, A. Identificació per Microscòpia Electrònica i Anàlisi Dispersiva d'Energies de Raigs X de partícules de silicona en el fetge d'un pacient en programa d'hemodiàlisi. <i>Identification of silicone particles in the liver of a hemodialysis pa- tient by Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-Ray Analysis</i> | 45 |

ROCA, J., TRAVERIA, A., TURA, J.M., VILA, J.,
BORBON, J. i MARSAL, M.

Identificació d'oxalat sòdic per Microscòpia Electrònica de Ras-
treig (SEM), Anàlisi Dispersiva d'Energia de Raigs X (EDXA)
i Difracció de Raigs X (XRD) en fibrosi pulmonar.

*Identification of sodium oxalate by Scanning Electron Microscopy,
Energy Dispersive X-Ray Analysis and X-Ray Diffraction in
pulmonary fibrosis*

55

ROS, E., TURA, J.M., TRAVERIA, A., DURFORT, M.,
RODÉS, J., RIBÓ, J.M., FERNÁNDEZ, I. i MARSAL, M.

Microestructura i microanàlisi de càlculs biliars per Microscòpia
Electrònica de Rastreig, Anàlisi Dispersiva d'Energies de Raigs
X i Difracció de Raigs X.

*Gallstones identified by Scanning Electron Microscopy, Energy
Dispersive X-Ray Analysis and X-Ray Diffraction*

65

TURA, J.M., SERRANO, S., LLORACH, I. i MARSAL, M.

Partícules de silicona en el fetge. Estudi microanalític d'un pa-
cient hemodialitzat.

*Silicone particles in the liver. Microanalytical study of a haemo-
dialysed patient*

89

FANDOS, A., TURA, J.M., TRAVERIA, A., PRATS, M.,
MANICH, A.M. i MARSAL, M.

Microcalcificacions en carcinomes i tumors benignes de mames
humanes: I part, Estudi microanalític i microestructural.

*Microcalcifications in carcinomas and benign tumors in human
breast. Part I. A Microanalytical and Microstructural study . . .*

101

CAMPO, E., TURA, J.M., TRAVERIA, A.,
CORACHAN, M. i MARSAL, M.

Silicats en els ganglis limfàtics d'un noi europeu amb simpto-
mologia d'elefantiasi a les cames.

*Silicates in femoral lymph nodes of an european boy with symp-
toms of pre-elephantiasis in the lower legs*

145

TRAVERIA, A., TURA, J.M., FANDOS, A.,
DE CASTELLAR, M.D. i VOGT, H.

Microcalcificacions en carcinomes i tumors benignes de mames
humanes: II part, Estudi mitjançant XRD i LAMMA.

*Microcalcifications in human breast carcinomas and benign tu-
mours. Part II. An analytical study by XRD and LAMMA.* 159

TURA, J.M., SERRANO, S., AUBIA, J., MARIÑOSO, LI.,
TRAVERIA, A. i MARSAL, M.

Detecció d'alumini i de ferro al llarg de la línia de calcificació
en pacients amb insuficiència renal crònica durant programes
d'hemodiàlisi.

*Detection of aluminium and iron along the line of bone calcifica-
tion in patients with chronic renal insufficiency during haemodia-
lysis programes* 167

LLISTA D'AUTORS - LIST OF AUTHORS

| | |
|----------------------------------|---|
| ALSINA, Josep | 7 |
| AUBIA, Jaume | 167 |
| BERNADÓ, Lluís | 9 |
| BORBON, Jaume | 9, 27, 33, 55 |
| BRUGUERA, Miquel | 45 |
| CAMPO, Elias | 145 |
| CASTELLAR, Maria Dolors DE | 159 |
| CORACHAN, Manuel | 145 |
| DURFORT, Mercè | 65 |
| ESTRUCH, Ramon | 45 |
| FANDOS, Adelaida | 101, 159 |
| FERNÁNDEZ, Irene | 65 |
| FIGUERAS, Albert | 9 |
| LLORACH, Immaculada | 89 |
| MANICH, Albert Maria | 101 |
| MARIÑOSO, Lluïsa | 167 |
| MARSAL, Montserrat .. | 9, 27, 33, 45, 55, 65, 89, 101, 145, 167 |
| MONSÓ, Eduard | 9, 27 |
| OLIVELLA, Ignasi | 27, 33 |
| PRATS, Miquel | 101 |
| RIBÓ, Josep Maria | 65 |
| ROCA, Joan | 55 |
| RODÉS, Joan | 33, 65 |
| ROS, Emili | 65 |
| SERRANO, Sergi | 89, 167 |
| TRAVERIA, Adolf | 33, 55, 65, 101, 145, 159, 167 |
| TURA, Josep Maria | 9, 27, 33, 45, 55, 65 89, 101, 145, 159, 167 |
| URBANO-ISPIZUA, Álvaro | 45 |
| URBANO-MÁRQUEZ, Álvaro | 45 |
| VILA, Josep | 55 |
| VILASECA, Jaume | 27 |
| VOGT, Henning | 159 |

PRESENTACIÓ

La Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans ha tingut un especial interès durant els darrers anys a promoure programes de recerca interdisciplinària. Aquest llibre és el primer resultat d'un d'aquests programes, que ha posat en contacte la Física i la Medicina per intentar donar un pas endavant en el camp de la identificació d'alguns tipus de microbiomineralitzacions patògenes que s'originen en el cos humà. Amb aquesta finalitat, la Secció de Ciències inicià el programa número 2213 intitulat «Estudi Físic de Càlculs Antropogènics», del qual foren nomenats ponents el que subscriu i el Dr. Josep M. Tura.

Consideràrem d'interès iniciar un programa plurianual d'aquest tipus quan constatarem que els Laboratoris de Microscòpia Òptica amb què compten els nostres Hospitals, generalment ubicats en els Departaments d'Anatomia Patològica, no podien, ells sols, resoldre sempre els problemes d'identificació dels microcristalls que apareixien en l'estudi sistemàtic d'autòpsies i biòpsies patològiques.

En consultar la bibliografia sobre el tema, comprovàrem que alguns dels grups més dinàmics en aquest camp, als Estats Units, a Alemanya i a Bèlgica, havien creat equips interdisciplinaris, constituïts bàsicament per físics de l'estat sòlid, cristal·lografs i metges, que aportaven llur experiència professional a intentar de resoldre aquests tipus de problemes. Com podrà comprovar el lector, l'Institut d'Estudis Catalans ha seguit pel mateix camí i ha coordinat, dins l'esmentat programa, les tasques de diversos Departaments de grans Hospitals de Catalunya, dirigits per membres de la Societat Catalana de Biologia, amb Laboratoris de Física de superfície i de Raigs X, dirigits aquests per membres de la Societat Catalana de Física.

Hom identificà, amb les tècniques que els autors detallen a peu de pàgina, càlculs pulmonars, biliars i mamaris, així com el tipus de calcificació que envoltava alguns d'aquests biomaterials com a defensa del mateix cos enfront de llur creixement patògen.

Durant la realització d'aquest programa de recerca, hom cregué convenient d'ampliar-lo a la identificació de diversos minerals cristallins de procedència exògena (per inhalació, injecció, ingestió o penetració dèrmica). Una altra ampliació del programa ha estat la detecció de traces de metalls en biòpsies, així com la localització topogràfica dins la mostra.

Els resultats d'aquests treballs han estat presentats a diversos Congressos Estatals, Nacionals i Internacionals.

En nom de l'Institut faig constar ací el nostre agràiment a tots els estudiosos que han participat directament en aquestes recerques i la nostra felicitació pels resultats obtinguts.

Per acabar, em plau d'anunciar que, tenint en compte els bons resultats aconseguits, l'Institut ha pres l'acord de continuar dotant el mateix programa en els pressupostos de la Secció de Ciències. D'altra banda, davant el fet que els científics alemanys de l'Institut für Medizinische Physik de la Universitat de Münster i del Kernforschungsanlage de Jülich s'han interessat a col·laborar amb nosaltres, l'Institut ha iniciat dins la Secció de Ciències el programa 6023-60 per tal de poder atendre degudament la participació catalana en aquest programa internacional.

JOSEP ALSINA I BOFILL

Membre Numerari de la Secció de Ciències
de l'Institut d'Estudis Catalans

ADDENDA

En el present treball, ultra la microscòpia òptica de polarització, de contrast de fases i de fluorescència, les tècniques físiques d'anàlisi utilitzades han estat bàsicament les següents: microscòpia electrònica de rastreig (SEM), anàlisi dispersiva d'energies de raigs X (EDXA), microscòpia electrònica de transmissió (TEM), espectrometria de masses d'ions secundaris excitats per canons d'ions (SIMS), espectrometria de masses d'ions secundaris excitats per làsers (LAMMA), fluorescència de raigs X (XRF) i difracció de raigs X (XRD).

Expressem el nostre agràiment a tot el personal ajudant de Laboratori que ha col·laborat amb nosaltres en la tasca, sempre difícil, de posar a punt tècniques experimentals i en la preparació de mostres.

També voldríem agrair a la Sra. Carme Xaus la cura que ha tingut en el procés d'elaboració del llibre; al Sr. George von Knorring la col·laboració en la versió anglesa resumida dels treballs; i, finalment, a les Sres. Remei Leiva i Carme Sansó, llur acurat mecanografiat de l'original català.

ESTUDI, PER MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG I MICROANÀLISI EDX, DE TRES CASOS DE PNEUMOCONIOSI

per

EDUARD MONSÓ *, JOSEP M. TURA **, JAUME BORBÓN **,
ALBERT FIGUERAS **, MONTSERRAT MARSAL ***, LLUIS BERNADÓ ****

* Secció de Pneumologia. Departament de Medicina Interna. Hospital General «Vall d'Hebron». Barcelona. ** Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi. I.T.Q.T. Consell Superior d'Investigacions Científiques. Barcelona. *** Departament de Metallúrgia i Siderúrgia de l'E.T.S.E.I. de la Universitat Politècnica de Catalunya. **** Servei d'Anatomia Patològica. Hospital General «Vall d'Hebron». Barcelona.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans.

This work is part of programme number 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

THREE CASES OF PNEUMOCONIOSIS IDENTIFIED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS (EDXA)

SUMMARY

Three cases are presented in which a protocol of interstitial diffused standard diagnostic was applied. A lung biopsy was performed since this non aggressive method failed to obtain a diagnosis. The histology produced crystalline particles which were birefringent under polarized light. Silicosis was diagnosed. The lung biopsies were then studied with the aid of physical microanalytical methods in order to establish the chemical composition of the inorganic particles observed. The study was carried out with tissue conservative methods: Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive X-ray Analysis (EDXA). The applied techniques are described in detail, with special emphasis on the sample preparation processes which are very important so as to avoid erroneous interpretations. The results obtained are discussed. Silicates were mainly present in the inorganic particles observed.

RESUM

Hom presenta tres casos en els quals hom procedí a aplicar el protocol de diagnòstic de patró intersticial difús, sense aconseguir diagnòstic per mètodes no agressius, la qual cosa obligà a practicar biòpsia pulmonar a cel obert. A la histologia hom observà la presència de partícules cristallines, les quals mostraren birefringència a la llum polaritzada, i fou establert el diagnòstic de silicosis. Posteriorment, foren sotmeses les biòpsies pulmonars a un estudi físic microanalític per tal de determinar la composició química de les partícules inorgàniques observades.

Hom duqué a terme l'estudi mitjançant mètodes conservadors de teixits amb aplicació de la microscòpia electrònica de rastreig i de l'anàlisi dispersiva d'energies de raigs X (Energy Dispersive X-rays analysis, EDXA).

Hom descriu amb detall les tècniques aplicades, fent especial esment del procés de preparació de les mostres, d'una gran importància per tal d'evitar interpretacions errònies.

Hom comenta els resultats obtinguts tot identificant morfològicament i analítica les partícules inorgàniques observades, entre les quals podem esmentar diversos silicats.

Paraules clau: Patologia; Teixit humà; Diagnòsis; Preparació biològica de les mostres; Electrons secundaris; Electrons retrodispersats; EDXA; Microscòpia electrònica de rastreig.

Key words: Pathology; Human tissues; Biological specimen preparation; Secondary electrons; Backscattered electrons; X-ray microanalysis; Scanning Electron Microscopy.

1. Introducció

El grup de malalties aplegat sota el nom de pneumoconiosi està ben definit des d'un punt de vista clínic i radiològic, motiu pel qual habitualment hom estableix el diagnòstic d'aquestes entitats exclusivament amb una història clínic compatible, existint antecedents d'inhalació de partícules inorgàniques, i una radiografia de tòrax amb alteracions específiques. Malgrat això, en alguns casos pot ésser requerida una biòpsia pulmonar per tal de diagnosticar una pneumoconiosi, fonamentalment en aquells malalts en què es planteja el diagnòstic diferencial amb altres entitats (malalties sistèmiques, iatrogènia pulmonar, limfangitis carcinomatosa, angiïtis i granulomatosi pulmonar, etc.). La mínima morbiditat i mortalitat de la biòpsia pulmonar ha permès que aquesta tècnica es difongués, i ha contribuït en els darrers anys d'una forma molt important al desenvolupament de la Pneumologia.

La valoració de la histologia pulmonar pot ésser feta actualment amb diverses tècniques, de les quals les fonamentals són la microscòpia òptica i la microscòpia de llum polaritzada. En casos seleccionats hom pot utilitzar la microscòpia electrònica de transmissió o bé la de rastreig, així com la immunofluorescència. La presència de partícules inorgàniques és detectada amb la microscòpia de llum polaritzada, quan hi ha birefringència. Malgrat ésser molt útil aquesta valoració, té les seves limitacions, ja que no permet d'identificar el tipus de partícula inorgànica, i a més algunes substàncies orgàniques poden presentar birefringència (coHagen, ceHulosa, midó, etc.). D'altra banda pot ésser que petites quantitats de partícules inorgàniques no siguin detectades. La microscòpia electrònica, amb algunes tècniques auxiliars, actualment millora en molt els estudis amb llum polaritzada, per bé que, pel fet d'ésser una tècnica laboriosa i costosa, cal que sigui utilitzada solament en casos ben seleccionats. La microscòpia electrònica de rastreig simple (d'electrons secundaris), o bé la d'electrons retrodispersats, posa en evidència moltes partícules que poden passar desapercebudes amb la microscòpia òptica i la de llum polaritzada.

Les tècniques d'identificació de substàncies inorgàniques inicialment aplicades al teixit biològic han estat destructives (incineració, digestió química o enzi-

màtica), i no han permès per tant la valoració de l'estructura tissular conjunta amb l'estudi químic. Darrerament han estat perfeccionades tècniques d'identificació no destructives (espectrometria de raigs X, espectrometria de fluorescència de raigs X, difractometria d'electrons), que poden ésser utilitzades conjuntament amb la microscòpia òptica o la microscòpia electrònica. Cal esperar que la difusió d'aquestes noves tècniques permetrà de fer una valoració més acurada de casos clínics que presentin problemes diagnòstics, així com millorar el coneixement de la patologia per inhalació.

2. *Material i mètodes*

Foren elegits 3 casos clínics que havien plantejat diferents problemes diagnòstics en un hospital general; en tots tres casos calgué dur a terme una biòpsia pulmonar. La mostra fou estudiada amb microscòpia òptica i de llum polaritzada; en tots tres casos fou evident la presència de partícules birefringents.

Les biòpsies foren incloses dins blocs de parafina. Hom dugué a terme, en aquestes preparacions, una sèrie de talls de set micres de gruix amb un micròtom de rotació Minot. Hom aconseguí una bona extensió dels talls introduint-los en un bany maria d'aigua gelatinosa a 40° C. Aquestes seccions foren dipositades damunt un portamostres de grafit per a microscòpia electrònica de rastreig. La gelatina actuà com a adhesiu de la mostra amb el substrat de grafit, la qual adhesió fou aconseguida d'una manera completa en deixar la preparació dins una estufa a 40° C durant unes dotze hores. La parafina fou eliminada submergint la preparació en un bany de xilè durant unes tres hores.

A continuació les preparacions foren sotmeses a un procés de deshidratació segons el gradient de concentracions següent: 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 % d'acetona en aigua destil·lada; aquesta darrera concentració fou repetida. A cada dissolució, la mostra romangué al voltant de cinquanta minuts. Un cop substituïts els líquids propis per acetona, hom procedí a la dessecació de la mostra mitjançant el procediment anomenat *punt crític*. Com a criolíquid hom emprà el CO₂ (Pcrit. = 73 atm, Tcrit. = 31° C).

Per tal de procedir a llur anàlisi per microscòpia electrònica, les mostres foren ombrejades amb grafit.

3. *Resultats*

3.1. *Cas número 1*

A una malalta de 38 anys d'edat li fou detectat, en una radiografia de tòrax feta casualment, un patró intersticial nodular amb predomini a les bases pulmonars. La pacient tenia antecedents laborals de treball amb ceràmiques durant 8 anys. Hom dugué a terme una biòpsia pulmonar per tal de determinar el diag-

nòstic, la qual biòpsia mostrà una fibrosi moderada, amb presència de partícules birefringents. Hom decidí de fer un estudi amb EDXA per tal de precisar la composició de les partícules trobades.

La mostra fou observada en un microscopi electrònic de rastreig (SEM) Philipps 500, sota l'impacte d'un feix primari d'electrons de 25 KeV d'energia. Una observació exhaustiva de la preparació mostrà la presència de tres tipus d'elements patògens ben diferenciats: a) asbest; b) altres partícules inorgàniques, i c) cossos calcificats.

La figura 1 mostra un conjunt de fibres de llargades i diàmetres diversos, tal com hom pot apreciar amb més detall a la figura 2. A la part esquerra de la figura 1, hom hi pot observar un conducte alveolar. La superfície de les fibres fou analitzada amb un equip EDAX acoblat al microscopi electrònic. La figura 3 mostra l'espectre dispersiu de les energies dels quanta de raig X emesos de la superfície de les fibres per l'acció dels electrons primaris. El pic més intens correspon al Si. Els altres elements són Mg, Al, P, S, Cl, K, Ca i Fe, respectivament. El temps d'anàlisi fou de 100 segons, i el diàmetre del spot d'electrons, de 0,125 micres.

La morfologia de les fibres, la relació entre el diàmetre i la llargada d'aquestes, juntament amb el fet que el pic més intens correspongui al Si, sembla indicar que aquest element patògen exogen és asbest, i precisament del grup amfibòlic amosita o antofilita.^{1, 2} Les figures 4 i 5 mostren una altra zona de la preparació. La part esquerra correspon a una mineralització patogènica que presenta una forta emissió d'electrons secundaris, la qual cosa la fa més brillant que la resta del teixit que l'envolta. A la part dreta apareixen dues fibres amb la mateixa morfologia que les observades anteriorment; una anàlisi EDX puntual d'aquestes donà una composició elemental molt semblant a la que apareix a la figura 3. Podem arribar a la conclusió, per tant, que les fibres són probablement asbests. La mineralització que envolta un extrem de les fibres fou analitzada en un punt molt proper a la zona d'emergència d'aquestes (figura 6). El pic més intens d'aquest espectre correspon al calci; els altres elements són pràcticament els mateixos que apareixen a les fibres d'asbest, la qual cosa fa pensar que en aquesta zona de contacte el feix primari d'electrons pot travessar el conglomerat envoltant d'una fibra i arribar a aquesta; els quanta de raigs X emesos per aquesta zona de contacte correspondran tant a les fibres com al conglomerat. La presència de microcalcificacions patògenes en biòpsies pulmonars ha estat observada per alguns autors.^{3, 4}

¹ McCrone, W., Brown, J. A., Stewart, I. M. «The particle atlas», Ann Arbor Science Publishers, Inc., Michigan, EUA (1980).

² Frye, K. «The encyclopedia of mineralogy», Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, Pennsylvania, EUA (1981).

³ Abraham, J. L. «Microanalysis of human granulomatous lesions» Proc. of the 8th international conference of Sarcoidosis, 38-47, Alpha Omega Press, Cardiff, Gran Bretanya (1980).

⁴ De Vuyst, P., *et al.*, «Oxalate bodies, another reaction of the human lung to asbestos inhalation?» Eur. J. Respir. Dis., 543-549, Munksgaard, Copenhaguen, Dinamarca (1982).

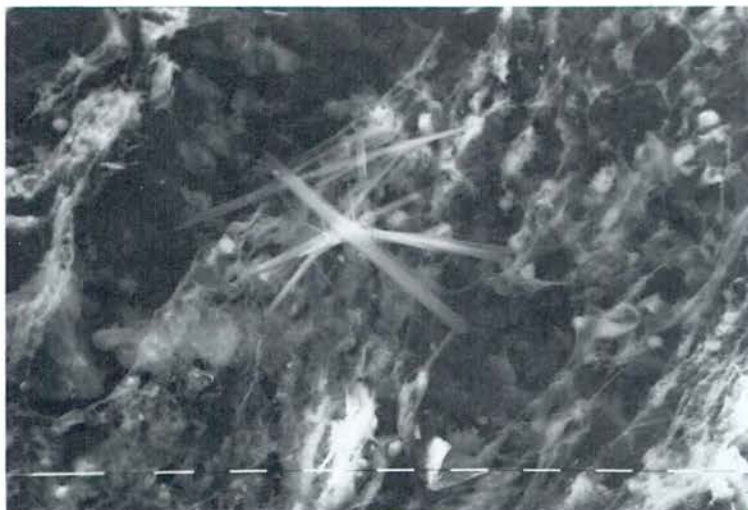


Fig. 1. - Conjunt de fibres d'asbest damunt teixit alveolar. Marques de 10 μm (x 825).

Fig. 1. - A set of asbestos fibres over alveolar tissue. Markers: 10 μm (x 825).



Fig. 2. - Detall de les fibres d'asbest de la figura 1. Hom pot apreciar-hi també nombroses microfibrils. Marques de 10 μm (x 1.611).

Fig 2. - Asbestos fibres in Figure 1 in detail. Numerous microfibrils can be observed. Markers: 10 μm (x 1.611).

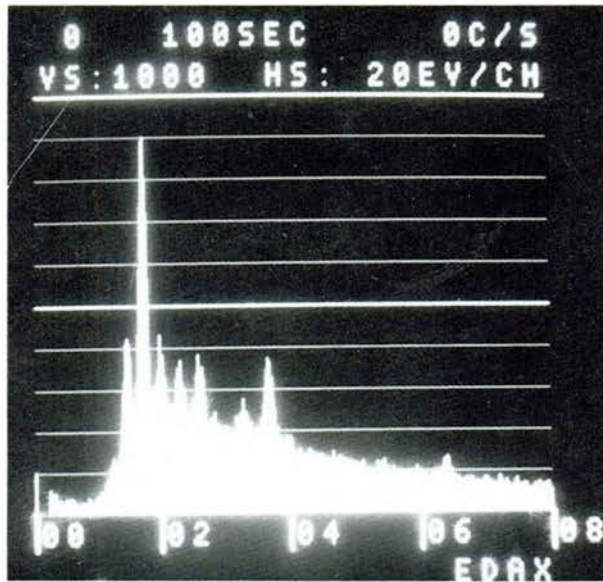


Fig. 3. - Anàlisi EDXA corresponent a l'asbest de les figures 1 i 2. Elements presents:
Fig. 3. - EDXA spectrum from the asbestos fibres in Figures 1 and 2. The elements are:

Mg ($K\alpha = 1,25$ keV),
 Al ($K\alpha = 1,49$ keV), Si ($K\alpha = 1,74$ keV),
 P ($K\alpha = 2,01$ keV), S ($K\alpha = 2,31$ keV),
 Cl ($K\alpha = 2,62$ keV), K ($K\alpha = 3,31$ keV),
 Ca ($K\alpha = 3,69$ keV), Ca ($K\beta = 4,01$ keV),
 Fe ($K\alpha = 6,40$ keV).



Fig. 4. - Conglomerat càlcic que envolta l'extrem d'una fibra d'asbest.
 Marques de 10 μm (x 409).

Fig. 4. - Calcic conglomerate surrounding an end of an asbestos fibre.
 Markers: 10 μm (x 409).

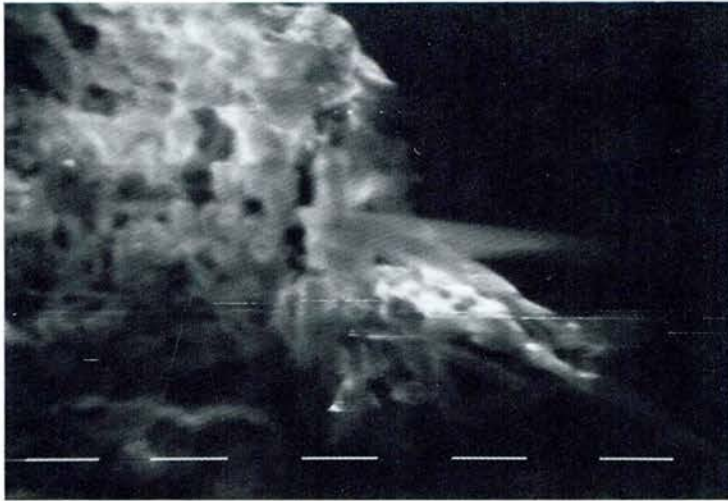


Fig. 5. - Detall de la figura anterior. A la dreta hom pot apreciar l'origen de la fibra envoltada per la calcificació. Marques de 10 μm (x 1.611).

Fig. 5. - The last figure in detail. On the right, the origin of the asbestos fibres surrounded by the calcification can be observed. Markers: 10 μm (x 1.611).

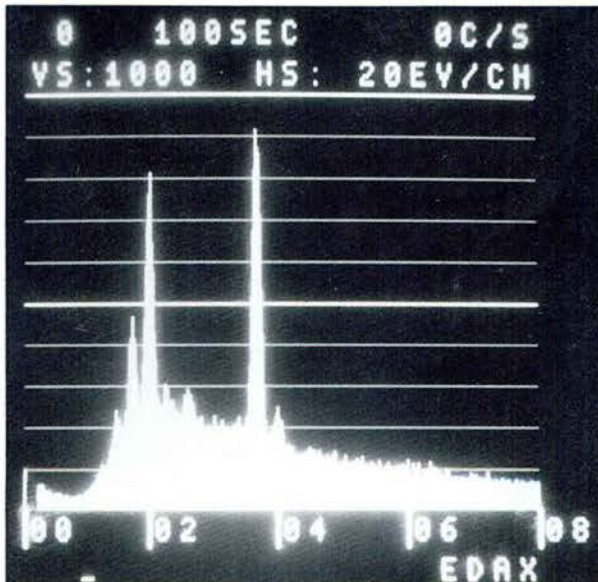


Fig. 6. - Anàlisi EDXA de la zona de contacte entre el conglomerat càlcic i la fibra d'asbest. Els elements presents són:

Fig. 6. - EDXA spectrum from the zone of contact between the calcic conglomerate and the asbestos fibre. The elements are:

Al ($K\alpha = 1,49$ keV),
 Si ($K\alpha = 1,74$ keV), P ($K\alpha = 2,01$ keV),
 S ($K\alpha = 2,31$ keV), Cl ($K\alpha = 2,62$ keV),
 Ca ($K\alpha = 3,69$ keV), Ca ($K\beta = 4,01$ keV).

Conglomerats càlcics d'aquests tipus i grandàries foren observats en altres zones del teixit: figures 7 i 8. La figura 7 correspon a una imatge generada per electrons retrodispersats, i la figura 8 correspon a electrons secundaris.

Les partícules presents dins una mostra amb un nombre atòmic més alt que el corresponent al teixit orgànic envolupant tenen un poder de retrodispersió dels electrons primaris incidents més gran i formen, per tant, una imatge més brillant.⁵

Això permet de diferenciar, per contrast, les partícules exògenes del teixit pulmonar. La figura 9 mostra una visió del teixit alveolar a pocs augments (x 409); hi és apreciable la gran densitat de partícules estranyes (2.423/mm²). Els elements patògens cobreixen una gran part del teixit pulmonar que envolta els conductes alveolars. A la figura 10 apareixen detalls més ampliat del quadrant superior esquerre de la figura 9; aquesta figura ha estat feta amb electrons secundaris.

Per establir un mètode d'ajut a la diagnosi, seguirem el procediment indicat per J. L. ABRAHAM,⁶ que consisteix a dur a terme el recompte de partícules i la microanàlisi EDX d'aquestes, en diversos camps de la biòpsia. La taula 1 indica els resultats obtinguts per aquest procediment en la superfície que correspon a la figura 10; també hi és indicat el radi equivalent de les partícules, paràmetre que és igual al doble de l'àrea de la partícula dividit pel diàmetre d'aquesta. Els resultats posen de manifest la presència de silicats i l'absència de quars, tal com calia esperar dels antecedents laborals de la pacient. Els valors numèrics de les intensitats dels raigs X detectades són molt semblants als publicats per J. L. ABRAHAM en el treball suara esmentat.

3.2. Cas número 2

Una malalta de seixanta-set anys, no fumadora, ingressà en un servei hospitalari per tal de poder-li fer l'estudi d'un quadre clínic de broncopneumopatia crònica obstructiva de sis anys d'evolució. Hom li detectà un patró intersticial pulmonar a la radiografia del tòrax. La malalta no tenia antecedents laborals valorables; li fou practicada una biòpsia pulmonar que mostrà una fibrosi moderada amb existència de pigment antracòtic i partícules birefringents. Hom dugué a terme l'estudi i la microanàlisi d'aquestes partícules per microscòpia electrònica de rastreig equipada amb un analitzador EDAX.

D'antuvi hom observà la presència de formes allargades en una part de la preparació. A la figura 11 presentem la imatge d'aquesta zona obtinguda per electrons secundaris. L'anàlisi EDAX posà de manifest la presència de Ca, S i P

⁵ ABRAHAM, J. L., DENEE, P. B. «Scanning-electron-microscope histochemistry using backscattered electrons and metal stains». *The Lancet*, 19, 1125 (1973).

⁶ ABRAHAM, J. L. «Biomedical microanalysis - Putting it to work now in diagnostic pathology», *Scanning Electron microscopy/1980/IV*, 171-178 SEM Inc., AMF O'Hare (Chicago), IL 60666, USA.



Fig. 7. - Conglomerats càlcics presents al teixit alveolar. Imatge per electrons retrodispersats. Marques de 10 μm (x 825).

Fig. 7. - Calcic conglomerates present in the alveolar tissue. Back-scattered electron image. Markers: 10 μm (x 825).



Fig. 8. - Conglomerats càlcics presents a la biòpsia. Imatge per electrons secundaris. Marques de 10 μm (x 825).

Fig. 8. - Calcic conglomerates present in the biopsy. Secondary electron image. Markers: 10 μm (x 825).

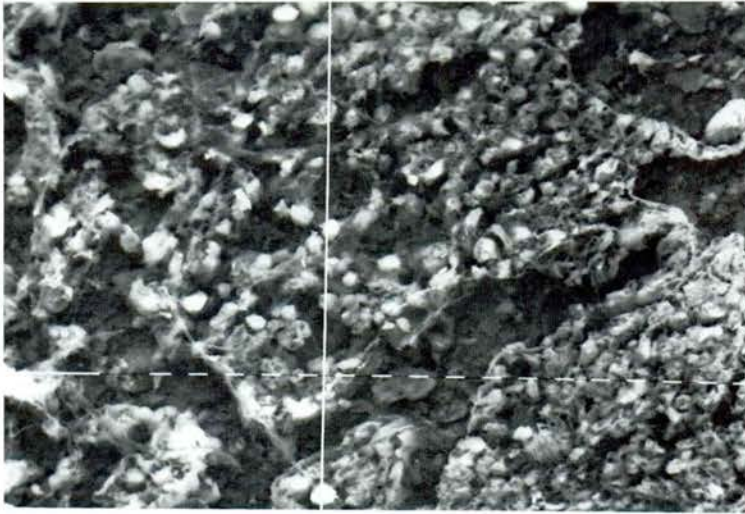


Fig. 9. - Vista general del teixit alveolar a pocs augments. Marques de 10 μm (x 409). Una part del quadrant superior esquerre és l'analitzada a les figures que segueixen.

Fig. 9. - Overall view of the alveolar tissue magnified to a small degree.
Markers: 10 μm (x 409). A part of the superior left quadrant is analyzed in the following figures.



Fig. 10. - Zona de partícules analitzades individualment (Taula 1): Imatge per electrons secundaris. Marques de 10 μm (x 1.597).

Fig. 10. - Particles individually analyzed (Table 1). Secondary electron image.
Markers: 10 μm (x 1.597).

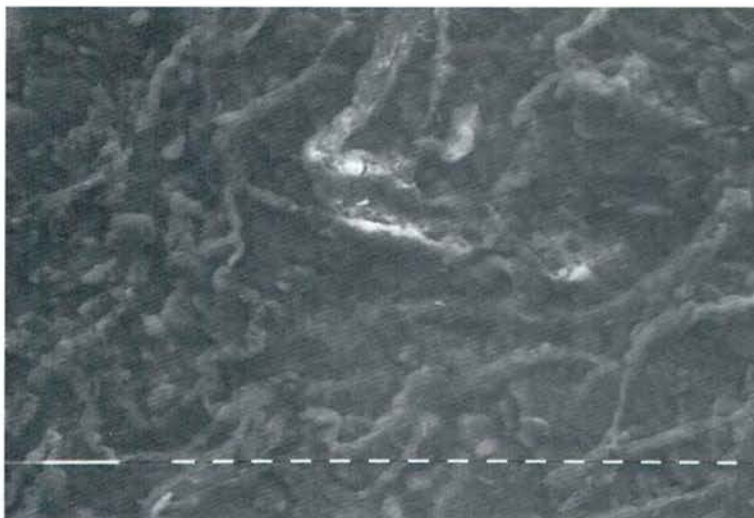


Fig. 11. - Teixit alveolar amb fibrosi. Imatge per electrons secundaris.
Marques de 10 μm (x 403).

Fig. 11. - Alveolar tissue with fibrosis. Secondary electron image.
Markers: 10 μm (x 403).



Fig. 12. - Zona de la mostra que presenta nòduls. Imatge d'electrons retrodispersats.
Marques de 10 μm (x 1.853).

Fig. 12. - Zone of the sample presenting particles. Back-scattered electron image.
Markers: 10 μm (x 1.853).

amb traces de Si. Aquest resultat sembla indicar una fibrosi intersticial difusa que presenta calcificació com a mineralització patològica.

D'altra banda, a tota la preparació, no hi fou detectada la presència d'asbests i sí, en canvi, de partícules que sota una observació òptica mostraren birefringència; a la figura 12 presentem la imatge d'aquestes obtinguda per electrons retrodispersats. En aquesta zona hom determinà l'existència d'unes dues mil set-cents setanta-sis partícules per mil·límetre quadrat i hom analitzà la composició elemental de nou partícules. El resultat d'aquesta anàlisi és presentat a la taula 2. Els valors d'aquesta taula foren obtinguts fent la mitjana del compte dels raigs X característics de cadascun dels elements presents a la partícula, durant quatre segons. A diferència del primer cas, la grandària de les partícules estranyes és més petita i pràcticament totes les anàlisis donaren com a pic més important el calci, mentre que en aquell cas era el silici.

3.3. Cas número 3

Un malalt de 42 anys, fumador i portador de bronquitis crònica, amb antecedents laborals de treball amb vidre durant un any i en mines de carbó durant quatre, fou ingressat per a estudiar-li un nòdul pulmonar dret i un d'infiltrat a la cavitat posterior del pulmó esquerre. En els estudis inicials hom no aconseguí el diagnòstic i li féu una biòpsia pulmonar dreta. La histologia de la peça extreta evidencià teixit inflamatori, en presència de partícules birefringents. El tipus d'inflamació apreciat suggerí la possibilitat de tuberculosi pulmonar, i fou iniciat un tractament específic en aquest sentit. Més tard, el diagnòstic fou confirmat, ja que alguns mesos després cresqué bacil de Koch en els cultius d'esput realitzats. Hom decidí de dur a terme un estudi per microscòpia electrònica de rastreig (SEM) i microanàlisi EDX per tal de determinar la composició de les partícules birefringents.

Hom hi observà dos tipus d'elements estranys que, per llur morfologia, poden ésser classificats com a cossos fibrosos i nòduls, respectivament. Els primers són estudiats a les figures 13 i 14, i els segons a les figures 15 i 16.

A la figura 13 hom mostra un cos fibrós estrany amb dues microfibrilles adherides. Aquest cos pot ésser vist en tota la seva longitud a la figura 14. La relació entre la seva llargada (uns 0,9 mm) i la seva amplada (unes 25 micres), així com l'anàlisi EDX del punt de suport de les microfibrilles al cos estrany, fa pensar que possiblement aquest cos fibrós és un asbest. Aquesta anàlisi EDX determinà la presència dels elements següents: Al, P, Si, S, Cl, K, Ca i Fe; el silici fou l'element que donà la resposta més intensa.

L'altre tipus d'element estrany ve conformat per agrupaments de petits nòduls d'unes cinc micres de diàmetre. A la figura 15 presentem una imatge d'agrupacions d'aquests nòduls obtinguda per electrons secundaris, l'anàlisi elemental dels quals és presentada a les quatre files de la taula 3. Per tal de visualitzar aquestes mesures hom hi indica, com en els casos anteriors, els comptes per segon que generen cadascun dels elements detectats a les condicions experimen-

TAULA 1 - RECOMPTE DELS RAIGS X CARACTERÍSTICS DE PARTÍCULES PRESENTS A LA FIGURA 10

| Partícula | Radi equivalent de la partícula μm | Al | Si | K | Ca | Fe | Mg | Ti |
|-----------|---|-----|-----|----|----|----|----|----|
| 1 | 4,2 | 32 | 224 | 40 | 57 | 17 | — | 10 |
| 2 | 5,1 | 80 | 200 | 40 | 55 | 18 | — | — |
| 3 | 4,0 | 60 | 106 | 41 | 47 | 10 | 14 | — |
| 4 | 4,9 | 56 | 106 | 19 | 45 | 34 | 8 | — |
| 5 | 3,6 | 73 | 145 | 30 | 41 | 15 | 12 | 15 |
| 6 | 3,6 | 102 | 206 | 43 | 57 | 25 | 9 | 15 |
| 7 | 4,2 | 50 | 120 | 29 | 52 | 24 | 5 | 8 |
| 8 | 3,6 | 36 | 106 | 31 | 50 | 17 | 8 | 10 |
| 9 | 4,7 | 70 | 152 | 28 | 31 | 19 | 7 | 15 |
| 10 | 3,2 | 72 | 140 | 29 | 51 | 14 | 13 | 9 |

El recompte EDX fou fet amb la finestra seleccionada per a la K_{α} de cada element amb la mitjana d'un cert nombre de valors obtinguts durant diversos intervals de quatre segons. Condicions de treball: 25 kV, grandària del spot 0,125 μm

TAULA 2 - RECOMPTE DELS RAIGS X CARACTERÍSTICS DE PARTÍCULES PRESENTS A LA FIGURA 12

| Partícula | Radi equivalent de la partícula μm | Al | Si | K | Ca | Fe | Mg | Ti |
|-----------|---|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | 1,8 | 12 | 16 | 18 | 35 | 7 | 4 | 8 |
| 2 | 2,7 | 11 | 21 | 19 | 31 | 9 | 5 | 9 |
| 3 | 2,3 | 37 | 70 | 30 | 38 | 48 | 11 | 12 |
| 4 | 1,3 | 17 | 23 | 16 | 60 | 7 | 9 | 7 |
| 5 | 1,8 | 15 | 20 | 25 | 56 | 8 | 9 | 9 |
| 6 | 2,3 | 11 | 19 | 20 | 42 | 8 | 4 | 12 |
| 7 | 1,8 | 15 | 16 | 16 | 53 | 4 | 8 | 12 |
| 8 | 1,4 | 12 | 18 | 20 | 40 | 11 | 5 | 10 |
| 9 | 2,3 | 11 | 18 | 22 | 20 | 11 | 7 | 15 |

Resultats obtinguts amb les mateixes condicions indicades a la Taula 1

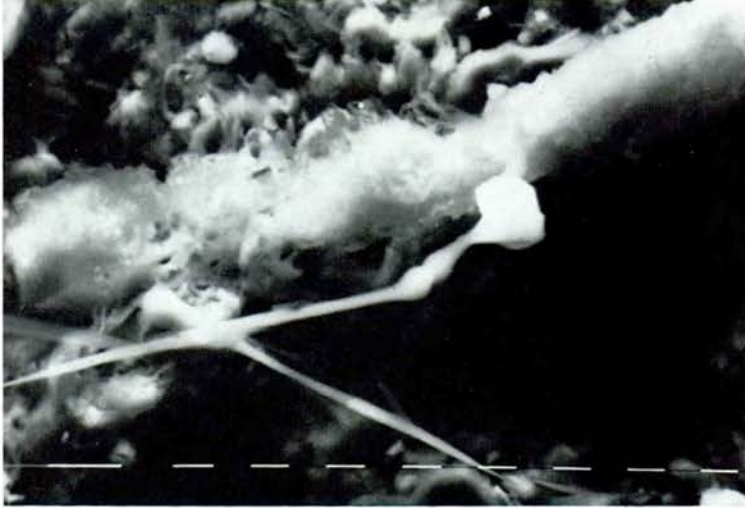


Fig. 13. - Cos fibrós estrany, possiblement asbest, amb dues microfibras adherides. Marques de 10 μm (x 814). L'anàlisi EDX del punt de suport de les microfibras posà de manifest la presència dels elements següents: Al, Si, P, S, Cl, K, Ca i Fe. El pic més intens correspongué al Si.

Fig. 13. - Rare fibrous inclusion, probably asbestos, with two microfibres. Markers: 10 μm (x 814). EDXA spectrum of support point of the microfibres shows the following elements: Al, Si, P, S, Cl, K, Ca and Fe. The most intense peak was Si.

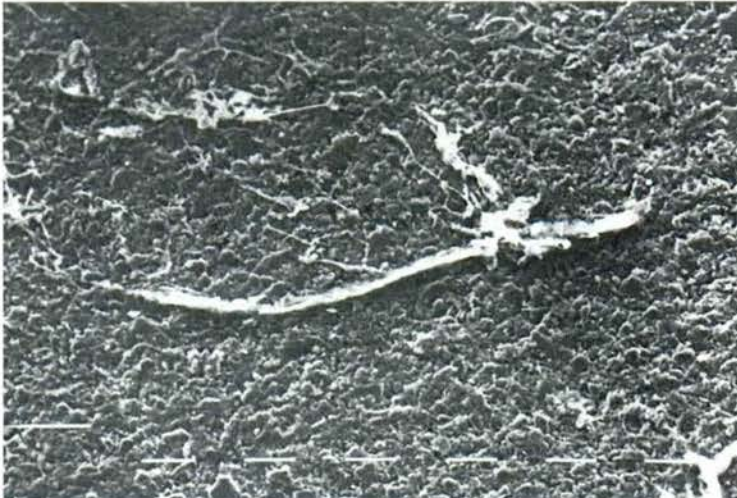


Fig. 14. - Vista general del cos fibrós estrany. Llargada aproximada 0.9 mm. Amplada 25 μm . Marques de 100 μm .

Fig. 14. - General view of the rare fibrous inclusion 0.9 mm long and 25 μm wide. Markers: 100 μm .



Fig. 15. - Zona de nòduls analitzats d'una manera individual (Taula 3). Imatge obtinguda mitjançant electrons secundaris. Marques de 10 μm (x 1.597).

Fig. 15. - Zone of particles individually analyzed (Table 3). Secondary electron image. Markers: 10 μm (x 1.597).

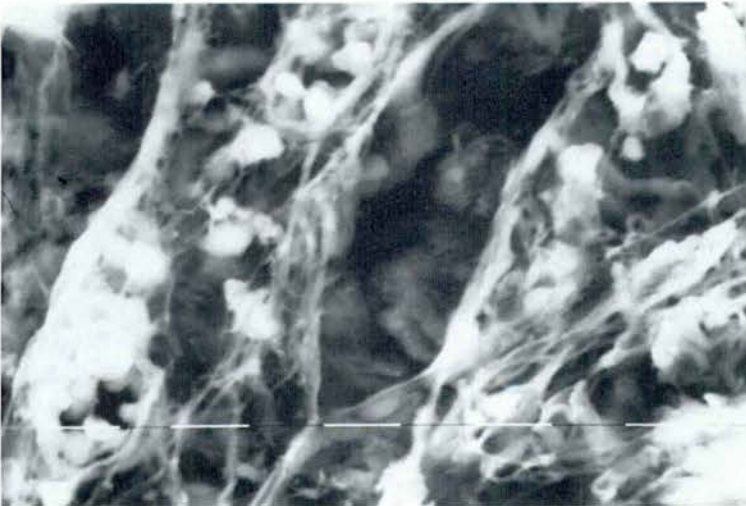


Fig. 16. - Una altra zona de nòduls. Imatge obtinguda mitjançant electrons retrodispersats. Marques de 10 μm (x 1.597).

Fig. 16. - Another zone of particles. Back-scattered electron image. Markers: 10 μm (x 1.597).

tals apuntades a peu de taula. Aquesta anàlisi posa de manifest la presència de Mg, Al, Si, K, Ca, Fe i Ti. Com en el primer cas, el Si fou l'element que donà la resposta més intensa.

De la mateixa manera hom estudià també altres agrupaments de nòduls presents a diferents indrets de la biòpsia (al voltant de 650 per mm²), com per exemple els presentats a la figura 16. Tant l'anàlisi EDX com la morfologia i grandària d'aquestes agrupacions han estat del tot semblants als resultats esmentats. Això sembla indicar que aquests agrupaments són formats per barreges de silicats.

TAULA 3 - RECOMPTE DELS RAIGS X CARACTERÍSTICS DE PARTÍCULES PRESENTS A LA FIGURA 15

| Agrupació de nòduls | Radi equivalent dels nòduls μm | Al | Si | K | Ca | Fe | Mg | Ti |
|---------------------|---|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
| 1 | 2,0 | 116 | 308 | 128 | 84 | 46 | 14 | 32 |
| 2 | 1,8 | 53 | 128 | 50 | 86 | 29 | 21 | 34 |
| 3 | 2,0 | 129 | 305 | 83 | 81 | 85 | 24 | 28 |
| 4 | 1,4 | 80 | 232 | 73 | 117 | 45 | 20 | 26 |

Resultats obtinguts amb les mateixes condicions indicades a la Taula 1

4. *Conclusions*

Hom aplicà la microscòpia electrònica de rastreig amb anàlisi dispersiva d'energies de quanta de raigs X a aquests tres casos, amb l'objectiu de valorar la sensibilitat de la tècnica i millorar els diagnòstics anatomopatològics inicials. En el dos primers cal considerar que la tècnica aportà noves dades sobre allò que hom havia establert inicialment, car en el primer cas mostrà, a més de les partícules de silicats, fibres d'asbest; i en el segon demostrà que les partícules eren silicats, en una malalta sense antecedents inhalatoris patològics.

La importància d'aquestes tècniques pot ésser gran en el diagnòstic d'alguns casos problemàtics des d'un punt de vista clínic, i també cal considerar-les importants auxiliars en estudis epidemiològics.

Agraïments

Els autors volen expressar el seu agraïment a la Dra. Mercè Durfort, al Sr. Ignasi Olivella, al Dr. Felicià Plana i al Sr. Alfons de la Maza per llur amable col·laboració i per llurs profitosos comentaris. També agraeixen a la Sra. Remei Leiva la seva col·laboració en el mecanografiat del text.

ADDENDA

Aspectes parcials d'aquest treball foren presentats al Primer Congrés Català de Medicina del Treball, celebrat a Barcelona el mes d'abril de 1984, i a la Jornada Hispano Lusa dins el XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Patología Respiratoria, celebrat a La Corunya el mes de juny de 1985.

UN CAS D'ARGÍRIA LABORAL. ESTUDI PER MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG I PER MICROANÀLISI DE RAIGS X

per

EDUARD MONSÓ *, JOSEP M. TURA **, JAUME BORBON **,
IGNASI OLIVELLA ***, MONTSERRAT MARSAL ****, JAUME VILASECA *

* Hospital General de la Vall d'Hebron. Barcelona. ** Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi I.T.Q.T. Consell Superior d'Investigacions Científiques. Barcelona. *** Direcció General de Pesca Marítima. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. **** Departament de Metal·lúrgia i Siderúrgia de l'E.T.S.E.I. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans.

This work forms part of programme number 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

A CASE OF ARGYRIA IDENTIFIED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM) AND X-RAY MICROANALYSIS

SUMMARY

A microscopical study was performed on a biopsy of a patient whose face showed a gray tonality. After an appropriate dehydration the biopsy was studied by scanning electron microscopy (SEM) and X-ray microanalysis (EDXA). Silver ions were detected near the epidermis; some other metallic ions, like chromium, nickel, and cadmium were also observed in the specimen. Normal elements in tissue structure, like calcium, chlorine, sulphur and iron were also detected. The patient had worked for several years in electrolysis. This fact, in addition to the clinical history and the microanalytical studies carried out led us to reach the diagnosis of argyria.

RESUM

Hom ha realitzat estudis microscòpics d'una biòpsia del front d'un pacient que presentava una tonalitat grisenca. Després de sotmetre la biòpsia a un sistema de deshidratació adequat, hom procedí a observar-la per microscòpia electrònica de rastreig (SEM) equipada amb un microanalitzador EDAX.

A la part interna de la preparació, hom hi detectà la presència d'ions metàl·lics, com ara crom, níquel, cadmi i, proper a l'epidermis, argent; hom hi detectà també els elements usuals en aquest tipus de teixits fisiològics, com ara calci, clor, sofre i ferro.

El malalt havia treballat amb argent. El quadre clínic i els estudis mineralògics duts a terme permeten d'establir el diagnòstic d'argíria.

Paraules clau: Argíria. Microscòpia electrònica de rastreig. Microanàlisi de raigs X característics.

Key words: Argyria. Scanning Electron Microscopy. Energy dispersive X-ray analysis.

1. *Cas clínic*

Un pacient de 70 anys fou ingressat en un servei hospitalari per a estudiar-li la pigmentació de color blau metàl·lic que presentava la seva pell. El malalt era portador d'una broncopneumopatia crònica obstructiva, de la qual en aquells moments es trobava compensat. Havia treballat durant més de vint anys en orfebreria i en la fabricació de plaques termoïllants, i havia estat en contacte repetit amb diversos metalls, entre ells l'argent. Hom dugué a terme una biòpsia cutània per a estudiar la pigmentació del pacient. L'observació de la mostra per microscòpia òptica evidencià dipòsits de partícules al derma amb característiques metàl·liques. Hom féu un estudi per microscòpia electrònica de rastreig (SEM) i per microanàlisi dispersiva d'energies de raigs X (EDX) per tal de determinar el tipus de metall present en els dipòsits; hom hi detectà la presència abundant d'argent. El quadre clínic d'un malalt amb antecedent exposicional a l'argent, juntament amb els resultats obtinguts en l'estudi de la biòpsia, estableix el diagnòstic d'argíria.

2. *Preparació de les mostres*

Hom féu una biòpsia del front del pacient, de la qual fou seccionat, amb un bisturí, una mostra de mig mil·límetre d'amplada, perpendicularment a l'epidermis. Aquesta mostra fou sotmesa a un procés de deshidratació en acetona segons el gradient de concentracions següent: 60 % d'acetona en aigua destil·lada, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, i 100 %; aquest darrer pas fou repetit dues vegades. La mostra romangué trenta minuts en cadascun dels banys. És un fet corrent que a les darreres fases del procés de preparació de mostres fisiològiques per a llur observació per microscòpia electrònica, apareguin arrugues provocades per l'evaporació del medi de deshidratació. Per tal d'evitar aquest fenomen utilitzarem un aparell de deshidratació per punt crític,¹ que permet la substitució dels líquids hidratants propis del teixit (en el nostre cas l'acetona) per criolíquids i la posterior gasificació d'aquests a la temperatura crítica, que és aquella a la qual el volum específic del gas i del criolíquid esdevenen iguals.

En el nostre cas emprarem CO₂ com a criolíquid: pressió crítica = 13 atm i temperatura crítica = 31°C.

¹ FROMME, H. G., PFEFFERKORN, G., PFAUTSCH, M., BYSTRICKY, V. *Erfahrungen mit der «Kritischen Punkt»-Trocknung als Preparationsmethode für die Raster-Elektronenmikroskopie, Beitr. Elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl.*, 5, 893 (1972).

3. Resultats

Per tal d'evitar la detecció d'elements metàl·lics estranys, que es produiria amb els portamostres convencionals de microscòpia electrònica, hom emprà portamostres de grafit d'un elevat grau de puresa. La preparació fou estudiada en un microscopi electrònic de rastreig Phillips 500 equipat amb un analitzador dispersiu d'energies de raigs X EDAX. La mostra fou ombrejada amb grafit.

Hom duqué a terme reiterades anàlisis superficials a la biòpsia emprant un feix d'electrons primaris de 25 KeV i d'un diàmetre de spot de 0,125 μm . Hom emprà aquesta elevada tensió per tal d'aconseguir, a la pantalla, una bona resolució entre les línies $K\alpha$ i $K\beta$. En aquestes condicions hi foren detectats a diversos punts de la part central de la preparació indicada a la figura 1, els elements químics següents: Cl, S, Ca, Fe, K, Cr, Ni i Cd; aquests dos darrers elements foren detectats a nivell de traces. En aquesta zona allunyada de l'epidermis, hi fou detectada la presència d'argent d'una manera difosa. A mesura que desplaçarem l'anàlisi puntual envers la superfície epidèrmica, la resposta espectral fou cada vegada més intensa, així com la densitat de presència d'argent per unitat de superfície de mostra.

La figura 2 indica la resposta de les línies de l'argent $K\alpha$ (2,212 KeV) i $K\beta$ (2,212 V), en una anàlisi EDX (Energy Dispersive X-Ray) que correspon a una exposició de 535 segons. El fet de requerir un temps d'exposició tan elevat posa de manifest que l'argent és present, al teixit, en quantitats molt petites, tal com era normal d'esperar en un cas mèdic d'aquestes característiques.

Hom realitzà una anàlisi global, a 160 augments i amb un feix d'electrons primaris de 25 KeV, i hi foren observats els elements químics següents: Na ($K\alpha$, 1,041 KeV), Mg ($K\alpha$, 1,253 KeV), Si ($K\alpha$, 1,739 KeV), P ($K\alpha$, 2,013 KeV), S ($K\alpha$, 2,307 KeV), Cl ($K\alpha$, 2,621 KeV), K ($K\alpha$, 3,312 KeV), Ca ($K\alpha$, 3,690 i $K\beta$, 4,012 KeV), Fe ($K\alpha$, 6,398 i $K\beta$, 7,057 KeV) i traces de Ni ($K\alpha$, 7,471 KeV). L'espectre de raigs X obtingut en aquesta anàlisi és presentat a la figura 3. Hom hi pot notar que els elements químics que manifesten una resposta més intensa i que, per tant, són més abundants són el calci, el sofre, el clor i el ferro. La presència d'aquests elements és usual en teixits fisiològics.

Hom duqué a terme, finalment, una anàlisi de la distribució de diversos elements, a la totalitat de la preparació, mitjançant la tècnica coneguda amb el nom de *mapping*. L'element que presentà una resposta més intensa, en aquest tipus d'anàlisi, fou el calci, tal com és indicat a la figura 4.

Aquest resultat és coincident amb l'espectre global de raigs X exposat a la figura 3. S. S. BLEEHEN, *et al.*² detectaren la presència de grànuls esfèrics que

² BLEEHEN, S. S., GOULD, D. J., HARRINGTON, C. I., DURRANT, T. E., SLATER, D. N., i UNDERWOOD, J. C. E. «Occupational argyria; light and electron microscopic studies and X ray microanalysis». *British Journal of Dermatology*, 104, 19-26 (1981).

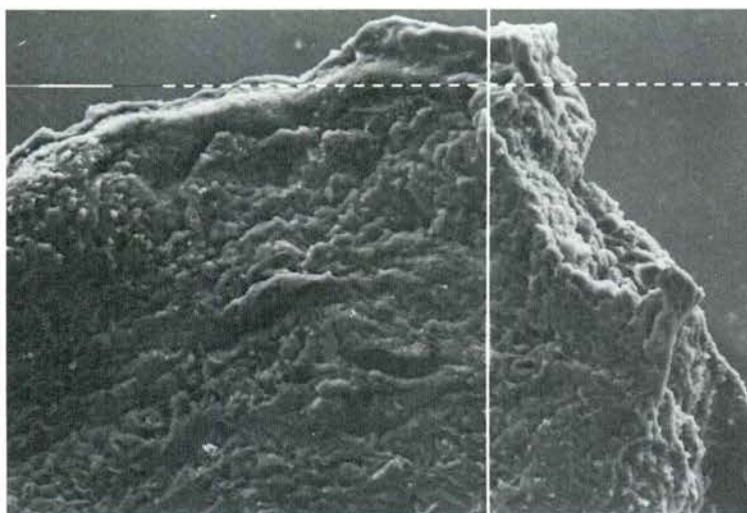


Fig. 1. - Preparació del teixit epidèrmic. El contorn superior correspon a l'epidermis i la part inferior és l'interior del teixit. L'encreuament és la zona de l'anàlisi indicada a la figura 2.
Marques: 10 μm (x 200).

Fig. 1. - Biopsy of the epidermic tissue. The upper border corresponds to the epidermis and the lower one to the inner side of the tissue. The point of intersection corresponds to the analyzed zone shown in figure 2. Markers: 10 μm (x 200).

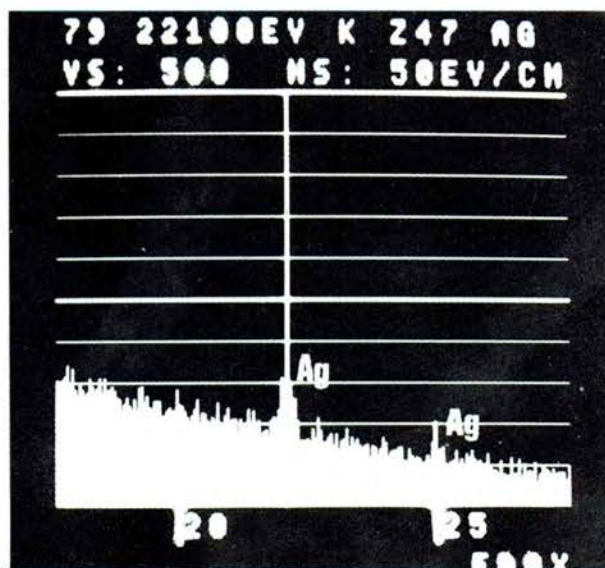


Fig. 2. - Línies $K\alpha$ (2,212 KeV) i $K\beta$ (2,492 KeV) d'argent, a l'anàlisi EDX.

Fig. 2. - Lines $K\alpha$ (2,212 KeV) and $K\beta$ (2,492 KeV) of silver in EDX analysis.

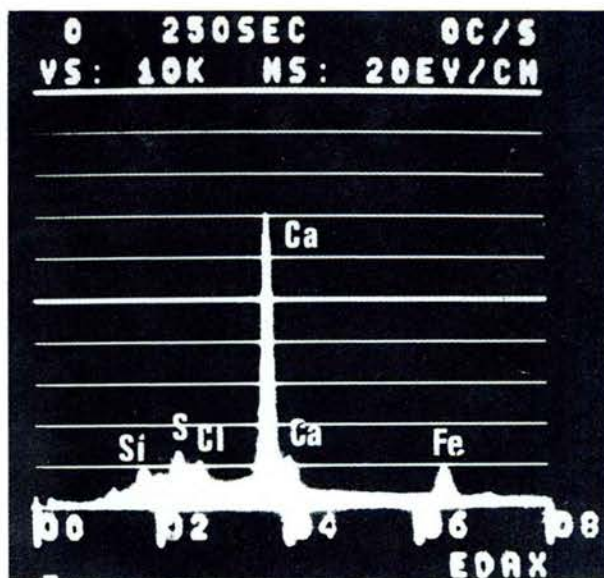


Fig. 3. - Espectre de raigs X de la totalitat de la mostra presentada a la figura 1.

Fig. 3. - X-ray diagram of the whole sample shown in figure 1.



Fig 4. - Anàlisi «mapping» a 200 x, de la línia K α (3,69 KeV) del calci, a la totalitat de la preparació mostrada a la figura 1.

Fig. 4. - Analysis «mapping» of Ca (K α : 3,69 KeV), in the whole sample shown in figure 1.

no permetien el pas dels electrons dins seccions de biòpsies observades per microscòpia electrònica de transmissió. Les dimensions dels grànuls oscil·laven entre 0,03 μm i 0,1 μm ; els elements metàl·lics observats per aquests autors en casos d'argíria són molt semblants als detectats en el treball present.

4. *Conclusions*

Hom ha pogut demostrar que la tonalitat grisenca observada a la pell del front del pacient era deguda a l'absorció cutània d'argent; hom hi trobà també altres ions metàl·lics: crom, níquel, cadmi, etc. La microscòpia electrònica de rastreig i el mètode d'anàlisi EDX esdevenen una eina analítica i d'observació morfològica potent per a poder diagnosticar casos clínics d'aquest tipus.

A D D E N D A

Aspectes parcials d'aquest treball foren publicats a la Revista «Medicina Clínica» Vol. 83, núm. 20, 1984, pàgs. 38-40 (856-858) amb el títol «Argíria ocupacional. Estudio por Microscopía Electrónica de barrido y fluorescencia de rayos X dispersiva de energía».

IDENTIFICACIÓ DE MICROSTRUCTURES CRISTAL·LINES EN UN CAS D'INGESTIÓ VOLUNTÀRIA DE TALC, PER MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG, DIFRACCIÓ DE RAIGS X I MICROANÀLISI DISPERSIVA D'ENERGIES DE RAIGS X

per

JOSEP M. TURA *, JOAN RODES **, ADOLF TRAVERIA ***,
JAUME BORBÓN *, MONTSERRAT MARSAL ****, IGNASI OLIVELLA *****

* Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi, I.T.Q.T., Centre d'Investigació i Desenvolupament del C.S.I.C., Barcelona. ** Unitat d'Hepatologia. Hospital Clínic i Provincial. Universitat de Barcelona. *** Institut Jaume Almera del CSIC. Barcelona. **** Departament de Metalúrgia i Siderúrgia. E.T.S.E.I. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona. ***** Direcció General de Pesca Marítima. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans, carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona.

This work forms part of programme number 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

CRYSTALLINE PARTICLES IDENTIFIED BY SEM, EDXA AND X-RAY DIFFRACTION IN A CASE OF VOLUNTARY INGESTION OF TALC

SUMMARY

Modern microanalytical techniques developed by surface physics have facilitated the identification of alien bodies in the human organism and assisted the diagnosis of psychical problems in patients who have voluntarily ingested foreign bodies orally, as in the present case, or via the vagina or anus.

RESUM

Les modernes tècniques físiques de microanàlisi han permès de poder identificar inclosions estranyes dins l'organisme i ajudar al diagnòstic de casos de trastorns psíquics de pacients que ingerien voluntàriament cossos estranys per via oral, com en el cas present, o per altres vies, com la vaginal o l'anal.

Paraules clau: Ingestió patològica de sòlids. Partícules cristallines. Microscòpia electrònica de rastreig. Difracció de raigs X. Anàlisi dispersiva d'energies de raigs X.

Key words: Solid pathological ingestion; Crystalline particles; Scanning Electron Microscopy; Energy dispersive X-Ray analysis.

1. *Cas clínic*

Hom estudià el cas d'una pacient que es queixava de grans dolors intestinals, que ella atribuïa a una substància blanquinosa present a la seva femta; això li succeïa des de feia anys. Hom féu un estudi de l'alimentació de la pacient, per si prenia marisc o algun altre aliment que pogués contenir restes sorrenques; el resultat fou negatiu. El cas fou iniciat a requeriment del marit de la pacient, un senyor d'uns seixanta anys.

2. *Preparació de les mostres i resultats experimentals*

Hom prengué dues mostres alíquotes de la femta liofilitzada i hi foren dutes a terme les dues extraccions següents:

a) Una extracció amb èter per tal de separar la matèria orgànica de la mostra.

b) Una extracció amb cloroform per tal d'aïllar la matèria inorgànica.

L'extracció amb cloroform separà la mostra gravimètricament.

No hi fou observada cap dissolució de materials, però una part de la mostra surava, mentre que la resta es dipositava en el fons. Així com la part que surava era fosca, la que es dipositava era blanquinosa. Aquestes dues fraccions foren analitzades per difracció de raigs X. La primera, la que flotava, no donà cap resposta, només soroll de fons. Era per tant, amorfa. La segona fracció, al contrari, presentà un diagrama de raigs X característic del SiO_2 (quars) i del $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ (talc). El pòsit d'aquesta segona fracció fou observat per microscòpia electrònica de rastreig, emprant talc comercial com a patró (figura 1). La identificació morfològica dels cristalls de quars i de talc fou duta a terme utilitzant l'Atlas de Partícules de McCrone, Delly i Palenik¹. Les figures núms. 2 a 5 presenten diversos aspectes morfològics de l'esmentada mostra. Hom detectà talc a la mostra problema (zones més brillants de la figura 2). L'anàlisi dispersiva d'energies de raigs X (EDX) confirmà la presència de silici i de magnesi, així com la de traces de fòsfor, de bari i d'alumini.

Cristalls de quars d'una mida considerable (entre 200 i 270 micres) foren detectats en aquesta segona fracció (figures 3 i 4). L'anàlisi EDX donà només un pic intens de silici, perquè és sabut que aquesta tècnica no permet la detecció dels elements orgànics més lleugers. També fou detectada la presència d'un tipus d'inclusions (figura 5), l'anàlisi de les quals evidencià la presència de Si i de Ca.

¹ McCrone, W. C., Delly, J. G., i Palenik, S. J. «The particle atlas», Vol. VI, Ann Arbor Science publishers, Michigan, Segona Edició, 1980.

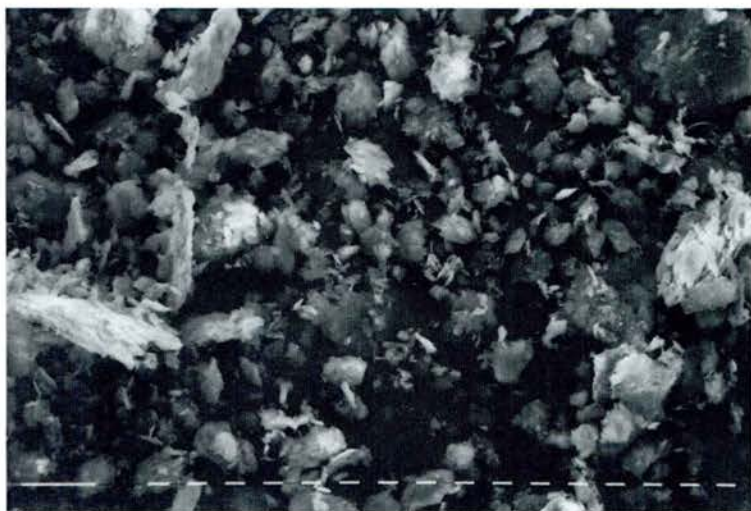


Fig. 1. - Talc comercial patró. Marques: 10 μm (x 320).
Fig. 1. - Standard commercial talc. Markers: 10 μm (x 320).



Fig. 2. - Talc i altres partícules presents a la mostra. Marques: 10 μm (x 400).
Fig. 2. - Talc and other particles present in the sample. Markers: 10 μm (x 400).



Fig. 3. - Cristall de quars. Marques: 10 μm (x 320).

Fig. 3. - Quartz crystal. Markers: 10 μm (x 320).



Fig. 4. - Cristall de quars. Marques: 10 μm (x 320).

Fig. 4. - Quartz crystal. Markers: 10 μm (x 320).

El pic de Si en aquest cas fou menys intens que en les figures 3 i 4. Probablement es tracta de cristalls de SiO_2 recoberts d'algun tipus de sal càlcica.

Hom pogué observar també en la preparació restes de fibres vegetals recobertes amb una pel·lícula de matèria orgànica i amb algun tipus de sal càlcica (figures 6 i 7).

El conjunt d'anàlisis de la mostra blanquinosa donà com a resultat la determinació de quars i de talc com a cossos estranys, els quals a voltes apareixien purs i a voltes recoberts amb substàncies orgàniques pròpies del mateix procés digestiu.

La pacient prenia molts medicaments (Valium[®], Tofranil[®], Pamota[®], Anafranil[®], Pankreoflat[®] i Foslip[®]); davant aquest fet hom analitzà per fluorescència de raigs X dispersiva de longituds d'ona els medicaments per si algun d'ells contenia silici o bé talc. No hi fou detectada cap d'aquestes dues substàncies.

Davant la possibilitat que es pogués tractar d'un cas d'ingestió voluntària del quars per la pacient, i davant la circumstància que talc pur no es troba lliure a Catalunya, hom preguntà als familiars de la pacient si aquesta tenia un pot de talc comercial a casa seva. Davant la resposta afirmativa, procedírem a analitzar aquest producte pels mètodes següents:

- a) Fluorescència de raigs X dispersiva de longituds d'ona.
- b) Microscòpia electrònica de rastreig equipada amb un analitzador EDAX dispersiu d'energies.

La figura 8 mostra el diagrama de la fluorescència de raigs X dispersiva de longitud d'ona del talc comercial, obtingut amb un aparell Siemens. Els valors numèrics d'aquest diagrama són donats a la taula 1.

Hom pot observar la presència de quars, de talc (silicat de magnesi) i de $\text{CO}_3(\text{CaMg})$ (dolomita), aquesta en una quantitat menor. L'anàlisi del talc comercial per energia dispersiva de raigs X posà també de manifest la presència de quars, de silicat de magnesi i de dolomita. La figura 9 mostra cristalls de quars d'una mida de 40 micres en un camp on el silicat magnèsic és majoritari.

Hom estudià pel mateix procediment talc mèdic per tal de saber si en aquest material més refinat també hi apareixia quars. Els diagrames de raigs X donaren també la presència de SiO_2 , de $\text{CO}_3(\text{CaMg})$, i també, naturalment, de silicat de magnesi. A la figura 10 hom pot observar un cristall de quars en aquesta preparació, a la superfície del qual hi ha talc dipositat.

Hom pogué diferenciar pels diagrames EDX el talc del quars. La figura 11 mostra la superposició de dues respostes espectrals de sengles anàlisis puntuals: a) la d'un cristall de quars (línies blanques més amples, reproduïdes esquemàticament a la dreta de la figura); i b) la d'un cristall de talc (línies blanques més estretes).

La figura 12 correspon a la superposició de les dues mateixes respostes, però en aquest cas les línies blanques més amples fan referència a l'anàlisi del talc

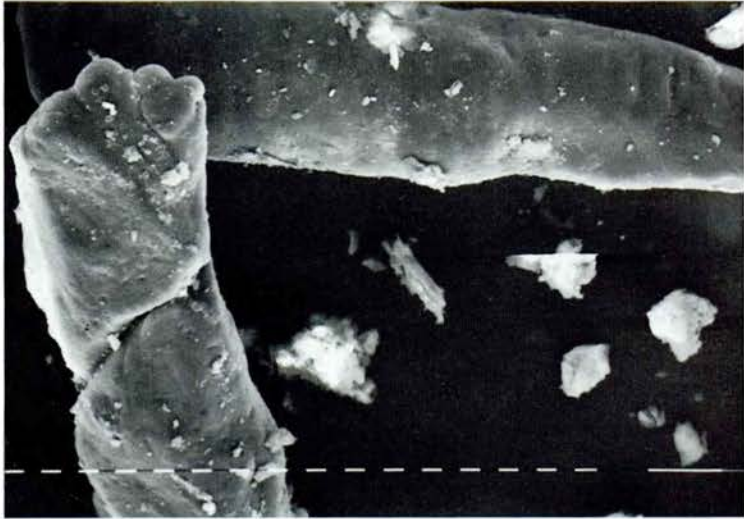


Fig. 5. - Marques: 10 μm (x 320).

Fig. 5. - Markers: 10 μm (x 320).

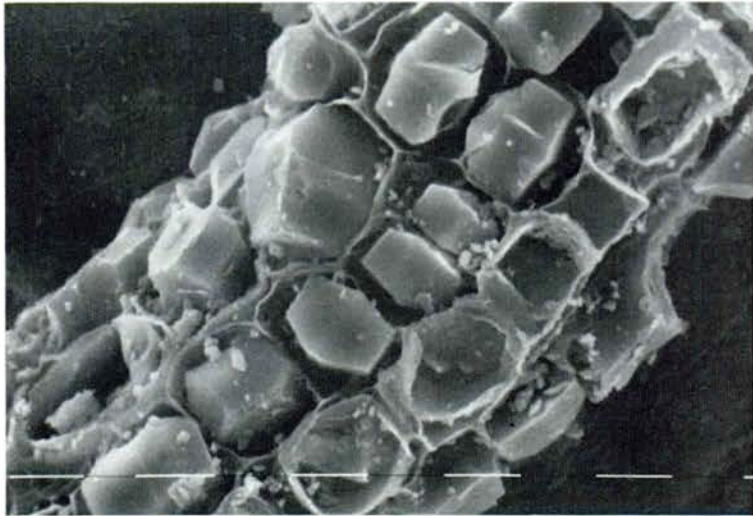


Fig. 6. - Restes d'una fibra vegetal.

Fig. 6. - Vegetal fibre residue.



Fig. 7. - Mapping de Ca de la fibra vegetal de la figura anterior.

Fig. 7. - Ca mapping of the vegetal fibre shown in figure 6.

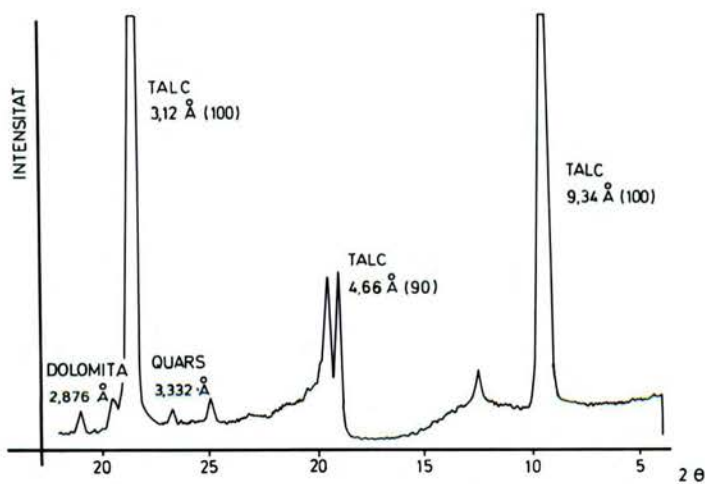


Fig. 8. - Diagrama de difracció de raigs X de talc comercial.

Fig. 8. - X-ray diffraction pattern of commercial talc.



Fig. 9. - Cristalls de quars presents en talc comercial. Hom pot apreciar la presència majoritària de talc. Marques: 10 μm (x 640).

Fig. 9. - Quartz crystals present in commercial talc. Large presence of talc particles may be observed. Markers: 10 μm (x 640).



Fig. 10. - Cristalls de quars presents dins talc mèdic. Hom pot observar diverses partícules de talc damunt la seva superfície. Marques: 10 μm (x 1.250).

Fig. 10. - A quartz crystal present in medical talc. Several talc particles may be observed in its surface. Markers: 10 μm (x 1.250).

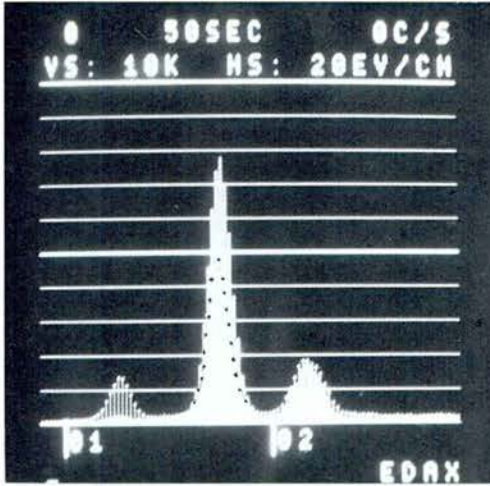


Fig. 11. - Superposició dels diagrames EDX de talc i de quars mesclats dins talc comercial.

Fig. 11. - EDXA pattern superposition of quartz and talc mixed with commercial talc.

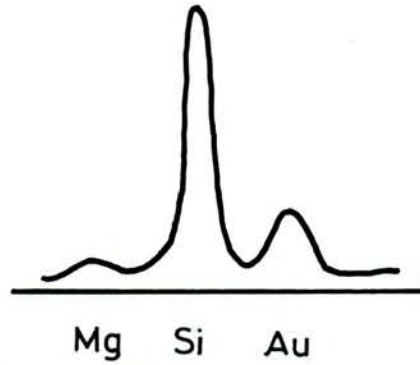


Diagrama EDX d'un cristall de quars dins talc comercial.

EDXA pattern of a quartz crystal in commercial talc.

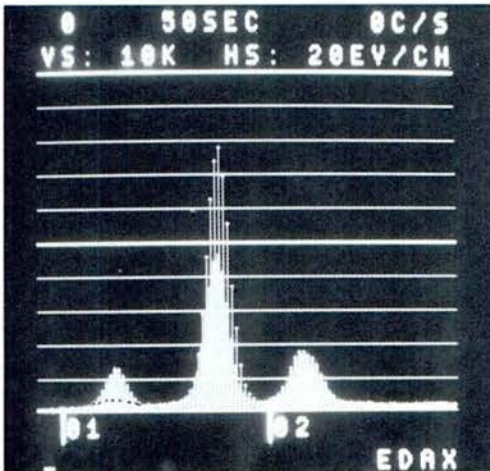


Fig. 12. - Superposició dels diagrames EDX de talc i de quars mesclats dins talc comercial.

EDXA pattern of a talc crystal in commercial talc.

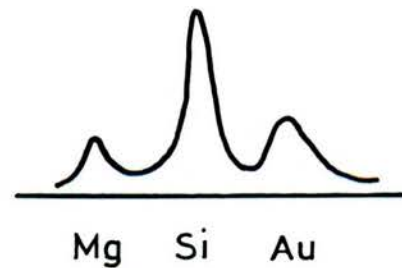


Diagrama EDX d'un cristall de talc dins talc comercial.

Fig. 12. - EDXA pattern superposition of quartz and talc mixed with commercial talc.

(reproduïdes esquemàticament a la dreta de la figura), mentre que les línies més estretes són la resposta del quars.

Hom pot apreciar en el talc una resposta més intensa en el pic de magnesi que no pas en el del silici, mentre que en el quars la situació és inversa.

La figura 13 mostra un cristall de dolomita, la identificació del qual fou possible gràcies al *mapping* del calci (figura 14) i a l'anàlisi puntual del magnesi.

La presència de quars dins talc comercial i talc mèdic no ha d'estranyar, perquè la sílice pirogènica submicroscòpica és utilitzada com a additiu. Aquesta substància té una gran superfície activa i hom l'empra per a suspendre, dispersar i reforçar, i com a agent espessant o tixotròpic, per a evitar la formació de pols higroscòpiques i, per tant, l'agrumollament d'aquestes. Aquest compost és anomenat químicament sílice fumada o de combustió, i és obtingut per combustió en forns d'oxigen-hidrogen del tetraclorur de silici. La seva forma és col·loidal.

3. *Discussió de resultats*

Hom ha pogut comprovar que els compostos estranys presents a la femta liofilitzada són quars i talc, d'una mida i unes característiques morfològiques semblants a les del talc comercial o del talc mèdic. Com que ambdós minerals patògens no es trobaren lliures als productes alimenticis ni als medicaments ingerits per la pacient, hom arribà a la conclusió que per algun motiu desconegut la pacient prenia per via oral talc comercial.

Els autors d'aquest treball lliuraren directament llurs resultats als facultatius que portaven el cas de la pacient. Aquests confirmaren que era probable que es tractés d'autoingestió voluntària de productes tòxics, ja que la pacient es trobava en tractament de desequilibri psíquic. Aquests casos es presenten en pacients que pretenen de cridar l'atenció de les persones que els envolten, per motius de solitud, manca d'atenció, etc.

Els autors aconsellaren als facultatius que tractaven la pacient que, si no era possible evitar que aquesta ingerís talc comercial, caldria canviar-li, discretament, el contingut del pot de talc comercial al seu domicili, per un producte d'aspecte semblant que no contingués cristalls. És possible que el dolor del qual es queixava la pacient fos degut a la retenció temporal de partícules de quars dins les vellositats de la membrana mucosa que recobreixen la superfície interna de l'intestí prim.² D'altra banda, és probable que la ingestió d'un talc comercial ofereixi perills des del punt de vista toxicològic pels additius orgànics que aquest producte pot contenir (bactericides, substàncies aromàtiques, etc.); aquests perills serien menors en el cas d'ingestió de la sílice pirogènica abans esmentada.

² FUJITA, T., TOKUNAGA, J., i INOUE, H. «Atlas of Scanning Electron Microscopy in Medicine», Elsevier Publishing Comp., Amsterdam 1971.

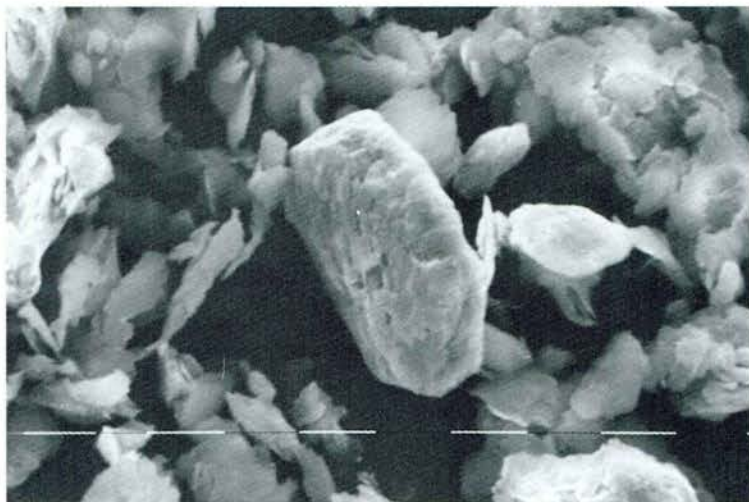


Fig. 13. - Cristall de dolomita present dins talc mèdic
Marques: 10 μm (x 1.250).

Fig. 13. - A dolomite crystal observed in medical talc.
Markers: 10 μm (x 1.250).



Fig. 14. - Anàlisi mapping del calci ($K\alpha$: 3,69 KeV) del cristall de dolomita mostrat a la figura 13.

Fig. 14. - Ca ($K\alpha$: 3,69 KeV) mapping of the dolomite crystal shown in figure 13.

Agraïments

Els autors agraeixen al Dr. Josep M. Ribó, de la Facultat de Química de la Universitat de Barcelona, els seus valuosos suggeriments durant la realització d'aquest treball.

T A U L A 1

| Diagrama obtingut Diagram obtained | | | J.C.P.D.S. | | J.C.P.D.S. | |
|---------------------------------------|-------|----|------------|-----|------------|-----|
| 20 | dÅ | I | dÅ | I | dÅ | I |
| 9,50 | 9,31 | 7 | | | 9,34 | 100 |
| 11,35 | 4,586 | 2 | | | 4,66 | 90 |
| 20,80 | 4,270 | 4 | 4,26 | 35 | | |
| 25,30 | 3,520 | 2 | | | 3,51 | 42 |
| 26,00 | 3,427 | 3 | | | | |
| 26,55 | 3,367 | 8 | 3,34 | 100 | | |
| 28,70 | 3,110 | 10 | | | 3,12 | 100 |
| 36,25 | 2,478 | 2 | 2,458 | 12 | | |
| 39,80 | 2,265 | 2 | 2,282 | 12 | | |
| 41,10 | 2,181 | 1 | | | 2,212 | 20 |

Diagrama de difracció de raigs X de talc comercial

Abreviacions:

J.C.P.D.S.: Joint committee of powder diffraction standard

dÅ: Distància en àngstroms

I: Intensitat

Diagram of X-Ray Diffraction of comercial talc

Abbreviations:

J.C.P.D.S.: Joint committee of powder diffraction standard

dÅ: Distance in Angstroms

I: Intensity

IDENTIFICACIÓ PER MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA I PER ANÀLISI DISPERSIVA D'ENERGIES DE RAIGS X DE PARTÍCULES DE SILICONA EN EL FETGE D'UN PACIENT EN PROGRAMA D'HEMODIÀLISI

per

RAMON ESTRUCH I RIBA *, J. M. TURA **, ALVARO URBANO ISPIZUA *,
MIQUEL BRUGUERA ***, MONTSERRAT MARSAL ****,
ALVARO URBANO-MARQUEZ *

* Servei de Medicina Interna. Hospital Clínic i Provincial. Universitat de Barcelona.

** Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi, Centre d'Investigació i Desenvolupament del CSIC. Barcelona. *** Servei de Gastroenterologia i d'Hepatologia, Hospital Clínic i Provincial. Universitat de Barcelona. **** Departament de Metal·lúrgia i de Siderúrgia. E.T.S.E.I. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans, carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona.

This paper is part of program number 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

IDENTIFICATION OF SILICONE PARTICLES IN THE LIVER OF A HEMODIALYSIS PATIENT BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS

SUMMARY

Hepatic, histologic and biochemical disorders associated with the deposit of silicone particles from dialysis tubes have been reported in haemodialysis patients with chronic renal insufficiency.

We describe a patient with chronic renal insufficiency who presented intermittent attacks of fever provoked by the haemodialysis sessions. These episodes of fever ceased when the dialysis centre was changed. The physical examination revealed hepatic splenomegaly whereas the chemical examination showed an alteration in the hepatic tests.

The examination of the hepatic sample by Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDXA) fitted to a Scanning Electron Microscope produced evidence of silicone particles between the sinusoids and the hepatocytes. Finally we discuss the possible relationship between the hepatic alterations and the deposit of silicone particles in the liver of this type of patient.

RESUM

En els pacients amb insuficiència renal crònica en programa d'hemodiàlisi, hom ha referit alteracions histològiques i bioquímiques hepàtiques associades al dipòsit de partícules de silicona provinents dels tubs utilitzats en els aparells de diàlisi.

Els autors exposen el cas d'un pacient amb insuficiència renal crònica que presentava episodis febrils relacionats amb sessions d'hemodiàlisi que desaparegueren en canviar de centre de diàlisi. A l'exploració física hom hi trobà hepatosplenomegàlia, i en l'anàlisi hom observà una alteració de les proves hepàtiques. L'estudi histològic hepàtic mostrà l'existència de fibrosi portal, infiltrat inflamatori, necrosi d'hepatòcits i un granuloma epitelioides. L'examen de la mostra hepàtica amb un analitzador dispersiu d'energies de raigs X (EDX) acoblat a un microscopi electrònic de rastreig demostrà la presència de partícules de silicó entre els sinusoides i els hepatòcits. Finalment, discuteixen la possible relació entre les alteracions hepàtiques i el dipòsit de silicó en el fetge d'aquest tipus de pacients.

Paraules clau: Insuficiència renal crònica. Hemodiàlisi. Hepatologia. Silicó. Microscòpia electrònica de rastreig. Microanàlisi de raigs X.

Key words: Chronic renal insufficiency. Haemodialysis. Hepathology. Silicone. Scanning electron microscopy. X-ray microanalysis.

1. Introducció

El 30 % dels pacients amb insuficiència renal crònica en programa d'hemodiàlisi presenten quadres d'hepatopatia crònica,¹ que, en la major part dels casos, són deguts a infeccions pel virus no A no B i, amb menys freqüència, a sobrecàrrega de ferro o a infeccions per citomegalovirus.^{2,3} En aquests darrers anys han estat referides alteracions hepàtiques associades al dipòsit de silicó procedent dels tubs dels aparells de diàlisi,^{4,7} sense que hom sàpiga amb exactitud la relació que pugui existir entre aquestes troballes.

Hom exposa, a continuació, el cas d'un pacient amb insuficiència crònica en programa d'hemodiàlisi que presentava episodis febrils relacionats amb les sessions de diàlisi i en la biòpsia hepàtica del qual coexistien alteracions histològiques hepàtiques, juntament amb el dipòsit de partícules de silicó, detectades mitjançant l'anàlisi dispersiva d'energies de raigs X (EDX) acoblada a un microscopi electrònic de rastreig (SEM).

¹ PARFREY, P. S., PARADINAS, F. J., O'DRISCOLL, J. B., CURTIS, J. R., GOWER, P. E. Chronic liver disease in haemodialysis patients. Proc EDTA 1982; 19: 153-158.

² LEONG, A. S. Y., PATH, M. R. C., DISNEY, A. P. C., GOVE, D. W. Spallation and migration of silicone from blood-pump tubing in patients on haemodialysis. N. Engl. J. Med. 1982; 306: 135-140.

³ GALBRAITH, R. M., EDDLESTON, A. L., PORTMANN, B., *et al.*: Chronic liver disease developing after outbreak of HBsAg-negative hepatitis in haemodialysis unit. Lancet 1975, II: 886-890.

⁴ LEONG, A. S. Y., DISNEY, A. P. S., GOVE, D. W. Refractil particles in liver of haemodialysis patients. Lancet 1981, I: 889-890.

⁵ PARFREY, P. S., O'DRISCOLL, J. B., PARADINAS, F. J. Refractile material in the liver of haemodialysis patients. Lancet 1981, I: 1101-1102.

⁶ BOMMER, J., RITZ, E., WALDHER, R. GASTNER, M. Silicone cell inclusions causing multiorgan foreign body reaction in dialyzed patients. Lancet 1981; I: 1314.

⁷ MORALES, J. M., COLINE, F., ARTEAGA, J., *et al.* Clinical implications of the presence of refractile particle in the liver of haemodialysis patients. Proc EDTA 1982; 19: 265-269.

2. Observació clínica

Baró de cinquanta-un anys, que ingressà per a ésser-li estudiada una síndrome febril de cinc mesos d'evolució. El pacient havia estat diagnosticat vuit anys abans d'insuficiència renal crònica, i, des de feia tres anys, requeria tres sessions setmanals d'hemodiàlisi que foren dutes a terme en un altre centre hospitalari. En els darrers tres anys, el pacient havia rebut una o dues transfusions sanguínies cada trimestre.

Des de feia cinc mesos, el pacient presentava febre diària de 38° C, i, els dies que assistia a sessions de diàlisi, presentava pics febrils de 40° C acompanyats de malestar general, calfreds i sudoració.

A l'exploració física, la tensió arterial era de 145/90 mm Hg, el pols de 84 per minut i la temperatura axil·lar de 38° C. El pacient presentava pal·lidesa cutaneomucosa, i hom no hi palpava adenomegàlies. A l'abdomen, hom hi trobà hepatomegàlia de tres centímetres i esplenomegàlia de dos, ambdues sota el vrell costal. La resta de l'exploració física fou normal.

A l'anàlisi sanguínia, hom objectivà una hemoglobina de 8,1 g/dl i una xifra de leucòcits de $4 \times 10^9/l$ amb 67 % de segmentats, 2 % de baculats, 19 % de limfòcits i 8 % de monòcits. El recompte de plaquetes era de $237 \times 10^9/l$, i el temps de protrombina del 100 %. La VSG era de 90 mm 1.^a hora, BUN 46 mg/dl, creatinina 6,7 mg/dl, àcid úric 3,9 mg/dl, fòsfor 6,6 mg/dl, calci 11,4 mg/dl, sodi 141 meq/l i potassi 5,1 meq/l. Les SGOT eren 68 UI/l, SGPT 138 UI/l, gamma GT 237 UI/l, fosfatasa alcalina 364 UI/l i bilirubina total 0,8 mg/dl. La glucèmia, les proteïnes totals, el proteïnograma, i l'estudi lipídic foren normals. El sediment d'orina mostrà hematúria microscòpica. La proteïnúria fou de 502 mg en 24 hores amb una diüresi diària de 600 ml. La radiografia de tòrax fou normal i la radiografia simple d'abdomen mostrà el ronyó dret de vuit centímetres i l'esquerre de nou centímetres.

Els hemocultius i urinocultius practicats foren negatius. Les seroaglutinacions enfront de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Brucella mellitensis*, així com els anticossos antitissulars, anti-DNA i les proves reumàtiques, foren, així mateix, negatius. L'antigen de superfície del virus B (HBsAg), anticòs anti-HBsAg, anticòs antiantigen del core (anti-HBsAg), antigen E i anticòs E resultaren també negatius.

Hom practicà una biòpsia hepàtica, que fou examinada amb un microscopi òptic i amb un microscopi electrònic de rastreig al qual hom acoblà un analitzador dispersiu d'energies de raigs X (EDX). Hom detalla els resultats d'aquests estudis més endavant.

Des del seu ingrés al nostre servei, el pacient fou tractat amb tres sessions setmanals d'hemodiàlisi en el nostre hospital. La febre desaparegué el quart dia i el pacient ha romàs afebril fins a la data, un any i mig després del diagnòstic.

3. Examen de la biòpsia hepàtica per microscòpia òptica

A l'estudi per microscòpia òptica, l'arquitectura hepàtica es trobava alterada per engrossiment fibrós dels espais porta. Aquests espais presentaven, a més, un infiltrat inflamatori dens, constituït per limfòcits i histiòcits. Hom aprecià, als lobulets, un pleomorfisme cel·lular amb nombroses cèl·lules hepàtiques necròtiques i cossos acidòfils. Hom identificà, també, un granuloma epiteloide de situació paraportal sense fenòmens de necrosi ni inclusions en el seu interior. Així mateix, fou observat un dipòsit abundant de grànuls d'hemosiderina en els hepatòcits i en els macròfags. La quantitat d'hemosiderina d'aquestes cèl·lules impedia el reconeixement d'altres partícules refrangibles.

Hom examinà amb anterioritat un fragment de la biòpsia hepàtica en el microscopi òptic de fluorescència. En aquest estudi hom detectà la presència de microstructures allargassades que emetien una fluorescència de color blau intens quan la mostra era observada sota la radiació ultraviolada procedent d'una làmpada de vapor de mercuri d'alta pressió (figura 1). Cal indicar que el teixit hepàtic deshidratat emet en el seu conjunt una fluorescència blava, però d'una intensitat lluminosa molt més feble. La figura 2 mostra el mateix camp en microscòpia òptica de polarització. Així mateix hom examinà en el mateix microscopi de fluorescència un fragment dels tubs elàstics siliconats que són utilitzats en els aparells de diàlisi, i hom observà l'emissió d'una fluorescència blava de tonalitat i intensitat semblants a les observades en les microstructures allargassades trobades en el teixit hepàtic del pacient.

4. Examen en l'analitzador EDX i en el microscopi electrònic de rastreig

Un fragment de la mostra histològica hepàtica fou processada per a ésser examinada en l'analitzador EDX i en el microscopi electrònic de rastreig. Mitjançant anàlisis puntuals hom detectà silici a diverses zones de la preparació. En examinar aquestes zones a més augments, hom comprovà la presència d'estructures allargassades entre els sinusoides hepàtics (figura 3). Aquestes estructures, de dimensions diferents, foren analitzades amb la unitat EDX sota un feix d'electrons de 15 KeV d'energia i un diàmetre de 0,125 micres. La microanàlisi *in situ* demostrà que aquestes estructures eren compostes fonamentalment per silici i, en una proporció menor, per carboni, oxigen, magnesi, fòsfor, sofre, clor i potassi. La figura 4 mostra l'anàlisi EDX d'una d'aquestes estructures.

La microanàlisi mitjançant EDX d'un tub siliconat comercial dels utilitzats en els aparells de diàlisi mostrà una composició d'elements semblants a les anteriorment assenyalades, per bé que cal indicar que la resposta del clor és



Fig. 1. - Microstructures allargassades fluorescentes sota impacte de radiació U.V. (x 100).

Fig. 1. - Elongated microstructures fluorescent under U.V. radiation (x 100).



Fig. 2. - El mateix camp de la figura anterior, sota llum polaritzada (x 100).

Fig. 2. - The same view as the above figure, under polarized light (x 100).

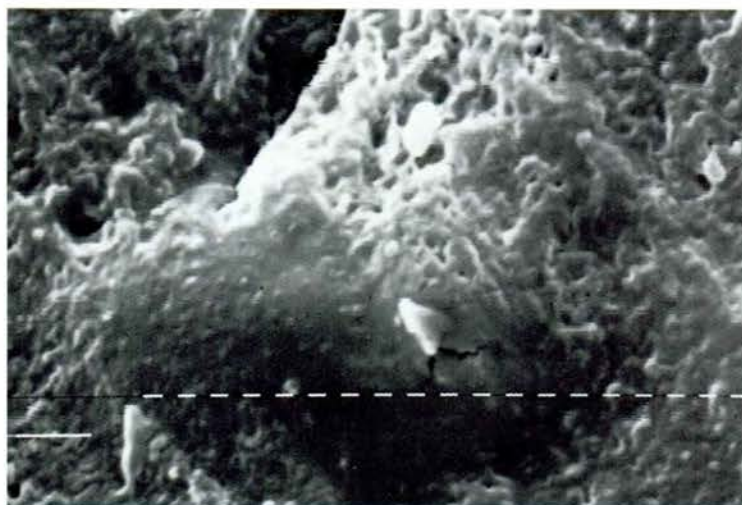


Fig. 3. - Microfotografia del parènquima hepàtic del pacient realitzada en el microscopi electrònic de rastreig en la qual hom pot apreciar la presència d'una estructura espicular (fletxa) entre els sinusoids i els hepatòcits. L'anàlisi EDX d'aquesta estructura donà un pic per al silici. Marques de 1 μ m.

Fig. 3. - Microphotography of the patient's hepatic parenchyma, where the presence of a spiculated structure between the sinusoids and the hepatocytes may be observed. EDX microanalysis revealed the presence of Si in such a structure. Markers: 1 μ m.

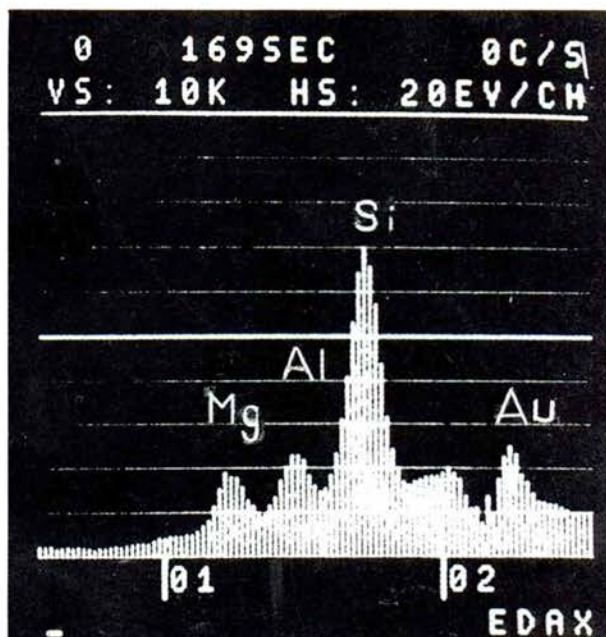


Fig. 4. - Anàlisi EDX d'una de les inclusions trobades al teixit hepàtic del pacient. Hom pot apreciar-hi el pic predominant de Si, principal element de la silicona. Pics menors de magnesi (Mg), d'alumini (Al) i d'or (Au) hi són també observables; l'or correspon a la metallització.

Fig. 4. - EDX analysis of one inclusion found in the patient's hepatic tissue. A predominant peak of Si, the main inorganic element in silicone may be observed. Smaller peaks of Mg, Al, and Au are also present; Au corresponds to the coating process.

en aquest cas més intensa, mentre que la del silici és més feble (figura 5). La figura 6 mostra la mateixa zona de fractura de la figura 1, observada per microscòpia electrònica de rastreig. Hom hi pot apreciar la presència d'un cos estrany que emergeix de la superfície fracturada de la biòpsia, i observar que la seva llargada és superior a 120 micres, mentre que la seva amplada aproximada és de 10 micres. La microanàlisi *in situ* d'aquesta estructura fibrillar posà de manifest la presència de Si, així com la d'altres elements: C, O₂, P, S, Cl i K.

La figura 7 mostra el conjunt de la biòpsia a 40 augments. L'encreuament assenyalà el punt on fou detectada l'estructura espicular de la figura 3. L'anàlisi EDX global de la biòpsia a aquests pocs augments evidencià la presència de K, Ca, Cl, P i Si. Els autors han pogut apreciar que alguns dels microfragments de silicona detectats tenen una morfologia molt semblant a la dels cilis (figura 8); no obstant això, no hi ha cap perill de confusió entre ambdues estructures, perquè els cilis no donen cap resposta d'elements inorgànics en una microanàlisi EDX.

5. Discussió

La utilització de silicona, tant en pròtesis de cirurgia estètica com en la fabricació de tubs d'aparells de diàlisi i de circulació extracorpòria, ha estat associada a quadres de febre, poliartritis, pneumonitis aguda i insuficiència respiratòria, que són solucionats en retirar les pròtesis o en canviar els tubs siliconats.^{2, 8-10}

L'any 1981, LEONG, *et al.*⁴ demostraren la disposició de partícules de silicona en el fetge de dotze de vint-i-quatre pacients sotmesos a hemodiàlisi periòdiques. Un mes més tard, PARFREY, *et al.*⁵ donaren compte de la mateixa troballa en quinze pacients amb insuficiència renal crònica i sotmesos a hemodiàlisi. Poc temps després, BOMMER, *et al.*⁶ comunicaren el dipòsit de silicona en un altre pacient en programa d'hemodiàlisi. Estudis posteriors¹¹ han demostrat que un 48 % dels pacients hemodialitzats en aparells amb tubs siliconats presenten dipòsit hepàtic de partícules de silicona.

En l'examen al microscopi òptic, les partícules de silicona foren observades com cossos refrangibles i foren identificades amb més facilitat amb el condensador del microscopi molt tancat o en el microscopi de contrast de fases. Aquestes partícules no són isotròpiques ni cristallines, i no es tenyeixen amb les tècni-

⁸ URETSKY, N. F., O'BRIEN, J. J., COURTISS, E. M., BECKER, M. D. Augmentation mamoplasty associated with a severe systemic illness. *Ann. Plast. Surg.* 1979; 3: 335-447.

⁹ CELLI, B. R., KOVNAT, D. M. Acute pneumonitis after subcutaneous injections of silicone. *N. Engl. J. Med.* 1983; 309: 856-857.

¹⁰ CHASTRE, J., BASSET, F., VIAN, F., *et al.* Acute pneumonitis after subcutaneous injections of silicone in transsexual men. *N. Engl. J. Med.* 1983; 308: 764-767.

¹¹ LAOHAPAUD, T., OSMAN, E. M., MORLEY, A. R., WARD, M. K., KERR, D. N. S. Accumulation of silicone elastomer in regular dialysis. *Proc. EDTA* 1982; 19: 142-152.

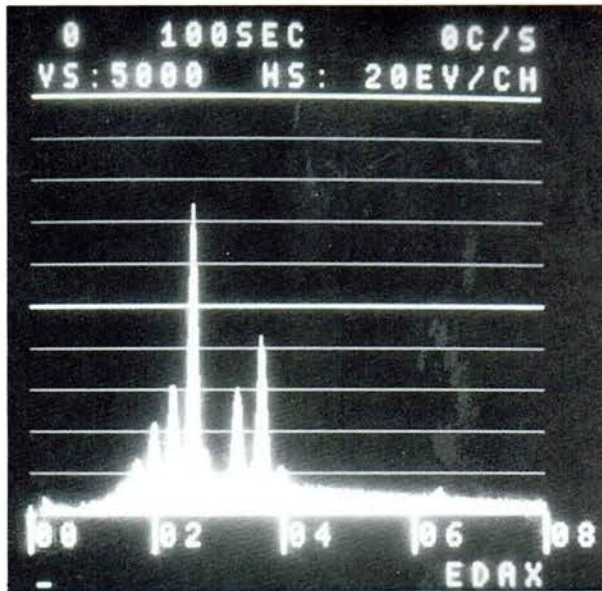


Fig. 5. - Anàlisi EDX d'un tub de silicona comercial utilitzat en aparell de diàlisi. Elements:

Si ($K\alpha = 1,77$ KeV), P ($K\alpha = 2,01$ KeV),
 S ($K\alpha = 2,30$ KeV), Cl ($K\alpha = 2,62$ KeV),
 K ($K\alpha = 3,31$ KeV), Ca ($K\alpha = 3,69$ KeV),
 $K\beta = 4,01$ KeV), Fe ($K\alpha = 6,39$ KeV).

Fig. 5. - Energy spectrum of a commercial silastic tube used in a dialysis blood pump equipment.

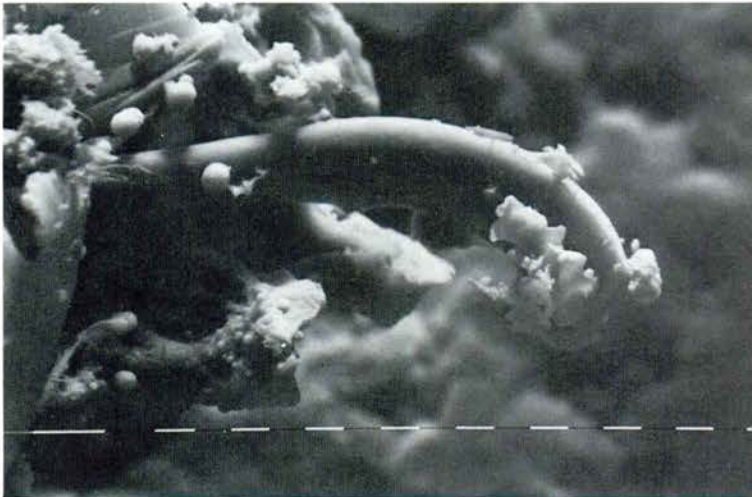


Fig. 6. - Imatge SEM d'un microfragment de silicona, que donà una resposta intensa de Si ($K\alpha$ 1,739 KeV) a l'anàlisi EDX. La mateixa microinclusió fou mostrada a les figures 1 i 2.
 Marques: 10 μ m (x 640).

Fig. 6. - SEM image of a silicone microfragment; EDX microanalysis revealed the presence of Si. The same microinclusion is show in figures 1 and 2. Markers: 10 μ m (x 640).

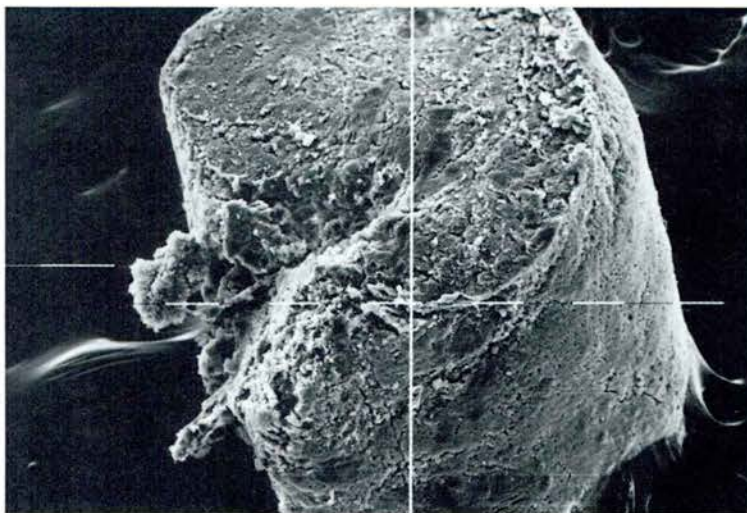


Fig. 7. - Conjunt de la biòpsia hepàtica. L'encreuament indica el punt on fou detectada l'estructura espicular de la figura 3. Marques: 100 μm (x 40).

Fig. 7. - Overall view of the hepatic biopsy. The point of intersection indicates the place where the spiculated structure in figure 3 was detected. Markers: 100 μm (x 40).

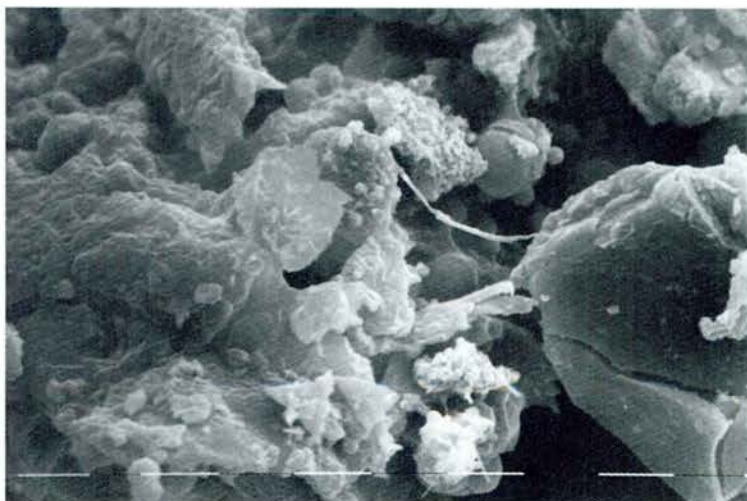


Fig. 8. - Cili al teixit hepàtic de la biòpsia. Marques: 10 μm (x 1.611).

Fig. 8. - Cilium in the patient's biopsy. Markers: 10 μm (x 1.611).

ques habituals de tinció.^{2,4,6} El dipòsit hepàtic es localitza en els espais porta, en els macròfags i en les cèl·lules Kupffer,^{4,6,11} i ha estat referit associat a lesions inflamatòries, fibrosis perivasculars i granulomes epitelioides.^{4,6,11}

Hom correlaciona la quantitat de partícules de silicona dipositades en el fetge amb el grau d'inflamació² i amb el temps que porta el pacient en programa d'hemodiàlisi.¹¹ Així mateix, les partícules de silicona obtingudes després de fer passar un flux sanguini a través de tubs siliconats posseïen el mateix espectre energètic que les partícules trobades en el fetge de pacients que eren sotmesos a hemodiàlisi en aparells que posseïen aquest tipus d'utilatge.²

El paper que aconsegueix el dipòsit d'aquest material en el fetge és discutit. Alguns autors⁷ consideren que la troballa de silicona en el fetge d'aquests pacients és fortuïta i no guarda cap relació amb la patologia hepàtica del malalt. Altres autors,^{2,4,6,11} al contrari, creuen que la silicona podria ésser la causa de lesions hepàtiques d'aquests pacients o, almenys, afavoriria la perpetuació de lesions preexistents. En un estudi retrospectiu de setanta-vuit pacients amb insuficiència renal crònica i en programa d'hemodiàlisi, existia una relació estadísticament significativa entre el dipòsit hepàtic de silicona i les alteracions clíniques i/o bioquímiques hepàtiques.¹¹

En el nostre cas, la clínica que presentava el pacient, després de cada sessió d'hemodiàlisi, suggereix una reacció a substàncies exògenes amb febres, calfreds i malestar general. La desaparició d'aquesta clínica, en realitzar-se les sessions d'hemodiàlisi en aparells idèntics però sense tubs siliconats, ens indueix a pensar que les manifestacions clíniques del pacient podien ésser relacionades amb l'alliberament de partícules d'aquests tubs.

En la recerca de partícules de silicona en la biòpsia hepàtica del pacient utilitzarem un analitzador EDX acoblat a un microscopi electrònic de rastreig, perquè es tracta d'una tècnica molt útil en l'anàlisi de partícules inorgàniques en teixits humans.¹²

Malgrat que no poguem descartar amb absoluta seguretat que les lesions histològiques hepàtiques fossin secundàries a una infecció per virus no A no B, aquestes, normalment, no són associades a granulomes epitelioides. En el nostre cas, la identificació de partícules que contenen silici en el teixit hepàtic, juntament a lesions hepàtiques amb granulomes epitelioides, permet de suggerir que l'hepatopatia observada en aquest pacient podria ésser relacionada amb el dipòsit de silicona.

Aspectes parcials d'aquest treball foren publicats a la Revista «Medicina Clínica», Vol. 85, núm. 1, 1985, pàg. 25-27, Barcelona, amb el títol «Detección por análisis dispersivo de energía de rayos X de partículas de silicona en el hígado de un paciente en proceso de hemodiálisis».

¹² ABRAHAM, J. L. Biomedical microanalysis: Putting it to work now in diagnostic pathology. En: Om Johari ed. Scanning Electron Microscopy. Chicago. SEM Inc AMF O'Hare, 1983: 171-178.

IDENTIFICACIÓ D'OXALAT SÒDIC PER MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG (SEM), ANÀLISI DISPERSIVA D'ENERGIA DE RAIGS X (EDXA) I DIFRACCIÓ DE RAIGS X (XRD) EN FIBROSI PULMONAR

per

JOAN ROCA *, ADOLF TRAVERIA **, JOSEP M. TURA ***, JOSEP VILA *,
JAUME BORBON ***, MONTSERRAT MARSAL ****

* Hospital Infantil de Sant Joan de Déu. Barcelona. ** Institut Jaume Almera d'Investigacions Geològiques, CSIC, Barcelona. *** Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi (I.T.Q.T.) Centre d'Investigació i Desenvolupament, CSIC, Barcelona. **** Departament de Metallúrgia i Siderúrgia de la Universitat Politècnica de Catalunya.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans.

This paper is a part of the research programme N.º 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

IDENTIFICATION OF SODIUM OXALATE BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS AND X-RAY DIFFRACTION IN PULMONARY FIBROSIS

SUMMARY

A ten year old girl was subjected to diffuse interstitial protocol and when this failed to produce a diagnosis a surgical pulmonary biopsy was performed. In the histology crystalline birrefringent particles under polarized light were detected and pulmonary fibrosis was considered as the likely diagnosis. The pulmonary biopsy material was microanalysed to determine the chemical composition of the inorganic particles detected. The study was carried out using scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray analysis (EDXA) and X-ray diffraction (XRD). The results obtained and the analysis of the inorganic particles such as sodium oxalate and oxalic acid are discussed.

RESUM

Hom presenta un cas d'una noia de 10 anys d'edat a la qual hom procedí a aplicar el protocol de patró intersticial difús, sense aconseguir diagnòstic per mètodes no agressius, la qual cosa obligà a practicar biòpsia pulmonar a cel obert. A la histologia hom observà la presència de partícules cristal·lines les quals mostraren birefringència a la llum polaritzada i fou establert el diagnòstic de fibrosi pulmonar probablement reactiva a la presència de partícules d'origen desconegut. Posteriorment foren sotmeses les biòpsies pulmonars

a un estudi físic microanalític, per tal de determinar la composició química de les partícules inorgàniques observades.

Hom dugué a terme l'estudi mitjançant l'aplicació de la microscòpia electrònica de rastreig (SEM), l'anàlisi dispersiva d'energies de raigs X (EDXA) i la difracció de raigs X (XRD).

Hom comenta els resultats obtinguts, tot identificant analíticament i estructural com a oxalat sòdic i àcid oxàlic calcificats les partícules inorgàniques observades.

Paraules clau: Fibrosi pulmonar; oxalat sòdic; calcificacions pulmonars; SEM; EDXA, XRD.

Key words: Pulmonary fibrosis; sodium oxalate; pulmonary calcifications; SEM; EDXA; XRD.

1. *Introducció*

Es tracta d'una pacient femella de 10 anys d'edat sense antecedents d'interès, la malaltia de la qual s'inicià el mes de maig de 1979 amb l'aparició d'un quadre d'astènia i anorèxia de tres mesos d'evolució, que va ser tractat amb un preparat polivitamínic.

La pacient es manté asimptomàtica fins un any després (6 mesos abans de l'ingrés) en què reapareix el quadre d'astènia i anorèxia, a la qual s'hi afegeix un mes abans de l'ingrés, tos seca de predomini nocturn, dísnea, i s'objectiva una pèrdua de 8 Kg de pes. Davant l'agreujament de la dísnea, que dos dies abans de l'ingrés s'observa en situació de repòs, acudeixen al nostre centre.*

En el moment de l'ingrés s'observa una pacient conscient, ben orientada, amb una afectació important de l'estat general, «distress» respiratori amb tiratge subcostal i intercostal. Acropàquia a les mans i peus. Pell aspre amb zones descamatives i hiperpigmentades. Batec en punta visible. Freqüència respiratòria de 40 x'' i freqüència cardíaca de 130 x''. Pressió arterial de 13/7. En els primers dies d'estada a l'hospital presenta una hipertensió oscil·lant, taquicàrdia, taquípnea i «distress» respiratori. Davant la presència d'una pressió d'oxigen de 55 mm Hg, taquicàrdia de 220 x'' i pressió arterial de 14/12, als 17 dies del seu ingrés, és traslladada a la U.C.I., on és observada electrocardiogràficament una sobrecàrrega sistòlica i auscultatòriament un desdoblament del segon to; és diagnosticada de Cor Pulmonale.

Als 20 dies de l'ingrés s'efectua una biòpsia pulmonar, on radiològicament s'observa des del primer moment un patró intersticial difós, objectivant-se una fibrosi pulmonar important, granulomes epitelioides sense caseosi amb abundants cèl·lules gegants multinucleades de tipus cos estrany i la presència de cossos cristallins birefringents a la llum polaritzada (figura 1).

Davant el resultat de la biòpsia pulmonar s'inicia tractament amb alfa-metilprednisolona, a la dosi de 1,5 mg/Kg/dia, fent-se evident una lleugera milloria clínic-radiològica.

* Hospital Infantil de Sant Joan de Déu. Barcelona.

Dintre del «screening» analític realitzat per a l'estudi etiològic de la hipertensió ens trobem amb els resultats de Renina i Aldosterona molt alts, per la qual cosa iniciem tractament amb Captopril a dosi de 1,5 mg/Kg/dia, aconseguint controlar la pressió arterial.

Dels estudis efectuats cal destacar que no es trobaren altres alteracions del funcionalisme renal ni augment de l'eliminació urinària d'aminoàcids o oxalats i que fora de les xifres elevades de glòbuls rojos i les alteracions dels gasos, pròpies del Cor Pulmonale, la resta dels estudis resultaren així mateix negatius i cal només remarcar l'existència d'una hipergammaglobulinèmia (20,5 %) que amb petites oscil·lacions es mantingué de forma persistent fins al final.

El diagnòstic que s'establí fou de Fibrosi Pulmonar probablement reactiva a la inhalació de partícules d'origen desconegut i que motivaren el posterior estudi cristal·logràfic i microanalític per mètodes físics.

Després dels quatre primers mesos es comprovà una normalització permanent de la tensió arterial, que permeté la retirada del tractament hipotensor. El quadre clínic també s'estabilitza, desapareix la dificultat respiratòria i milloren les proves funcionals ventilatòries que se situen en els límits inferiors per a l'edat. Malgrat tot, en el primer intent de rebaixar les dosis de corticoides i en arribar als 0,35 mg/Kg reapareix la disnea d'esforç, que obliga a una retirada molt més lenta que és aquest cop millor tolerada, permetent-li portar una vida normal. El control efectuat per nosaltres es perllonga fins al febrer de 1984, sense haver retirat del tot el tractament amb metil-prednisolona, essent la dosi en aquell moment de 0,1 mg/Kg. Totes les propostes per portar a terme un estudi biòptic del ronyó van ser refusades per la família que només permeté un control analític i radiològic en règim ambulatori, que van fer possible comprovar la persistència de la poliglobúlia i del patró radiològic de fibrosi pulmonar malgrat el bon estat clínic de la malalta.

Posteriorment a aquesta data sabem que va presentar un empitjorament brusc suposadament d'origen infecciós, que l'obligà d'ingressar en un altre centre on va morir als pocs dies de l'ingrés. D'aquest episodi final no disposem d'altres dades que les esmentades.

2. Tècniques SEM i EDXA

El material de la biòpsia un cop dessecat per la tècnica coneguda com a «punt crític»¹ fou adherit amb albúmina de Mayer a un portamostres de grafit i recobert amb una capa de carbó polvoritzat, a fi de poder ser observades amb un SEM Philips 500 equipat amb microanalitzador EDAX.

¹ FROMME, H. G., PFEFFERKORN, G., PFAUTSCH, M., BYSTRICKY, V., *Erfahrungen mit der «Kritischen Punkt» - Trocknung als Preparationsmethode für die Raster-Elektronenmikroskopie*. Beitr. Elektronenmikroskop. Direkabb. Obert. 1972: 5, 893.

L'observació de la biòpsia per SEM permeté localitzar una zona, prop dels bronquïols on aparegueren conglomerats que no pogueren ser identificats morfològicament (figures 2 i 3).

Hom dugué a terme una anàlisi global EDAX de la superfície de la figura 3 a un voltatge de 25 KV, temps d'anàlisi de 100 s i diàmetre de spot d'electrons de 0,125 µm.

Sota les anteriors condicions foren detectats P, S, K, Ca i Fe. Amb tot, l'únic element que donà un «mapping» significatiu fou el Ca (figura 4).

Amb la finalitat de poder estudiar els conglomerats més detalladament, hom eliminà el teixit orgànic amb potassa i posterior centrifugació. La figura 5 presenta un conjunt de cristalls a 2.500 augments, on hom hi pot apreciar clarament formes cristallines. A la figura 6 hom pot observar l'anàlisi lineal corresponent al calci del conjunt de cristalls de la figura anterior.

3. Difracció de raigs X

Tan bon punt eliminada la matèria orgànica per acció de potassa, la resta de la preparació fou estudiada mitjançant una cambra marca Nonius tipus Guinier de Wolff amb monocromador de quars.

Una vegada eliminades del diagrama G-292-III les línies corresponents al carbonat potàssic format per acció del diòxid de carboni de l'aire, en resten les disposades a la taula 1.

4. Resultats

La interpretació del diagrama G-292-III de la taula 1 s'ajusta relativament bé amb l'oxalat sòdic $[\text{Na}_2(\text{COO})_2]$ el qual domina sobre la presència d'àcid oxàlic $[(\text{COO})_2\text{H}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, espècies ambdues que en certa manera es confirmen mútuament.

Aquesta interpretació fou rebutjada fins que tinguérem esment del treball «*Oxalate bodies*», *another reaction of the human lung to asbestos inhalation?*² els autors del qual afirmen que només hi ha una cita de l'aparició d'espècies calciques³ en aquest tipus tissular.

El pic a 7,15Å, correspon a la màxima intensitat (001) de la kaolinita, però rebutgem aquesta interpretació ja que no és raonable pensar en la presència de

² DE VUYST, P., JEDWAB, J., ROBIENCE, Y., YERNAULT, J. C. «*Oxalate bodies*», *another reaction of the human lung to asbestos inhalation?* Eur. J. Respir. Dis. 1982: 63, 543-549.

³ LE BOUFFANT, L., BRUYÈRE, S., MARTIN, J. C., TICHOUX, G., NORMAND, C. *Quelques observations sur les fibres d'amiante et les formations minérales diverses rencontrées dans les poumons asbestosiques.* Rev. Fr. Mal. Respir. 1976: 4: 121-140.

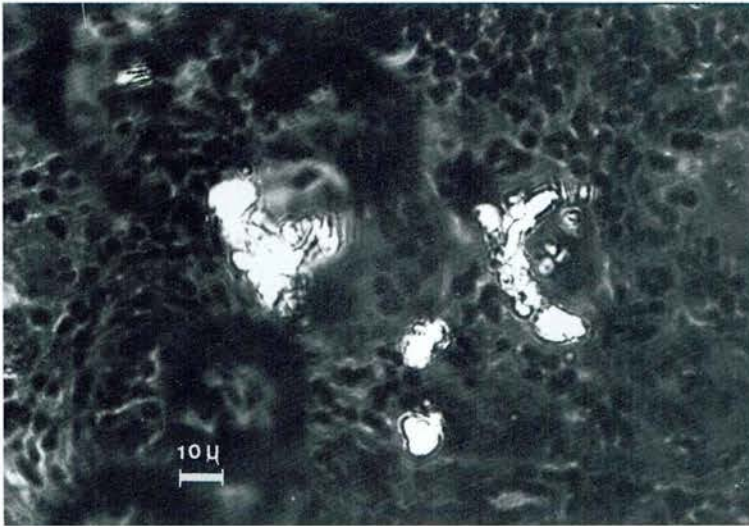


Fig. 1. - Biòpsia pulmonar. Cossos cristallins birefringents a la llum polaritzada. Marques: 10 μm (x 70).

Fig. 1. - Pulmonary biopsy. Birefringent crystalline bodies under polarized light. Markers: 10 μm (x 70).



Fig. 2. - Biòpsia pulmonar. Imatge per electrons secundaris en un SEM. A la part esquerra hom hi pot apreciar un conducte alveolar; a la part central bronquíols respiratoris; a la part dreta i inferior apareixen conglomerats de microcalcificacions que inclouen els microcristalls. Marques: 10 μm (x 1.611).

Fig. 2. - Secondary electron image of a lung biopsy in a SEM. Left side: an alveolar duct. Central and right side: calcified conglomerates containing oxalate microcrystals. Markers: 10 μm (x 1.611).



Fig. 3. - Imatge per electrons secundaris de la biòpsia. A la part superior esquerra hom aprecia bronquíols respiratoris, a la dreta dels quals hi ha les microcalcificacions. Marques: 10 μm (x 550).

Fig. 3. - Lung biopsy scanning electron photomicrograph. Respiratory bronchiols can be observed upper left side. The microcalcifications appear next to them on the right. Markers: 10 μm (x 550).



Fig. 4. - Mapping de la figura anterior corresponent al calci.

Fig. 4. - Ca mapping corresponding to the same field as the upper figure.



Fig. 5. - Imatge per electrons secundaris d'un conjunt de cristalls.
Marques: 1 μm (x 2.500).

Fig. 5. - Scanning photomicrograph of a crystalline cluster.
Markers: 1 μm (x 2.500).

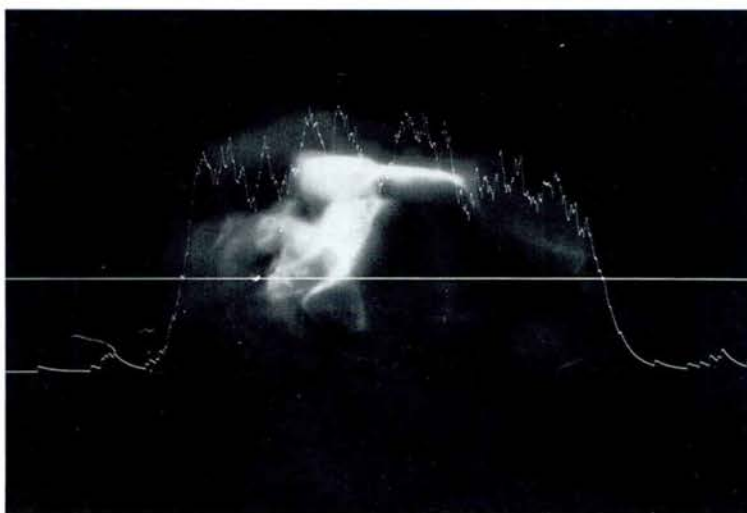


Fig. 6. - Anàlisi lineal de la zona indicada, corresponent al conjunt de cristalls de la figura anterior. Resposta del calci (x 2.500).

Fig. 6. - Ca line mapping corresponding to the same field as the upper figure.
(x 2.500).

tal espècie en un teixit pulmonar, fet corroborat perquè no ha estat determinat el Si en l'anàlisi EDX.

T A U L A 1

| Diagrama G-292 - III Diagram G-292 - III | | | J.C.P.D.S. 20 - 1149 | | J.C.P.D.S. 20 - 1817 | |
|---|-------|-----|---|-----|---|-----|
| Línia Núm. | dÅ | I | dÅ | I | dÅ | I |
| 1 | 7,15 | ww | | | 3,84 | 100 |
| 2 | 2,844 | m | 2,895 | 35 | | |
| 3 | 2,832 | m | 2,825 | 100 | | |
| 4 | 2,615 | s | 2,600 | 55 | | |
| 5 | 2,566 | www | | | 2,59 | 70 |
| 6 | 2,400 | ww | | | 2,44 | 60 |
| 7 | 2,284 | vs | 2,330 | 45 | | |
| 8 | 2,215 | s | 2,176 | 18 | | |
| 9 | 1,976 | www | 1,979 | 2 | | |
| 10 | 1,969 | ww | 1,966 | 8 | | |
| | | | Na ₂ C ₂ O ₄ oxalat sòdic | | β (CO ₂ H) ₂ àcid oxàlic | |

Diagrama de difracció de raigs X de la biòpsia i de les fitxes estàndard indicades

Biopsy and standard cards X-ray diffraction diagrams

Abreviacions / Abbreviations:

dÅ: Distància en àngstroms/Distance in Angstroms

I: Intensitat/Intensity (w: weak; m: medium; s: strong; vs: very strong)

J.C.P.D.S.: Joint Committee of powder diffraction standard

5. Discussió

L'anàlisi EDX dels conglomerats demostrà la presència de Ca, el qual deu tenir una natura amorfa, ja que sinó hagués estat detectada la sal corresponent d'aquest element per difracció de raigs X. En canvi, el Na no fou detectat per EDX probablement perquè el feix d'electrons no pogué travessar la calcificació envoltant. Cal tenir en compte que el poder de penetració dels electrons a 25 KeV és de l'ordre d'una micra.⁴

⁴ OATLEY, C. W. *The Scanning Electron Microscope. Part 1 The instrument.* 1972: Cambridge University Press.

Davant el fet que no ha estat trobada una alteració dins el metabolisme dels oxalats que justifiqués un dipòsit abundant d'aquesta substància, ni cap font d'aquests cristalls en l'entorn ambiental de la malalta, malgrat es va filtrar l'aire en el seu domicili amb un captador de baix volum que permeté captar partícules de més de 0,8 μm de diàmetre, atribuïm la presència dels oxalats a una reacció inespecífica sobre un òrgan prèviament afectat per una causa desconeguda. La presència d'oxalats ja ha estat trobada en altres casos, encara que és més freqüent la forma de sal càlcica.^{5, 6, 7, 8}

Agraïments

Els autors agraeixen als Drs. J. W. Visser i Ch. Citroën del Technisch Physische Dients T.N.O. T.H. de Delft, al Dr. B. Koch de l'Institut Van't Hoff de la Universitat d'Amsterdam, al Dr. M. Font i Altaba de la Facultat de Geologia de la Universitat de Barcelona i al Dr. R. Forestier del Dep. de Raigs X de Jobin-Yvon, de Long Jumeau la seva amable assistència i els seus valuosos comentaris durant la realització d'aquest treball.

ADDENDA

Aspectes parcials d'aquest treball han estat lliurats a la revista «European Journal of Respiratory diseases», Estocolm (Suècia), amb el títol «Sodic oxalate in pulmonary fibrosis», en premsa. També foren presentats a la XX Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física, celebrada a Sitges el mes de setembre de 1985.

⁵ BENNINGTON, J. L., HABER, S. L., SMITH, J. V., WARNER, N. E., *Crystals of calcium oxalate in human kidney: studies by means of electronmicroprobe and X-Ray diffraction.* 1964: Am J. Clin. Pathol. 41: 8.

⁶ GROSS, S., *Granulomatous thyroiditis with anisotropic crystalline material.* 1955: Ach. patol. 59: 412.

⁷ GLYNN, L. E. *Crystalline Bodies in tunica media of middle cerebral artery* 1940: J. Pathol. Bact. 51: 445.

⁸ HIBBARD, E., WILLIAMS LLOYD, H., SMITH, J. R. «Primary Hy per oxalunia». En J. B. Stanbury *et als.* «The metabolic Basis of Inherited Disease». Fifth Edition; Mc. Graw-Hill Book Company New-York 1983: 204-228.

MICROSTRUCTURA I MICROANÀLISI DE CÀLCULS BILIARS PER MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG, ANÀLISI DISPERSIVA D'ENERGIES DE RAIGS X I DIFRACCIÓ DE RAIGS X

per

EMILI ROS *, JOSEP M. TURA **, ADOLF TRAVERIA ***,
MERCÈ DURFORT ****, JOAN RODÉS *, JOSEP M. RIBÓ *****
IRENE FERNÁNDEZ *****, MONTSERRAT MARSAL *****

* Unitat d'Hepatologia. Hospital Clínic i Provincial. Universitat de Barcelona. ** Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi. I.T.Q.T. Consell Superior d'Investigacions Científiques. *** Institut Jaume Almera. Consell Superior d'Investigacions Científiques. **** Departament de Morfologia Microscòpica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. ***** Departament de Química Orgànica. Facultat de Química. Universitat de Barcelona. ***** Departament de Metallúrgia i Siderúrgia. Universitat Politècnica de Catalunya.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans, carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona.

This paper is part of programme number 2213 of the Sciences Section of the Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.

GALLSTONES IDENTIFIED BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, ENERGY DISPERSIVE X-RAY ANALYSIS AND X RAY DIFFRACTION (XRD)

SUMMARY

SEM and EDXA were applied to cholesterol gallstones to study the morphology and analyse the relationship between the formations which are rich in calcium and cholesterol, the substance forming the stones. The crust surrounding the gallstones as well as the microcrystals in suspension in the bile from patients with cholelithiasis were studied. The gallstones unsuccessfully treated with ursodeoxycholic acid (UDCA) were examined. XRD was used to determine the crystallographic structure of the gallstones.

RESUM

La utilització conjunta de SEM i EDXA en la investigació de càlculs biliars de colesterol serví en aquest treball per a l'estudi morfològic i analític de les relacions d'acoblament entre estructures riques en calci i la substància que constitueix la concreció, en aquest cas el colesterol. Hom ha observat la natura de l'escorça formada al voltant d'alguns càlculs, així com la natura de microcristalls en suspensió en la bilis de malalts litíasis. Hom ha estudiat, finalment, la natura dels càlculs que han estat tractats amb àcid ursodesoxicòlic (AUDC) en els quals la teràpia de dissolució fallà. L'estructura cristal·logràfica dels càlculs ha estat determinada per XRD.

Paraules clau: Càlculs biliars; vaterita; calcita; colesterol; Microscòpia Electrònica de rastreig; Difracció de raigs X; Anàlisi dispersiva d'energies de raigs X.

Key words: Biliary calculi; vaterite; calcite; cholesterol; Scanning Electron Microscopy; X-ray diffraction; Energy dispersive X-ray analysis.

1. Introducció

Hi ha dues classes químiques principals de càlculs biliars: pigmentaris i de colesterol. Els primers tenen llur origen en una anomalia del metabolisme de la bilirubina,¹ mentre que els segons són causats per alteracions del metabolisme de les sals biliars i del colesterol.² Ambdós tipus de càlculs són compostos de substàncies virtualment insolubles en aigua. Els càlculs pigmentaris contenen quantitats apreciables de bilirubinat càlcic, mentre que els de colesterol estan formats majoritàriament per cristalls d'aquest lípid. En les poblacions occidentals predominen els càlculs de colesterol (75 % vs 25 % de càlculs pigmentaris).³ En aquest treball ens referirem només a càlculs de colesterol.

Com que la formació de càlculs biliars depèn de l'existència en la bilis de substàncies poc solubles i de la precipitació d'aquestes quan la concentració excedeix el límit de solubilitat màxima, la saturació de la bilis és el primer requisit per al desenvolupament de la colelitiasi.

La bilis és una solució aquosa que conté al voltant d'un 10 % de sòlids (bilis vesicular). La proporció principal de sòlids és formada pels lípids biliars: sals biliars, lecitina i colesterol no esterificat. Quan en la bilis hi ha un excés de colesterol en relació amb les concentracions relatives de sals biliars i de lecitina, les micelles es troben sobresaturades en colesterol i llavors són donades les condicions perquè aquest precipiti de la solució.^{4 i 5} Bàsicament el fetge produeix bilis sobresaturada de colesterol a través de dos mecanismes que, en molts casos, probablement, coexisteixen: ^{6 i 7} a) disminució de la secreció biliar de sals biliars, i b) augment de la secreció biliar de colesterol.

Quan ja hi ha la bilis sobresaturada, el segon requisit per a la formació de

¹ SOLOWAY, R. D., TROTMAN, B. W., OSTROW, J. D.: *Pigment Gallstones*. Gastroenterology (1977), 72, 167-182.

² REDINGER, R. N., SMALL, D. M.: *Bile Composition, bile salt metabolism and gallstones*. Arch. Intern. Med. (1972), 130, 618-630.

³ TROTMAN, B. W., SOLOWAY, R. D.: *Pigment vs. cholesterol cholelithiasis. Comparison of stone and bile composition*. Am. J. Dig. Dis. (1974), 19, 585-590.

⁴ ASMIRAND, W. H., SMALL, D. M.: *The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man*. J. Clin. Invest. (1968), 1043-1052.

⁵ CAREY, M. C., SMALL, D. M.: *The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man*. J. Clin. Invest. (1978), 61, 998-1026.

⁶ ROS, E.: *Colelitiasis de colesterol*. Gastroenterología y Hepatología. 1978, 1, 98-106.

⁷ SMALL, D. M.: *Cholesterol nucleation and growth in gallstone formation*. N. Engl. J. Med. (1980), 302, 1305-1307.

càlculs és la precipitació del compost insoluble, amb nucleació i creixement subsegüent fins a formar càlculs macroscòpics. La sobresaturació de la vesícula biliar en composts de calci (principalment en forma de carbonats, i menys freqüentment en forma de fosfats o de palmitats càlcics) pot conduir a la creació de sediments i de concrecions, però també a la calcificació de càlculs ja existents.⁸ El present treball pretén d'aprofundir en l'estudi de les relacions d'acoblament entre aquestes estructures riques en calci i el colesterol (substància aquesta majoritària i bàsicament constitutiva de la concreció). Hom estudia també els nuclis dels càlculs i el creixement d'aquests fins a formar concrecions macroscòpiques.

Des de fa uns anys⁹ hom ha establert la possibilitat de disgregació de càlculs de colesterol mitjançant el tractament d'àcid quenodesoxicòlic i d'àcid ursodesoxicòlic (AUDC). La presència de carbonat càlcic en els càlculs de colesterol sembla la raó principal de la limitació de l'eficàcia terapèutica del tractament amb aquests àcids.

La bilis de pacients amb càlculs biliars presenta sovint sòlids microcristal·lins que poden ésser tractats per microscòpia de polarització. La identificació, mitjançant tècniques físiques, de l'estructura i de la composició elemental d'aquests microcristalls pot ajudar a predir la composició dels càlculs biliars dels pacients i a predeterminar el resultat de la teràpia de la dissolució.

2. Material i mètodes

2.1. Anàlisi dels microcristalls de la bilis

La bilis, obtinguda mitjançant sondatge duodenal de malalts amb litiasi biliar, fou sotmesa a centrifugació amb la finalitat de decantar-ne els microcristalls en suspensió. La morfologia i l'anàlisi elemental dels microcristalls foren establerts amb un microscopi electrònic de rastreig (SEM) Philipps 500 equipat amb un analitzador dispersiu d'energies de raigs X EDAX. L'estructura cristal·lina dels microcristalls fou determinada per difracció de raigs X (XRD) amb una cambra Nonius tipus Guinier de Wolff equipada amb un monocromador de quars.

2.2. Anàlisi dels càlculs de colesterol

La investigació de la superfície externa i de la superfície de zones de fractura de càlculs biliars de composició majoritària de colesterol (> 80 %) aconseguits mitjançant una operació quirúrgica, fou realitzada amb un microscopi

⁸ WOSIEWITZ, U., WOLPERS, C., *Calcium in Kalkgallen und Gallensteinen*. L.D.M. (1975), 5 (1), 3.

⁹ MAKINO, I., SHINOZAKI, H., YOSHINO, H., *et al.*: *Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid*. Japan J., Gastroenterol (1975), 72, 690-702.

electrònic de rastreig Philipps 500 equipat amb un analitzador dispersiu d'energies de raigs X EDAX. La metal·lització de les mostres amb or o bé amb grafit fou realitzada amb un ombrejador Polaron. L'estructura dels càlculs fou establerta per difracció de raigs X (XRD) amb una cambra Nonius tipus Guinier equipada amb un monocromador de quars i també, paral·lelament, per espectroscòpia d'infraroigs (IR).

2.3. Casos clínics estudiats

El nombre total de pacients estudiats fou de 105. El nombre total de càlculs analitzats fou de 108, dels quals 88 foren de colesterol, 17 pigmentaris i 3 sense classificar. Els percentatges foren, per tant, de 82 % de càlculs de colesterol, 16 % de càlculs pigmentaris i 2 % de càlculs sense classificar. Tal com ha estat dit abans, en el present treball només donarem els resultats obtinguts amb els càlculs de colesterol. L'estudi de càlculs pigmentaris formarà part d'una futura publicació. Segons R. D. SOLOWAY, B. W. TROTMAN i J. D. OSTROW,¹⁰ hom pot classificar els càlculs de colesterol en purs, mixtos i combinats. Els purs només contenen colesterol; els mixtos contenen colesterol, pigments biliars i CaCO₃; els combinats contenen bandes de colesterol pur i bandes de colesterol mixtes. Els 88 casos de colesterol estudiats en aquest treball es repartien, segons aquesta classificació, en els percentatges següents: 68,2 % purs; 27,3 % mixtos; 4,5 % combinats.

D'altra banda hom estudià també els càlculs de malalts sotmesos a tractament amb àcid ursodesoxicòlic en els quals la teràpia fracassà.

3. Resultats i discussió

3.1. Tipus d'elements microcristal·lins a la bilis

Els microcristalls foren recuperats de la bilis, i hom en pogué observar la presència de dues classes: *crystals de colesterol* (figura 1), recentment coneguts com a associats a càlculs biliars de colesterol,¹¹ i microsfèrules de carbonat càlcic (figura 2). La difracció de raigs X ha permès la identificació d'aquestes microsfèrules com a vaterita, que és una forma polimòrfica del carbonat càlcic. Una bilis que presenta aquest tipus de microsfèrules és denominada «bilis càlcica». Les microsfèrules es poden agrupar en unitats més grosses gràcies a l'acció conjunta del moc (figura 3).

¹⁰ SOLOWAY, R. D., TROTMAN, B. W., OSTROW, J. D., *Gastroenterology* (1977), 72, 167-182.

¹¹ ROS, E.: Servei de Gastroenterologia. Hospital Clínic de Barcelona. Comunicació personal.

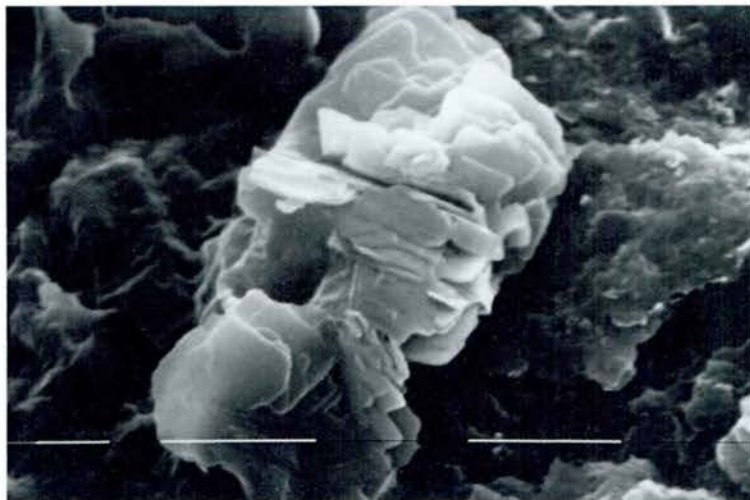


Fig. 1. - Conjunt de microcristalls de colesterol presents en bilis vesicular.
 Marques: 10 μm (x 2.500).

Fig. 1. - Cluster of cholesterol microcrystals from the bile.
 Markers: 10 μm (x 2.500).

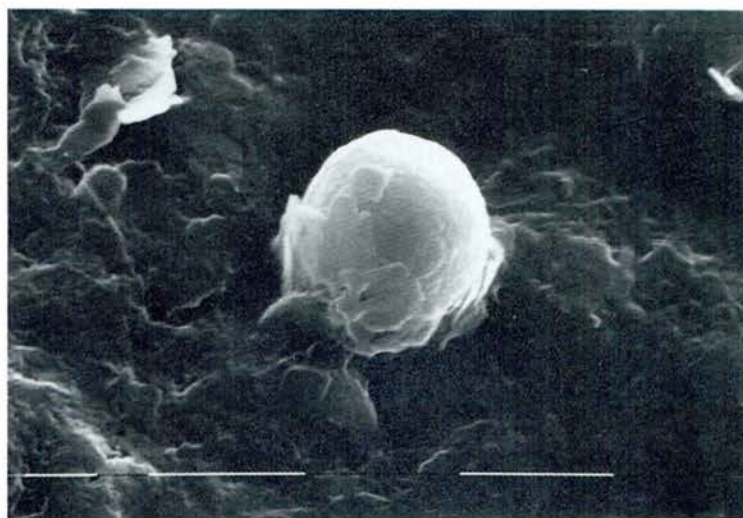


Fig. 2. - Imatge per microscòpia electrònica de rastreig; electrons secundaris. Esfèrula de carbonat càlcic procedent de la bilis. Marques: 10 μm (x 2.500).

Fig. 2. - SEM secondary electron image. Calcium carbonate microspheroid from the bile. Markers: 10 μm (x 2.500).

3.2. Nucli i creixement dels càlculs de colesterol

Segons U. WOSIEWITZ¹² els càlculs on el carbonat càlcic o bé el fosfat càlcic són majoritaris (> 80 %) estan formats per aglomeracions de microfèrules lligades entre elles que s'acumulen fins a esdevenir càlculs macroscòpics. En els casos estudiats per nosaltres no ha estat observada una acumulació tan densa de microfèrules de vaterita, sinó que aquestes, individualitzades o bé unes poques agrupades, es troben envoltades de cristalls de colesterol.

En la major part dels càlculs hom observà la presència de carbonat càlcic en la part central; les figures 4, 5, 6, 7, 8 i 9 corresponen a conjunts d'esfèrules de vaterita localitzats en aquesta zona central. El colesterol precipita damunt aquest agent nucleador inicial i així s'originen càlculs macroscòpics radiotransparents. Els «mappings» de $K\alpha$ del Ca indiquen clarament la localització de la vaterita. Hom pot apreciar que la mida de les esfèrules oscil·la entre 5 micres i 60.

No pot ésser exclosa la presència de sals càlciques d'àcids grassos en petites concentracions, encara que no siguin detectables per I. R. per causa de la poca sensibilitat del mètode, deguda a la superposició de bandes d'aquestes sals amb les del colesterol. Per exemple, la figura 10 mostra uns cristalls que presenten una morfologia característica i donen resposta al calci, els quals, segons U. WOSIEWITZ¹² són de palmitat càlcic. La figura 11 mostra la part central d'un càlcul en què hom pot observar simultàniament la presència de vaterita (A), cristalls de colesterol (B) i cristalls de palmitat càlcic (C).

3.3. Formes de calcificació secundària. Calcificació de concrecions

El creixement dels càlculs de colesterol al qual hem fet referència a l'apartat anterior no té lloc d'una manera uniforme al llarg del temps, sinó que és un procés que es pot alentir o bé interrompre bruscament. Les sals càlciques, principalment el carbonat càlcic, poden continuar precipitant damunt els càlculs de colesterol en formació, aprofitant un interval d'estancament en la precipitació del lípid. En un principi, la superfície de colesterol només estarà recoberta parcialment amb $CaCO_3$ (figures 12 a 15). Segons el grau de sobresaturació de la bilis en sals càlciques i la durada d'aquest estat, els càlculs poden quedar embolcallats completament per una escorça (figures 16 a 20). El gruix de la crosta depèn de l'interval en què precipita el carbonat càlcic (uns 30 μm a la figura 16 i uns 100 μm a la figura 19). La figura 21 mostra un càlcul fracturat en dues parts. La zona externa és indicada per A i la zona interna per C. El mapping de Ca de la part exterior és indicat a la figura 21 - B. Hom pot observar en el mapping del calci corresponent a la part interna del càlcul (figura 21 - D) dues calcificacions concèntriques separades per una zona de precipitació de colesterol.

¹² WOSIEWITZ, U.: *Nachweis und Lokalisation Ca-haltiger Strukturen in Gallensteinen mit REM/RMA*. Beitr. Elektronenmikroskop. Direktabb. (1975), 8, 177-186.



Fig. 3. - Conjunt de microsferules de carbonat càlcic present en bilis vesicular.
 Marques: 10 μm (x 1.250).

Fig. 3. - Cluster of calcium carbonate microspheroids from the bile.
 Markers: 10 μm (x 1.250).

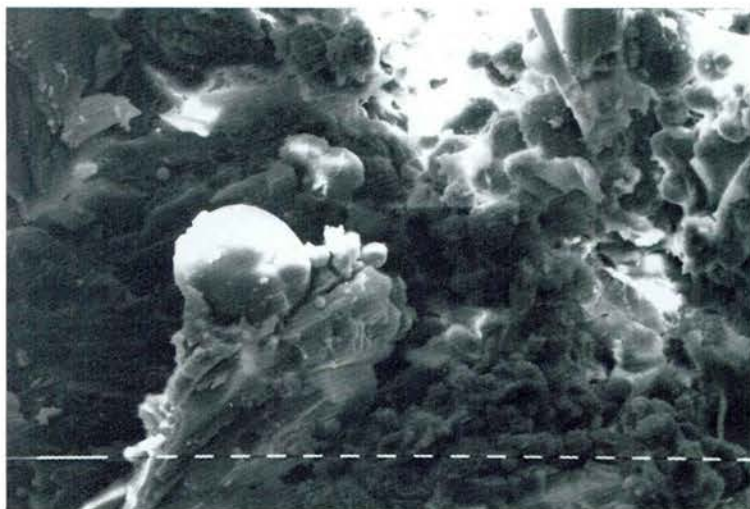


Fig. 4. - Imatge per electrons secundaris de la part central d'un càlcul. Hom hi pot observar esfèrules de vaterita de diverses mides. Marques: 10 μm (x 320).

Fig. 4. - Central part of a cholesterol gallstone. Vaterite microspheroids of various sizes can be observed. Markers: 10 μm (x 320).

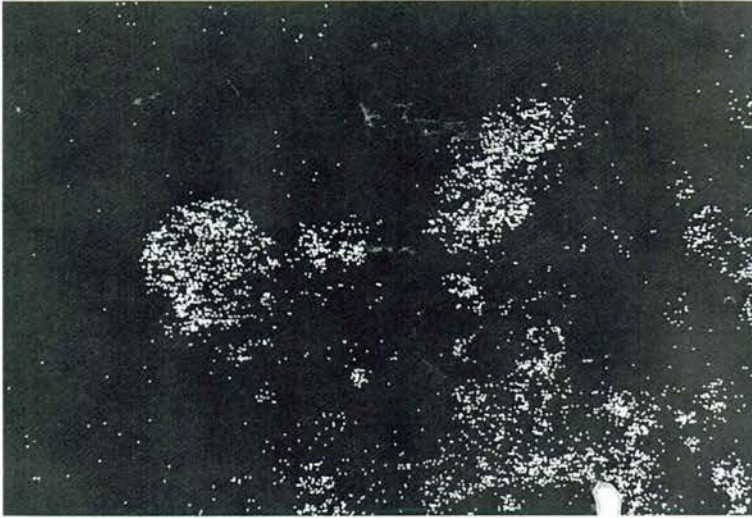


Fig. 5. - Mapping de Ca de la mateixa zona de la figura anterior.

Fig. 5. - Ca mapping corresponding to the same field as in the above figure.

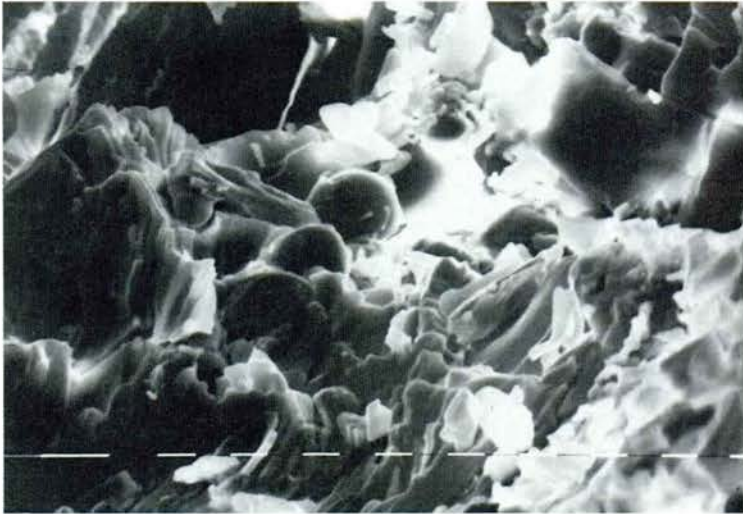


Fig. 6. - Imatge per microscòpia electrònica de rastreig; electrons secundaris. Presència d'esfèrules de carbonat càlcic a l'interior d'un càlcul del mateix cas de la figura 2.

Marques: 10 μm (x 640).

Fig. 6. - SEM secondary electron image. Calcium carbonate microspheroids detected inside a mechanically fractured gallstone. This refers to the case illustrated in Fig 2.

Markers: 10 μm . (x 640).

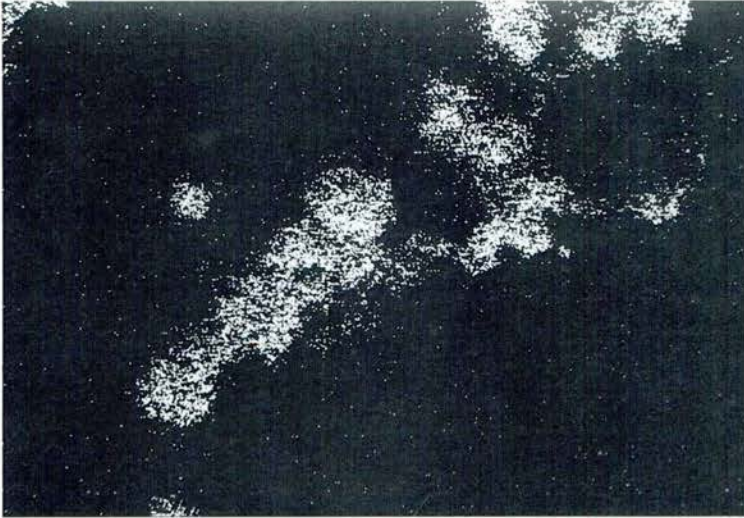


Fig. 7. - EDX «Mapping» Ca ($K\alpha = 3,69$ KeV) de la mateixa zona de la figura anterior (x 640).

Fig. 7. - EDX «mapping» of Ca ($K\alpha = 3,69$ KeV) of the same zone as in the above figure (x 640).

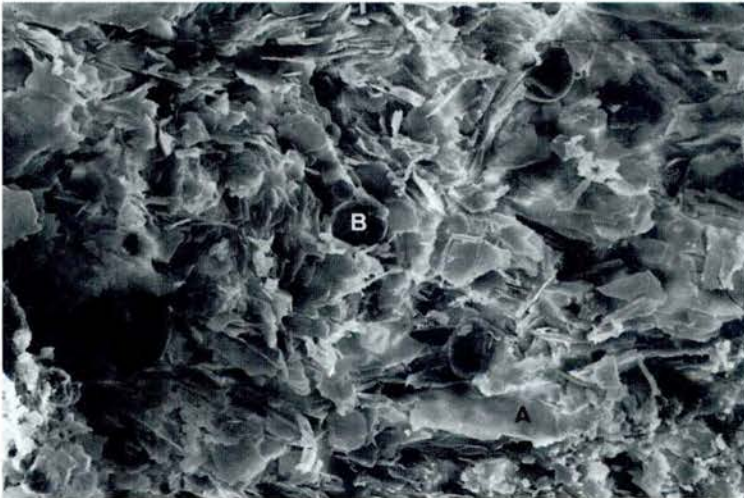


Fig. 8. - Part central d'un càlcul de colesterol. Hom pot apreciar els cristalls de colesterol majoritaris (A), que envolten les esfèrules de vaterita (B). Marques: $10\ \mu\text{m}$ (x 320).

Fig. 8. - Cholesterol gallstones central part. The majority of cholesterol crystals (A) surround vaterite (B) microspheroids. Markers: $10\ \mu\text{m}$ (x 320).

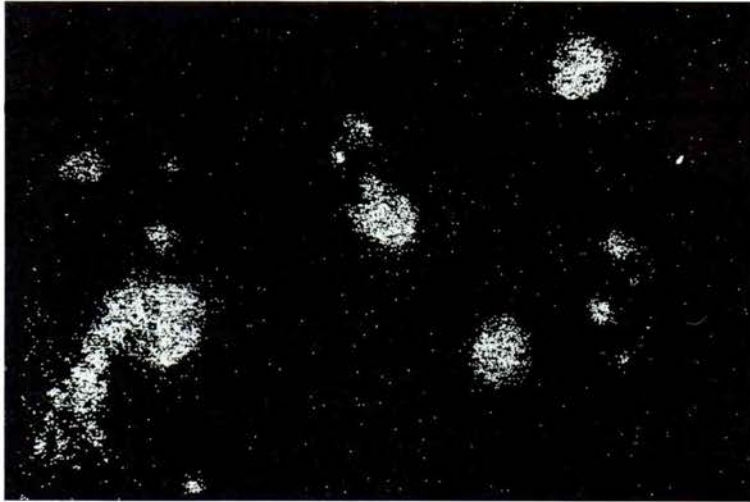


Fig. 9. - Mapping de Ca de la mateixa zona de la figura anterior.

Fig. 9. - Ca mapping of the same zone as in figure 8.

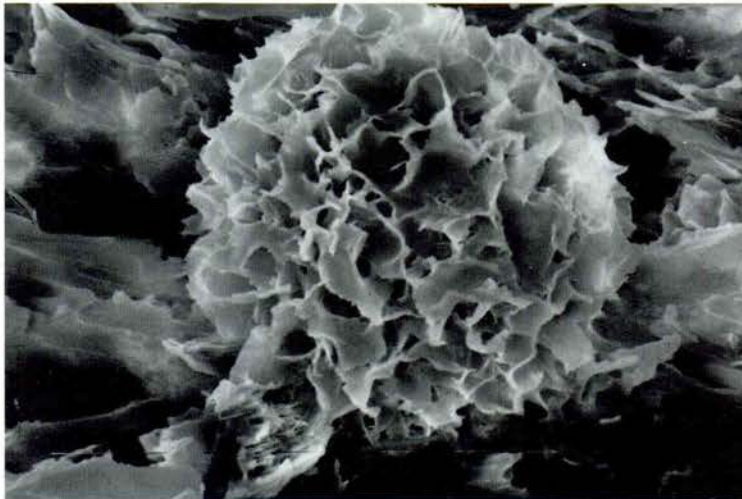


Fig. 10. - Cristalls de palmitat càlcic. Marques: 10 μm (x 320).

Fig. 10. - Calcium palmitate crystals. Markers: 10 μm (x 320).

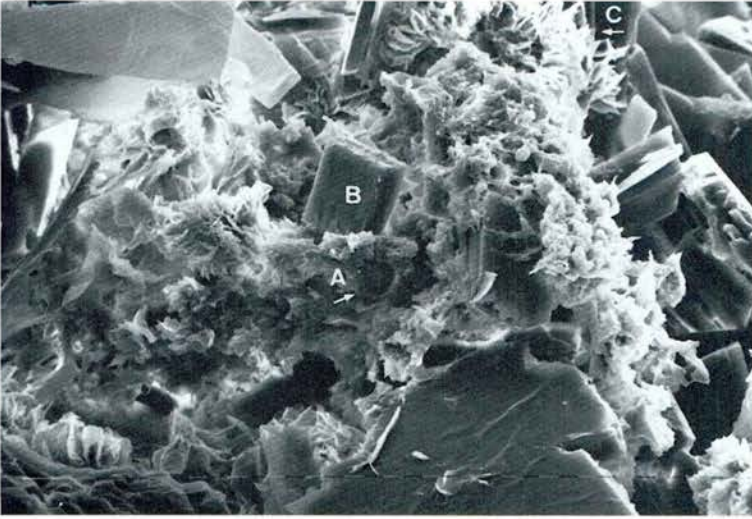


Fig. 11. - Zona central d'un càlcul de colesterol (A) Esfèrula de vaterita. (B) Cristall de colesterol. (C) Cristalls de palmitat càlcic. Marques: 10 μm (x 320).

Fig. 11. - Central zone of a cholesterol gallstone. (A) Vaterite microspheroid. (B) Cholesterol crystal. (C) Calcium palmitate crystals. Markers: 10 μm (x320).



Fig. 12. - Superfície externa d'un càlcul biliar de colesterol, en la qual hom pot observar una escorça de carbonat càlcic en formació. Marques: 10 μm (x 640).

Figure 12. - External surface of a cholesterol gallstone, around which a calcium carbonate crust was forming. Markers: 10 μm (x 640).

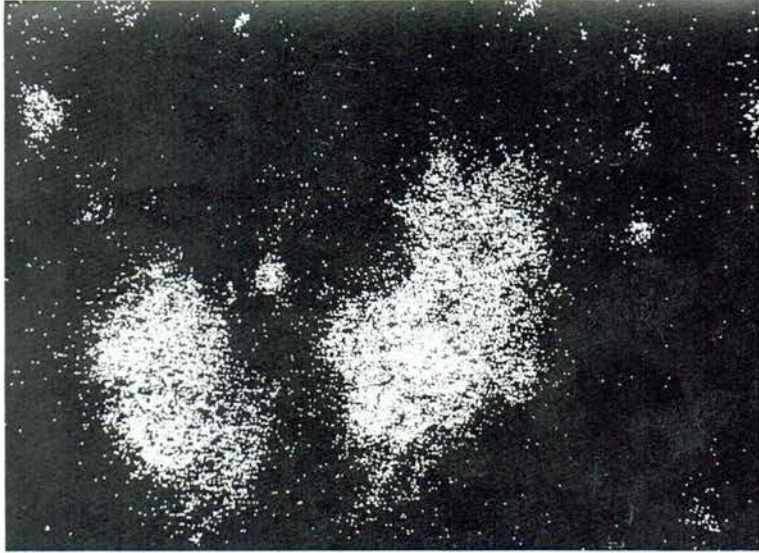


Fig. 13. - Mapping corresponent al Ca de la mateixa zona de la figura anterior.

Fig. 13. - Ca mapping corresponding to the same zone as the above figure.

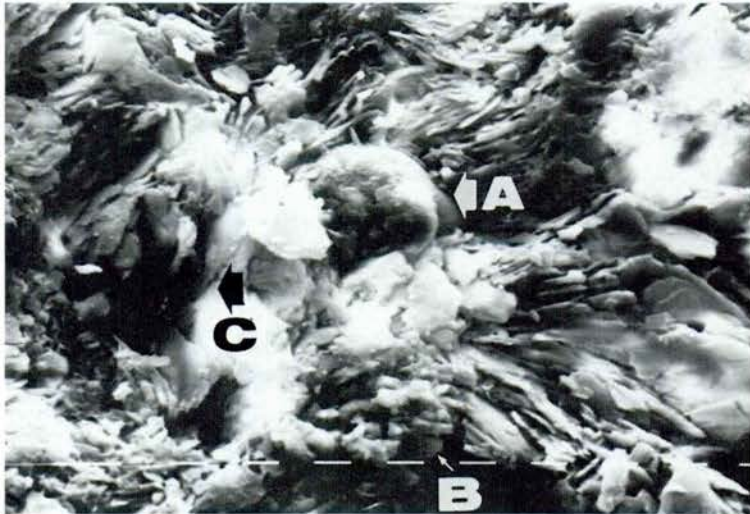


Fig. 14. - Superfície externa de càlcul de colesterol sotmès a l'acció d'AUDC. Hom pot apreciar-hi vaterita (A) i altres carbonats càlcics (B i C) emergint d'entre cristalls de colesterol. Marques: 10 μm (x 640).

Fig. 14. - External surface of a cholesterol gallstone treated with UDCA. Vaterite (A) and other calcium carbonates (B) and (C) emerging from cholesterol crystals can be observed. Markers: 10 μm (x 640).

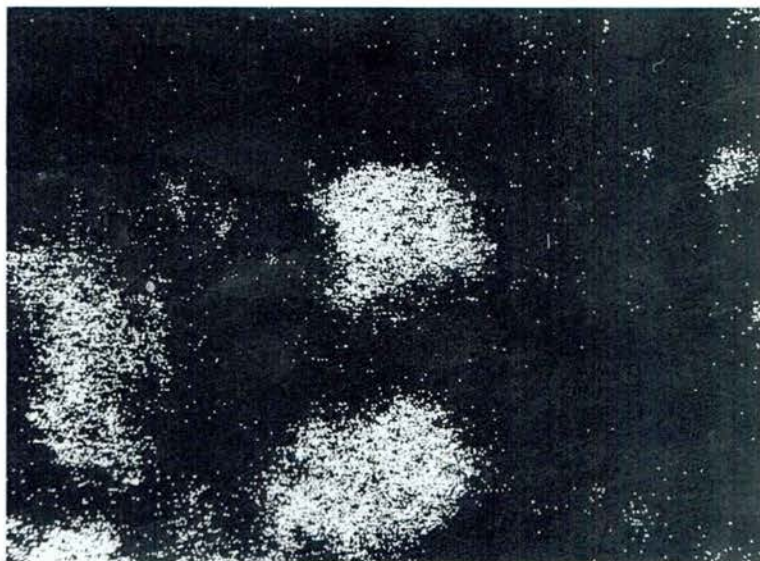


Fig. 15. - Mapping de Ca de la mateixa zona de la figura anterior.

Fig. 15. - Ca mapping corresponding to the same zone as in the above figure.

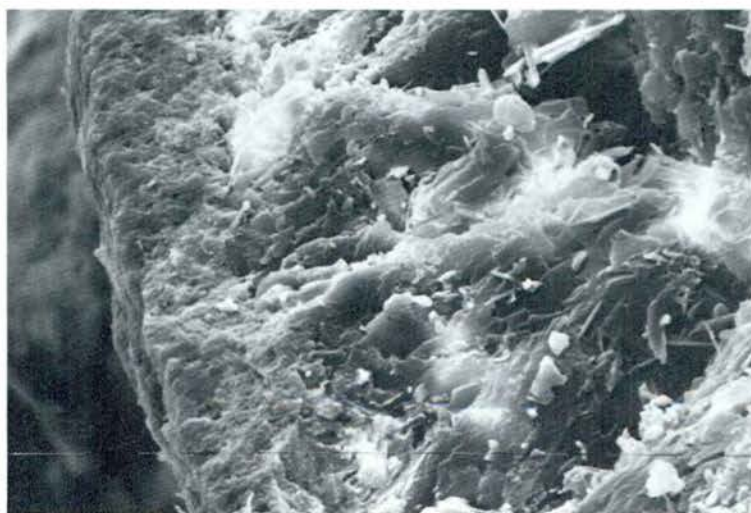


Fig. 16. - Secció transversal d'un càlcul recobert amb una escorça de CaCO_3
 Marques: 10 μm (x 640).

Fig. 16. - Cross-section surface of a cholesterol gallstone demonstrating a CaCO_3 crust.
 Markers: 10 μm (x 640).



Fig. 17. - Mapping de Ca corresponent a la mateixa zona de la figura anterior.

Fig. 17. - Ca mapping corresponding to the same field as the above figure.

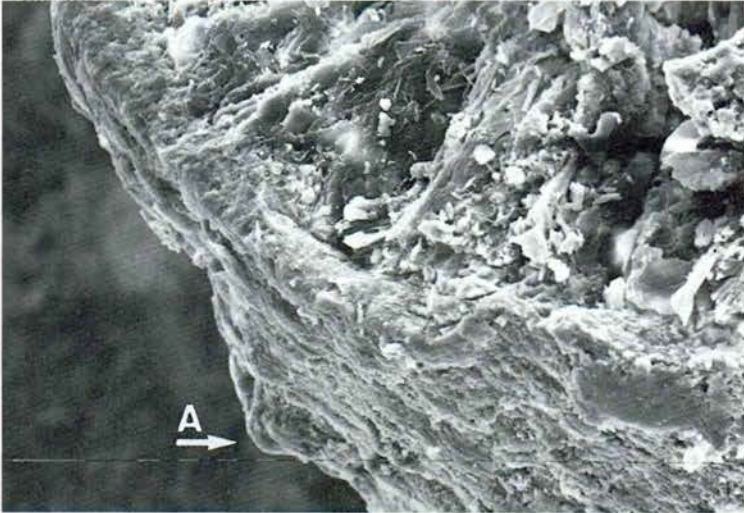


Fig. 18. - Un altre aspecte del càlcul de la figura 14. Hom pot apreciar-hi (A) un conjunt de microsferules de vaterita. Marques: 10 μm (x 320).

Fig. 18. - Another aspect of the gallstone shown in figure 14. (A) a cluster of vaterite microspheroids may be seen. Markers: 10 μm (x 320).

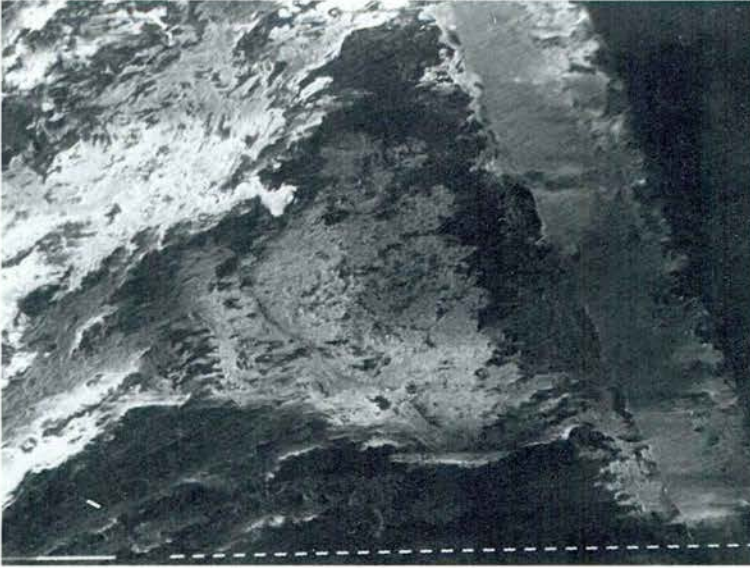


Fig. 19. - Secció transversal d'un càlcul biliar de colesterol recobert amb una escorça de CaCO₃ de 100 µm de gruix. Marques: 10 µm (x 250).

Fig. 19. - Cross-section surface of a cholesterol gallstone covered with a calcium carbonate crust 100 µm wide. Markers: 10 µm (x 250).



Fig. 20. - Mapping de Ca de la mateixa zona de la figura anterior. Hom pot apreciar-hi el gruix de l'escorça (A) i la distribució de conglomerats de vaterita a l'interior del càlcul (B).

Fig. 20. - Calcium mapping corresponding to the same zone as in the above figure. The crust width (A) and the vaterite distribution inside the gallstone (B) can be observed.

3.4. *Cristalls tractats i sense tractar amb AUDC*

Seguint el procediment indicat a l'apartat 2.1. foren observats els cristalls presents a la bilis de 17 pacients. Hom detectà cristalls de colesterol en vuit casos, mentre que en els altres nou foren observades microsfèrules de vaterita. Hom sotmeté els 17 pacients a la teràpia de dissolució amb AUDC durant un període no inferior a sis mesos. Els resultats aconseguits foren els següents:

Pacients amb cristalls de colesterol a la bilis: Foren dissolts els càlculs biliars en tots els casos (5 dissolucions completes, 3 dissolucions parcials).

Pacients amb microsfèrules de vaterita a la bilis: Dissolució en 4 casos, no dissolució en 5 casos. A aquests darrers pacients els foren realitzades colecistectomies, el resultat de les quals demostrà que es tractava de 2 casos de càlculs biliars pigmentaris i de 3 casos de càlculs biliars de colesterol amb més del 3 % de carbonat càlcic. Hom estudià amb SEM i EDXA la superfície externa dels càlculs de colesterol no dissolts d'aquests darrers tres casos. Hom pogué comprovar que es tractava de càlculs recoberts per una escorça de carbonat càlcic. Les figures 22, 23 i 24 mostren detalls d'aquestes escorces, en els quals apareixen microsfèrules de vaterita i altres formes polimòrfiques de carbonat càlcic. L'estudi simultani amb difracció de raigs X posà de manifest la presència de les altres dues formes polimòrfiques del CaCO_3 (calcita i aragonita). La figura 25 mostra la superfície externa d'un càlcul calcificat; la zona A correspon a una part en què l'escorça ha saltat. La figura 26 mostra un detall de la zona A, on hom pot apreciar esfèrules de vaterita envoltades de cristalls de colesterol. La zona B correspon a la superfície externa de l'escorça; l'anàlisi EDX posà de manifest que tota ella donà resposta al calci, si bé les esfèrules de vaterita (que es presenten embolcallades) donaren una resposta més intensa que la resta de carbonats. La figura 27 mostra una part de la zona B a més augments.

Hom estudià també la superfície externa de càlculs de pacients no sotmesos a la terapèutica d'AUDC. Les figures 28 a 32 corresponen a càlculs d'un pacient d'aquest tipus. Hom hi pot apreciar la presència de microsfèrules de vaterita, si bé aquestes no arriben a formar una escorça (figures 31 i 32). El tipus de cristalls presents a la bilis d'aquest mateix cas ha estat mostrat a la figura 2.

4. *Conclusions*

Quan els cristalls que apareixen a la bilis només són de colesterol hi ha una gran probabilitat que els càlculs estiguin formats majoritàriament per colesterol i que hom els pugui disgregar. Quan a la bilis apareixen esfèrules de vaterita, encara que sigui en baixa concentració, no hi ha la seguretat que els càlculs es puguin disgregar, perquè hi ha dues possibilitats: que l'escorça de carbonat estigui ja formada i actui de capa protectora de l'acció disgregant de l'AUDC, o bé que la crosta estigui en formació i, per tant, no impermeabilitzi el càlcul de l'acció de l'esmentat àcid.

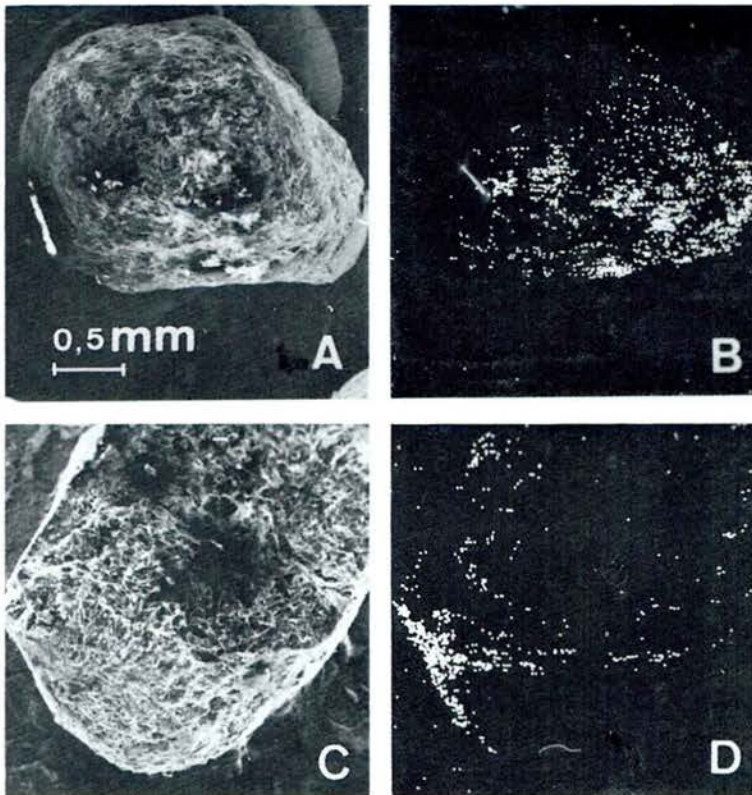


Fig. 21. - Càlcul fracturat recobert amb CaCO_3 : (A) Zona externa. (B) Mapping de Ca de la zona externa. (C) Zona interna de fractura. (D) Mapping de Ca de la zona interna.

Fig. 21. - Fractured gallstone covered with CaCO_3 : (A) External zone. (B) Ca mapping of external zone. (C) Internal zone of fractured gallstone. (D) Ca mapping of internal zone.



Fig. 22. - Microsfèrules de vaterita envoltades d'altres formes polimòrfiques de carbonat càlcic. Marques: $10\ \mu\text{m}$ ($\times 2.500$).

Fig. 22. - Vaterite microspheroids surrounded by other polymorphic forms of calcium carbonate. Markers: $10\ \mu\text{m}$ ($\times 2.500$).



Fig. 23. - Microsfèrula de vaterita envoltada de carbonat càlcic a la superfície d'un càlcul tractat amb AUDC. Marques: 10 μm (x 2.500).

Fig. 23. - Vaterite microspheroid surrounded by calcium carbonate on the surface of a gallstone treated with UDCA. Markers: 10 μm (x 2.500).

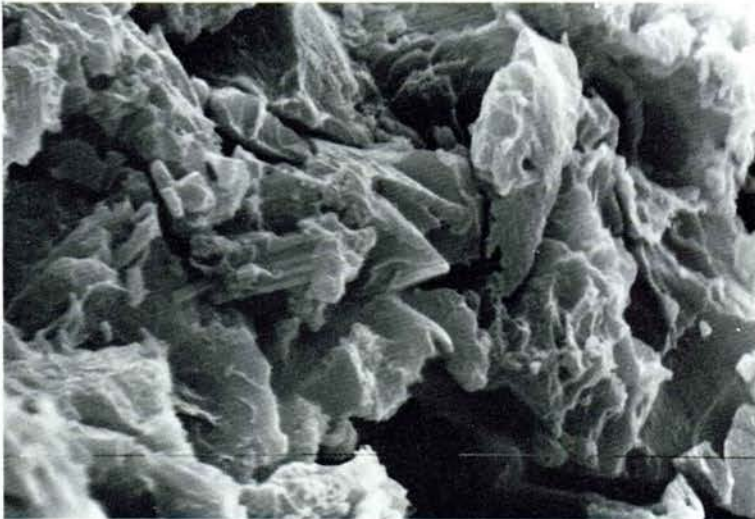


Fig. 24. - Detall de la superfície externa d'un càlcul calcificat amb una escorça de carbonat càlcic. Marques: 10 μm (x 1.250).

Fig. 24. - Calcium carbonate crust of a calcified gallstone. External surface detail. Markers: 10 μm (x 1.250).

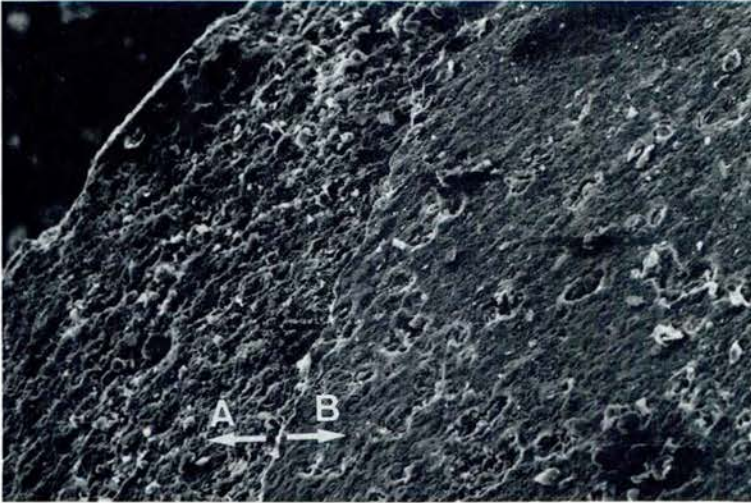


Fig. 25. - Zona externa d'un càlcul calcificat. Marques: 100 μm (x 160).
Fig. 25. - External zone of a calcified gallstone. Markers: 100 μm (x 160).

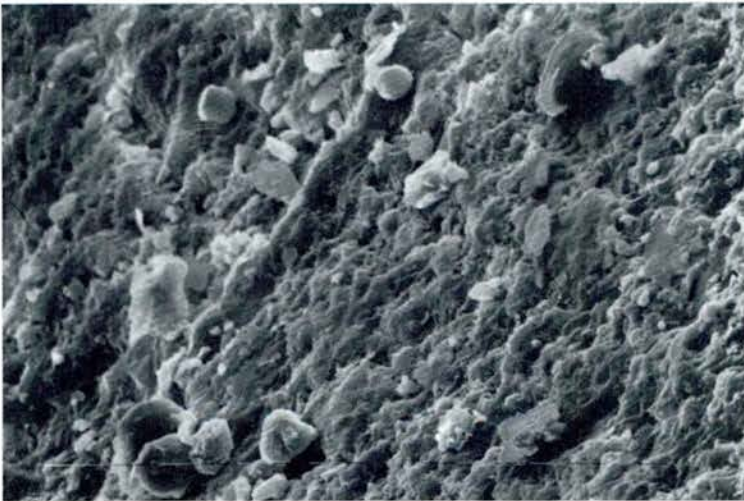


Fig. 26. - Detall de la zona A de la figura anterior. Microsfèrules de vaterita envoltades de cristalls de colesterol. Marques: 10 μm (x 640).
Fig. 26. - Zone A of figure 25 magnified (x 640). Microspheroids of vaterite surrounded by cholesterol crystals. Markers: 10 μm (x 640).

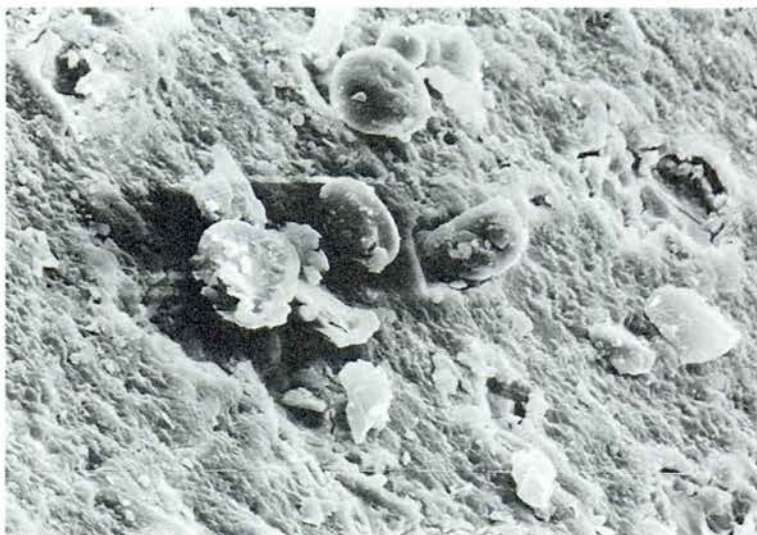


Fig. 27. - Detall de la zona B de la figura 25. Marques: 10 μ (x 640).

Fig. 27. - Detail of zone B of figure 25. Markers: 10 μ m (x 640).

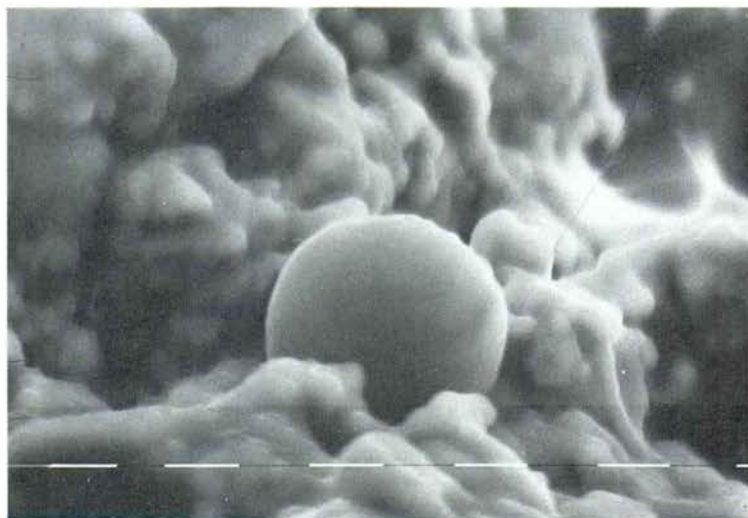


Fig. 28. - Imatge per microscòpia electrònica de rastreig; electrons secundaris. Esfèrula de carbonat càlcic detectada a la superfície d'un càlcul: l'envolten cristalls de colesterol. Marques: 10 μ m (x 1.250). Resposta a la microanàlisi EDX: Ca.

Fig. 28. - SEM secondary electron image. Calcium carbonate microspheroid detected on the surface of a gallstone, surrounded by cholesterol crystals. Markers: 10 μ m (x 1.250). EDX microanalysis: Ca.

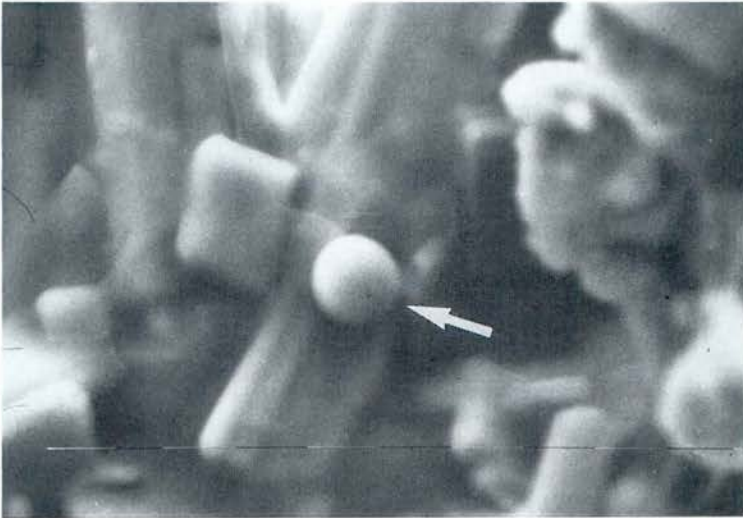


Fig. 29. - Vaterita envoltada de colesterol a la superfície d'un càlcul no tractat amb AUDC. Marques: 10 μm (x 1.250).

Fig. 29. - Vaterite surrounded by cholesterol crystals on the surface of a gallstone not treated with UDCA. Markers: 10 μm (x 1.250).

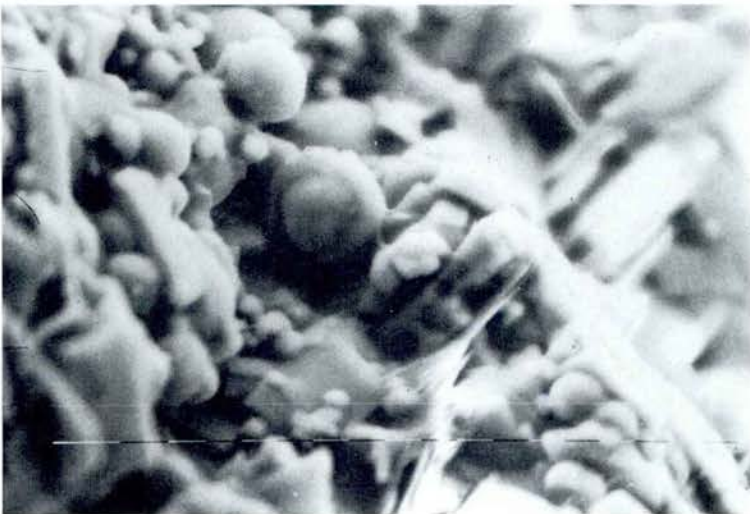


Fig. 30. - Microsfèrules de vaterita envoltades de cristalls de colesterol. Marques: 10 μm (x 640).

Fig. 30. - Vaterite microspheroids surrounded by cholesterol crystals. Markers: 10 μm (x 640).



Fig. 31. - Zona de fractura immediata a la superfície externa d'un càlcul no tractat amb AUDC. Marques: 10 μm (x 640).

Fig. 31. - Gallstone not treated with UDCA. Fractured zone close to the external border: Markers: 10 μm (x 640).



Fig. 32. - Mapping de Ca corresponent a la mateixa zona de la figura anterior.
Fig. 32. - Ca mapping corresponding to the same zone as in the above figure.

ADDENDA

Aspectes parcials d'aquest treball foren presentats al Congrés organitzat per la Societat Alemana de Microscòpia Electrònica a Aachen, el mes de setembre de 1986 i publicats al volum núm. 19 de «Beiträge zur elektroenmikroskopischen Direktabbildung von Oberflächen», pàgs. 457-467, Münster, setembre de 1986, amb el títol «Mikrostruktur und Mikroanalyse (REM, RMA, RBS) von Cholesterin-Gallensteinen».

PARTÍCULES DE SILICONA EN EL FETGE. ESTUDI MICROANALÍTIC D'UN PACIENT HEMODIALITZAT

per

JOSEP M. TURA *, SERGI SERRANO **, IMMA LLORACH **,
MONTSERRAT MARSAL ***

* Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi, I.T.Q.T., Centre d'Investigació i Desenvolupament del CSIC, Barcelona. ** Hospital de Nostra Senyora de l'Esperança de l'Ajuntament de Barcelona. *** Departament de Metal·lúrgia i Siderúrgia. Universitat Politècnica de Catalunya.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans, carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona.

This work forms part of programme number 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Carme Street 47. 08001 Barcelona.

SILICONE PARTICLES IN THE LIVER. MICROANALYTICAL STUDY OF A HAEMODIALYSED PATIENT

SUMMARY

We describe a haemodialysis patient with chronic renal insufficiency presenting episodes of fever, ascites and anemia. Analysis of a hepatic biopsy using Energy Dispersive X-ray Analysis (EDXA) together with Scanning Electron Microscopy (SEM) revealed silicone particles between the sinusoids and the hepatocytes. The analysis of the dialysis tube using the same techniques disclosed silicone particles and microconglomerates of titanium dioxide. The complete recovery of the patient was achieved following an adequate treatment and without changing the dialysis apparatus.

RESUM

Els autors exposen el cas d'una pacient amb insuficiència renal crònica en programa d'hemodiàlisi que presentava episodis febrils, ascites i anèmia. L'anàlisi d'una biòpsia hepàtica amb un analitzador dispersiu d'energies de raigs X (EDX) acoblat a un microscopi electrònic de rastreig (SEM) demostrà la presència de partícules de silicona entre els sinusoides i els hepatòcits. L'anàlisi del tub dialitzador amb les mateixes tècniques posà de manifest la presència de partícules de silicona i de microconglomerats de diòxid de titani en la superfície interna d'aquest. El total guariment de la malalta, després d'un tractament adequat, i sense haver canviat l'aparell dialitzador, no fa probable, en aquest cas, una relació entre les alteracions hepàtiques i el dipòsit de silicona en el fetge de la pacient.

Paraules clau: Insuficiència renal crònica. Hemodiàlisi. Hepatopatia. Silicona. Microscòpia electrònica de rastreig. Microanàlisi de raigs X.

Key words: Chronic renal insufficiency. Haemodialysis. Liver disease. Silicone. Scanning Electron Microscopy. X-ray microanalysis.

1. *Introducció*

Les causes més freqüents d'hepatopatia crònica en malalts amb insuficiència renal de llarga evolució sotmesos a programa d'hemodiàlisi són les infeccions virals, i menys freqüentment la sobrecàrrega fèrrica deguda a l'hemòlisi i a les transfusions repetides. A partir del 1983 han vingut apareixent a la literatura¹ informacions sobre una forma d'hepatopatia que afecta aquest grup de malalts, que no devia haver estat reconeguda fins aleshores i que deu estar associada a l'acumulació intrahepàtica de silicona; aquest material procediria dels tubs de les línies de les màquines d'hemodiàlisi.

Seguidament hom exposa un cas d'un malalt amb insuficiència renal crònica amb programa d'hemodiàlisi, que ingressa a l'hospital per a l'estudi d'una síndrome febril i que presenta evolució sèrica dels enzims hepàtics. En el curs del seu ingrés fou duta a terme una biòpsia hepàtica, la qual fou estudiada per tècniques convencionals i mitjançant SEM + EDXA.

2. *Observació clínica*

Malalta de 33 anys, afectada d'una insuficiència renal crònica per reflux bilateral amb programa d'hemodiàlisi periòdiques des del març de 1978. No presentà en cap moment diàlisi peritoneal. El mes de juny de 1983 hom li trasplantà un empelt renal de ronyó semiidèntic. Després de dues crisis de rebuig i per hippuran pla, fou decidida una trasplantectomia.

Com a antecedents destaquen: des d'abril del 1983, oscil·lacions de les transaminases GOT i GPT des de la normalitat fins a ≈ 100 U-GT sempre normals, proves de coagulació normals. Fosfatases alcalines discretament elevades 321 (N: 271).

El febrer del 1984 ingressa per quadre de mal estat general, febre d'un mes d'evolució, ascites i anèmia (hematòcrit 12 %). No hi ha evidència de sagnat digestiu. Proves de coagulació normals. Fosfatases alcalines discretament elevades 321 (N: 271). Paracentesi del líquid peritoneal: hemoperitoneus.

Tot això ens orienta cap a una tuberculosi peritoneal. Hom fa els estudis complementaris adients (Ziehls i Lowensteins a l'esput, suc gàstric, líquid ascític, líquid pleural i biòpsia pleural). A l'espera de resultats, hom decideix de començar tractament tuberculostàtic. Per persistència de la febre i del mal estat general, hom practica ECO i TAC abdominals en els quals és observable una imatge suprapèlvica de líquid encapsulat, la qual no es pot discernir si és abscess o no.

¹ ABRAHAM, J. L.: *Biomedical microanalysis: Putting it to work now in diagnostic pathology*. En: Om Johari Editor. Scanning Electron Microscopy. Chicago. SEM Inc AMF O'Hare, 1983: 171-178.

Hom indica laparotomia exploradora, i hi troba fetge i melsa normals, sense nòduls limfàtics patològics. La imatge ecogràfica corresponia a líquid ascític encapsulat. Les biòpsies de peritoneu i gangli foren normals. En seguir el tractament tuberculostàtic triple més corticoperàpia inicial, desapareix la febre, l'ascites i l'embassament pleural, amb una millora clínica total de la malalta. Actualment aquesta segueix asimptomàtica, hi persisteixen les proves hepàtiques normals i segueix el mateix tipus de diàlisi, sense haver-se efectuat variació del material utilitzat.

3. Microscòpia òptica i microscòpia electrònica de transmissió

La biòpsia hepàtica era, macroscòpicament, de color groc-bru i les seves dimensions, $20 \times 15 \times 8 \text{ mm}^3$.

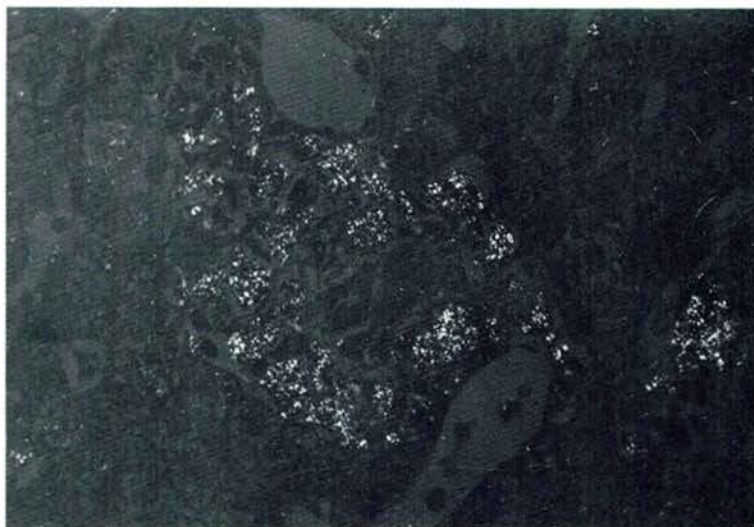


Fig. 1. - Material birefringent de caràcter granular en el citoplasma de les cèl·lules histiocitàries (Polarització, x 400).

Fig. 1. - Birefringent material of granular nature in the cytoplasm of histiocytic cells (Polarization, x 400).

En el microscopi òptic, foren observats acúmuls d'histiòcits als espais porta i als sinusoides, el citoplasma dels quals era ocupat per un material, birefringent (figura 1) positiu a la tècnica de P.A.S. i resistent a la digestió amb diastasa (figures 2 a i 2 b). Al microscopi òptic sota llum ultraviolada, el teixit hepàtic presentava una lleu fluorescència blava, típica dels teixits histològics,

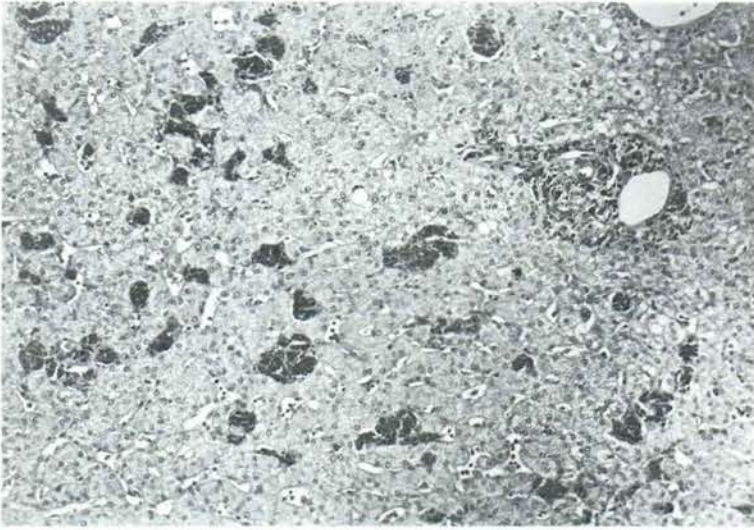


Fig. 2 a. - Acumulacions d'histiòcits PAS positius en un tracte portal i en els sinusoides dels àcins hepàtics (PAS/H, x 100).

Fig. 2 a. - Accumulations of positive PAS histiocytes located in a portal tract and in the sinusoids of the hepatic acini (PAS/H, x 100).

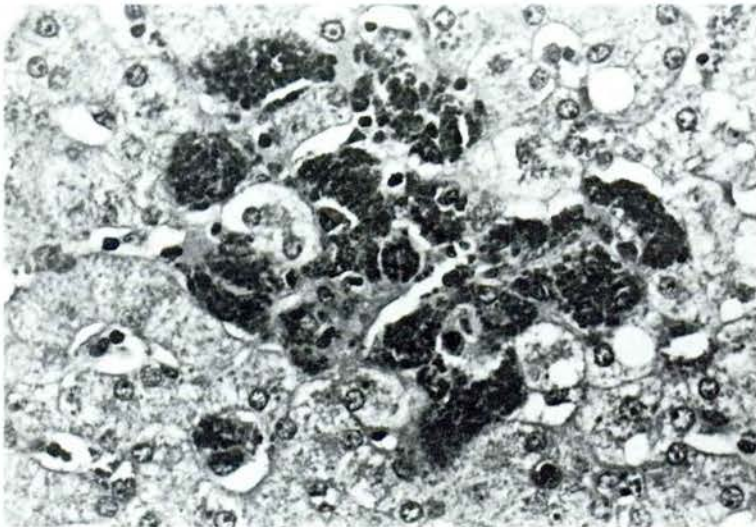


Fig. 2 b. - Detall de la figura 2 a en el qual es mostra el caràcter granular del material acumulat als citoplasmes histiocitaris (PAS/H, x 400).

Fig. 2 b. - Close up of Figure 2 a showing granular nature of material accumulated in the histiocytic cytoplasm (PAS/H, x 400).

però hom hi pogué observar la presència de formes espiculars d'una fluorescència més intensa. Aquest mateix tipus de fluorescència més intensa fou observada en el tub dialitzador.

En el microscopi electrònic de transmissió hom pogué apreciar un material que presentava una estructura laminada, per superposició de capes electrodenses, de 200 Å de gruix que alternaven en capes electrolúcides de 1.000 Å de gruix formant feixos de mida variable (figura 3).

4. *Estudi de la biòpsia i del tub de l'instrument dialitzador per microscòpia electrònica de rastreig i per microanàlisi dispersiva d'energia de raigs X*

Hom estudià la biòpsia hepàtica per microscòpia electrònica de rastreig i pogué apreciar la presència d'estructures fibroses estranyes que emergien de sinusoides del teixit hepàtic (figura 4). L'anàlisi EDX d'aquestes inclusions (figura 5)

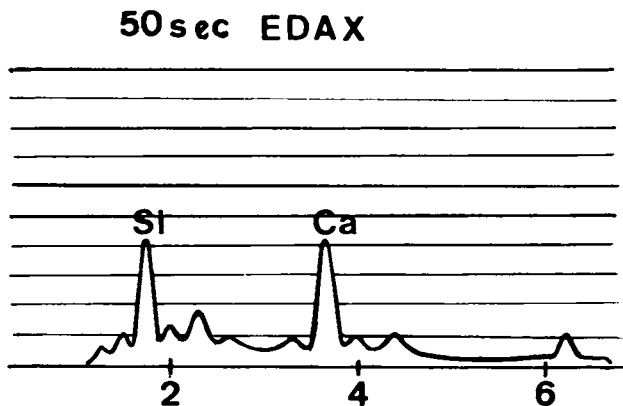


Fig. 5. - Anàlisi EDX del fragment de silicona de la figura 2. Energies en KeV:

Fig. 5. - EDX analysis of silicone fragment of Fig. 2. Energies in KeV:

Mg ($K\alpha = 1,25$); Al ($K\alpha = 1,49$);
 Si ($K\alpha = 1,74$); P ($K\alpha = 2,01$);
 S ($K\alpha = 2,46$); Cl ($K\alpha = 2,62$);
 K ($K\alpha = 3,31$); Ca ($K\alpha = 3,69$, $K\beta = 4,01$);
 Ti ($K\alpha = 4,50$); Fe ($K\alpha = 6,4$).

posà de manifest la presència dels elements següents: Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti i Fe. El Si i el Ca són els dos elements més abundants.¹

Aquesta resposta important de silici féu pensar en la possibilitat que es trac-



Fig. 3. - Estructures laminades a l'interior del citoplasma d'un macròfag. Figura per microscòpia electrònica de transmissió de material prèviament inclòs en parafina. Marques: 1 μm (x 11.000).

Fig. 3. - Laminated structures inside cytoplasm of a macrophage. Transmission electron microscopy image of material previously embedded in paraffin. Markers: 1 μm (x 11.000).

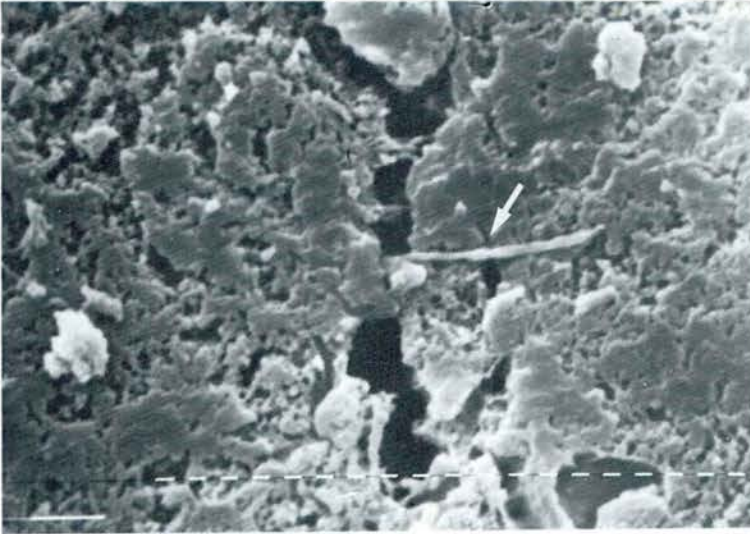


Fig. 4. - Un altre camp de biòpsia hepàtica. La part central mostra sinusoides envoltats de cèl·lules hepàtiques. La fletxa mostra un fragment de tub de silicona emergint d'un sinusoid. Metallització amb or. Marques: 1 μm (x 2.500).

Fig. 4. - Another view of hepatic biopsy. The centre shows sinusoids surrounded by hepatic cells. The arrow indicates a fragment of silicone tube emerging from a sinusoid. Coated with gold. Markers: 1 μm (x 2,500).



Fig. 6. - Imatge SEM per electrons secundaris de la superfície de la base de la càpsula dins la cambra d'aire. La fletxa indica impureses que donaren resposta EDX de Ti intensa. Recobrint amb or. Marques: 10 μm (x 320).

Fig. 6. - Secondary electrons SEM image of the surface of the base of the capsule in the air chamber. The arrow indicates impurities giving Ti intense EDXA response. Coated with gold. Markers: 10 μm (x 320).

tés d'un cas semblant al descrit per A.S.Y. Leong *et al.*^{2,3} segons els quals a diversos pacients d'hemodiàlisi els fou detectada la presència de silici, no solament en el fetge, sinó també en altres parts del cos, com ara la bilis, la medulla espinal i els pulmons.^{4,5,6} Aquest silici procedia de l'esmicolament i la migració subsegüent de la silicona dels tubs de l'aparell dialitzador.^{7,8,9,10,11}

Per tal de confirmar aquesta hipòtesi hom procedí a observar per SEM la superfície exterior i interior del tub de silicona utilitzat en l'aparell dialitzador, i fou possible aconseguir la detecció d'algunes fisures longitudinals; i no hi fou apreciada, en canvi, la presència d'oligòmers. D'altra banda, el filtre de la cambra d'aire del tub presentà nombrosos defectes superficials en les fibres que formen el seu tramat; hom pogué apreciar, damunt aquest filtre i les plaques de matèria plàstica que el sustenten, dos tipus de partícules diferents: unes d'arrodonides (fletxa A en la figura 6) i unes altres d'allargassades (fletxa C en la figura 7). L'anàlisi EDX global de la superfície mostrada a la figura 6 és indicat a la figura 8. Tal com hom pot observar, apareixen en aquest espectre energètic els mateixos elements trobats en la biòpsia: Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti i Fe; si bé, en aquest cas, l'element predominant només és el silici. L'anàlisi EDX de les partícules arrodonides revelà una forta resposta de titani, mentre que les allargassades presentaren una forta resposta de silici. A la figura 9 hom pot observar una de les partícules allargassades a 2.500 augments; la presència de silici queda reflectida pel *mapping* corresponent a la línia K α d'aquest element tal com podem veure a la figura 10.

5. Discussió

Des d'un punt de vista morfològic, aquest cas presenta particularitats que el distingeixen dels altres descrits fins ara a la literatura, com són la PAS posi-

² LEONG, A. S. Y., DISNEY, A. P. S., GOVE, D. W.: *Refractile material in the liver of haemodialysis patients*. Lancet 1981, I: 889-890.

³ LEONG, A. S. Y., PATH, M. R. C., DISNEY, A. P. S., GOVE, D. W.: *Spallation and migration of silicone from blood-pump tubing in patients on haemodialysis*. N. Eng. J. Med. 1982; 306: 135-140.

⁴ URETSKY, N. F., O'BRIEN, J. J., COURTISS, E. M., BECKER, M. D.: *Augmentation mamoplasty associated with a severe systemic illness*. Ann Plast Surg 1979; 3: 445-447.

⁵ CELLI, B. R., KOVNAT, D. M.: *Acute pneumonitis after subcutaneous injections of silicone*. N. Eng. J. Med. 1983; 309: 856-857.

⁶ CHASTRE, J., BASSET, F., VIAN, F., *et al.*: *Acute pneumonitis after subcutaneous injections of silicone in transexual men*. N. Engl. J. Med. 1983; 308: 764-767.

⁷ PARFREY, P. S., O'DRISCOLL, J. B., PARADINAS, F. J.: *Refractile material in the liver of haemodialysis patients*. Lancet 1981, I: 1101-1102.

⁸ BOMMER, J., RRIITZ, E., WALDHERR, R., GASTNER, M.: *Silicone cell inclusions causing multiorgan foreign body reaction in dialyzed patients*. Lancet 1981; I: 1314.

⁹ MORALES, J. J. M., COLINE, F., ARTEAGA, J. *et al.*: *Clinical implications of the presence of refractile particle in the liver of haemodialysis patients*. Proc. EDTA 1982; 19: 265-269.



Fig. 7. - Imatge SEM per electrons secundaris. A la part esquerra hom pot apreciar l'entramat de fibres químiques que formen el filtre de la cambra d'aire; hom hi pot observar, també, irregularitats en llurs diàmetres, esquerdes superficials i impureses adherides (A, riques en titani). A la part dreta, apareix la paret de la càpsula dins la cambra d'aire, damunt la qual també hom hi pot observar conglomerats arrodonits rics en Ti (B) i allargassats rics en Si (C).
 Marques: 100 μm (x 460).

Fig. 7. - Secondary electrons SEM image. On the left we may see interwoven chemical fibres which form the filter of air chamber. We may also observe irregularities in their diameters, superficial cracks and impurities (A, rich in titanium). On the right we may see the wall of the capsule in the air chamber above which we may also observe rounded conglomerates rich in Ti (B) and elongated ones rich in Si (C). Markers: 100 μm (x 460).

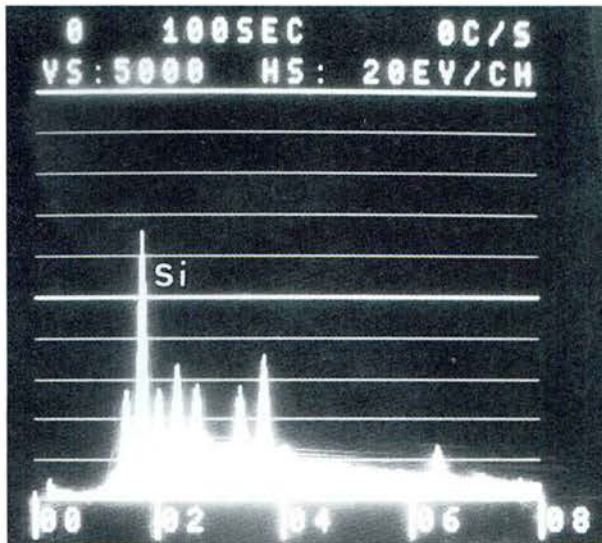


Fig. 8. - Anàlisi global EDX de la mateixa superfície mostrada a la figura 4. Els elements químics i llurs energies en KeV són els següents:

Fig. 8. - Overall EDX analysis of the surface shown in Figure 4.
 Energies in KeV:

- Mg ($K\alpha = 1,25$); Al ($K\alpha = 1,49$);
- Si ($K\alpha = 1,74$); P ($K\alpha = 2,01$);
- S ($K\alpha = 2,31$); Cl ($K\alpha = 2,62$);
- K ($K\alpha = 3,31$); Ca ($K\alpha = 3,69$, $K\beta = 4,01$);
- Ti ($K\alpha = 4,50$); Fe ($K\alpha = 6,4$).



Fig. 9. - Imatge per electrons secundaris d'una estructura allargassada situada damunt la superfície de la paret de la càpsula dins la cambra d'aire. Recobriments amb carbó.
 Marques: 1 μm (\times 2.500).

Fig. 9. - Secondary electron image of an elongated structure situated above the surface of the wall of the capsule in the air chamber. Coated with carbon.
 Markers: 1 μm (\times 2.500).



Fig. 10. - Mapping de la línia $K\alpha$ del Si de la mateixa superfície de la figura 7 ($K\alpha = 1,74 \text{ KeV}$).
Fig. 10. - Mapping of the line $K\alpha$ of Si in the same surface as Figure 7 ($K\alpha = 1,74 \text{ KeV}$).

tivitat i la birefringència. A nivell ultraestructural també existeixen marcades diferències, car les cèl·lules contenen estructures laminades en lloc de les estructures de caràcter amorf habituals. Aquestes troballes morfològiques són de difícil interpretació i creiem que poden ésser: a) la representació de productes del metabolisme cel·lular en relació amb la fagocitosi de la silicona, b) una variant estructural inhabitual de la silicona, o c) el resultat de l'acumulació de substàncies no ben caracteritzades de les quals la silicona podria ésser un dels components.^{12, 20}

Des d'un punt de vista físic microanalític, la presència de silicona en la biòpsia hepàtica ha estat confirmada tant per SEM i EDXA com per microscòpia òptica de fluorescència. L'anàlisi de les imperfeccions observades en la cambra d'aire del tub dialitzador ha permès d'identificar aquestes com a procedents de dos orígens diferents: a) fragments de silicona, i b) conglomerats de diòxid de titani, substància que és utilitzada com a pigment.

Els resultats d'aquestes microanàlisis posà, per tant, de manifest la presència de defectes en la fabricació en els tubs dialitzadors; aquests defectes originen microfragments dels materials utilitzats en la fabricació de les diverses parts que componen els dits tubs, alguns dels quals queden retinguts pels sinusoides hepàtics. En aquests moments, malgrat que hi hagi bibliografia al respecte, no podem correlacionar aquestes troballes anatomopatològiques amb el procés patològic que motivà l'ingrés de la malalta. Queda un interrogant i un camí obert per a un estudi més ampli de les possibles conseqüències d'aquestes substàncies incloses a diversos teixits del cos humà.

¹⁰ LAOHAPAUD, T., OSMAN, E. M., MORLEY, A. R., WARD, M. K., KERR, D. N. S.: *Accumulation of silicone elastomer in regular dialysis*. Proc. EDTA 1982; 19: 142-152.

¹¹ PARFRE, P. S., PARADINAS, F. J., O'DRISCOLL, J. J. B., CURTIS, J. R., GOWER, P. E.: *Chronic liver disease in haemodialysis patients*. Proc. EDTA 1982; 19: 153-158.

¹² AUER, E. A., DOCKERTY, M. B., MAYO, C. W.: *Ruptured dermoid cyst of the ovary simulating abdominal carcinomatosis*. Mayo Clin. Proc. 26: 489-497, 1951.

¹³ CODER, D. M., OLANDER, G. A.: *Granulomatous peritonitis caused by starch glove powder*. Arch. Surg. 105: 83-86, 1972.

¹⁴ DAVIES, J. D., NEELY, J.: *The histopathology of peritoneal starch granulomas*. J. Pathol. 107: 265-278, 1972.

¹⁵ EISEMAN, B., SEELIG, M. G., WOMACK, N. A.: *Talcum powder granuloma. Frequent and serious postoperative complication*. Ann. Surg. 126: 820-832, 1947.

¹⁶ GERMAN, W. M.: *Dusting powder granulomas following surgery*. Surg Gynecol. Obstet. 76: 501-507, 1943.

¹⁷ HOLMES, E. C., EGGLESTON, J. C.: *Starch granulomatous peritonitis*. Surgery 71: 85-90, 1953.

¹⁸ MARSHALL, S. F., FORSE, R. A.: *Peritoneal adhesions report of a case of paraffinoma*. Surg. Clin. North. Am. 32: 903-908, 1952.

¹⁹ SAXEN, L., SAXEN, E.: *Starch granulomas as a problem in surgical pathology*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 64: 783-788, 1950.

²⁰ TINKER, M. A., BURDMAN, D., DEYSINE, M., TEICHER, I., PLATT, N., AUFSES, A. H. Jr.: *Granulomatous peritonitis due to cellulose fibers from disposable surgical fabrics: Laboratory investigations and clinical implications*. Ann. Surg. 180: 831-835, 1974.

MICROCALCIFICACIONS EN CARCINOMES I TUMORS BENIGNES DE MAMES HUMANES

(I part)

ESTUDI MICROANALÍTIC I MICROSTRUCTURAL

per

ADELAIDA FANDOS * JOSEP M. TURA ** ADOLF TRAVERIA ***
MIQUEL PRATS * ALBERT M. MANICH ** MONTSERRAT MARSAL ****

* Departament de Cirurgia. Hospital Clínic. Universitat de Barcelona. ** Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi. Centre d'Investigació i Desenvolupament CSIC. Barcelona. *** Institut Jaume Almera, CSIC. Barcelona. **** Departament de Metallúrgia i Siderúrgia. Universitat Politècnica de Catalunya.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans, carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona.

This work is part of programme number 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Carme Street, 47. 08001 Barcelona.

MICROCALCIFICATIONS IN CARCINOMAS AND BENIGN TUMORS IN HUMAN BREAST. A MICROANALYTICAL AND MICROSTRUCTURAL STUDY

RESUM

Les microcalcificacions mamàries són un signe radiològic important per al diagnòstic de càncer de mama en fases precoces. Mitjançant l'aplicació de mètodes físics microanalítics hom s'ha proposat de conèixer si existeixen diferències entre els diversos tipus de calcificacions.

En aquest treball hom ha estudiat trenta-un casos clínics corresponents a pacients a les que fou practicada una biòpsia mamària (teixit mamari normal sense calcificacions, un cas; tumors mamaris benignes amb calcificacions, vuit casos; carcinomes mamaris amb microcalcificacions, disset casos, i carcinomes mamaris sense microcalcificacions, cinc casos).

Les biòpsies han estat analitzades per les tècniques de microscòpia electrònica de rastreig (SEM), anàlisi per energia dispersiva de raigs X (EDXA) i difracció de raigs X (XRD). Aquestes tècniques donen informació de la forma dels microcristalls, de llur composició i del lloc on s'assenten. Hom identifica dos tipus fonamentals de cristalls: polièdrics amb resposta EDX al Ca i esfèrics amb resposta al Ca i al P. Tant pel que fa a les tumoracions benignes com a les malignes hom troba ambdós tipus de cristalls, però amb petites diferències, tant quantitatives com amb referència al motlle on aquests s'assenten; els cristalls que donen resposta EDX al P i al Ca són apatites; mentre que els que només donen resposta al Ca són calcita, aragonita o bé oxalat càlcic, segons els casos. Contràriament als resultats obtinguts per altres autors, hom pot concloure per aquest treball que les tumoracions benignes i les malignes no poden ésser diferenciades segons l'estructura cristal·logràfica de les microcalcificacions que contenen.

SUMMARY

Breast calcifications are of radiological significance for the early diagnosis of breast cancer. With the aid of microanalytical techniques we have sought to find out whether there are differences among the various types of calcifications. Breast biopsies were performed in a group of 31 women (normal breast tissue without calcifications: one case; benign breast tumours with calcifications: eight cases; breast carcinomas with microcalcifications: seventeen cases; and breast cancers without microcalcifications: five cases).

The biopsies were analysed by Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDXA) and X-Ray Diffraction (XRD). These techniques yielded information on the shape of the microcrystals, their composition and their location. Two fundamental types of crystals were identified: polyhedral with EDX response to Ca and spherical with response to Ca and P. We found both types of crystals with small differences with respect to quantity and location in both the benign and malignant tumours. The crystals with EDX response to P and Ca were apatite whereas those with a response to Ca were calcite, aragonite or calcium oxalate depending on the case. In contrast to the findings of other authors our results suggest that benign and malignant tumours cannot be differentiated according to the crystalline structure of the microcalcifications.

Paraules clau: Càncer de mama. Calcificacions. Microscòpia electrònica de rastreig. Fluorescència de raigs X per energia dispersiva. Difracció de raigs X.

Key words: Breast cancer. Calcifications. Scanning Electron Microscopy (SEM). Energy Dispersive X-ray Analysis (EDXA). X-ray Diffraction (XRD).

1. Introducció

D'entre la patologia maligna de la dona, el càncer de mama ocupa el primer lloc per la freqüència i la mortalitat.

Hom pot calcular que, en el nostre país, la taxa d'incidència global és del 36 al 38 per 100.000 (Waterhouse, 1982).¹ La mortalitat és elevada tot i els avenços terapèutics, que aconseguiren una disminució de l'1,1 per 100.000 entre els anys 1969 i 1980.² Aquestes elevades mortalitat i morbilitat són les que donen importància al càncer de mama i justifiquen la gran quantitat de treballs que s'hi dediquen.

Mentre no sigui coneguda l'etiologia del càncer de mama, el problema se centrarà en dos aspectes fonamentals: el diagnòstic precoç i el coneixement de la biologia tumoral, i, d'aquesta manera hom podrà triar el tractament més adequat.

Molts autors estan d'acord que, per tal de millorar els resultats pel que fa

¹ WATERHOUSE, J.; MUIR, C.; SHANMUGARATNAM, K.; POWELL, J.; *Cancer incidence in five continents*. Scientific Publications, Lyon, 1982, vol. IV, 42.

² DE VITA, V. T. Jr., *Adjuvant therapy of cancer. IV*. Jons-Salmon, Grune & Stratton, Orlando, 1984.

a la supervivència, cal arribar a establir un diagnòstic precoç, cosa que permetrà tractar la malaltia en estadis més inicials.^{3, 4}

Un signe radiològic d'interès en el càncer de mama són les microcalcificacions, especialment en les formes inicials i ocultes. No són, però, totalment específiques i, segons els criteris utilitzats en llur selecció, la taxa de diagnòstics positius de càncer després de la biòpsia varia entre un 10 i un 30 % (en els casos que aquest és l'únic signe de què hom disposa per al diagnòstic).⁵

Si bé el signe radiològic més estudiat en el càncer de mama són les microcalcificacions, cal assenyalar també que n'és el signe més desconegut ja que hom no sap res de la seva etiologia ni del seu valor biològic i que la seva composició és en gran part desconeguda.

A partir de la morfologia radiològica de les microcalcificacions i amb la finalitat d'augmentar el seu valor diagnòstic, han estat proposades múltiples classificacions.^{6, 7} Alguns autors, com Tábà,⁸ les classifiquen segons l'origen, tot relacionant-ne la morfologia amb el motlle en què han estat formades.

A la literatura hom troba descrites les microcalcificacions com a:

- grans de sal, segons Leborgne ⁶
- grans de sorra, segons Egan ⁹
- bastonets, segons Baclesse i Willemin ¹⁰
- formes cristal·lines, segons Hoeffken ¹¹
- petits càlculs, segons Gros ¹²

i així successivament, la qual cosa dóna idea que es tracta d'acumulacions sòlides de petites dimensions.

³ STRAX, P., *Control of breast cancer through mass screening*. PSG Publishing, Littleton, 1979, 3-6.

⁴ TÁBÀ, L.; DEAN, P. B.; «Risks and benefits of mammography in population screening of breast cancer», In *Breast Cancer: Diagnosis and Management*. Wiley & Sons, Chichester, 1984.

⁵ LANYI, M., *Microcalcifications in the breast - a blessing or a Curse? a critical review*. *Diagn. Imag. Clin. Med.* 1985, 54: 126-145.

⁶ LEBORGNE, A. A. Diagnóstico de los tumores de la mama por la radiografía simple. *Apertado del Bol. Soc. Cir.*, Uruguay, 1949, 20: 407.

⁷ EGAN, R. L., *Mamografía*. Torray, S. A., Barcelona 1974, 138-153.

⁸ TÁBÀ, L.; DEAN, P. B. Atlas de Mamografía. Ed. Doyma. Barcelona 1985, 138-139.

⁹ EGAN, R. L., Mammography in the diagnosis of breast diseases. *General Practitioner*, 1964, 29, 125-130.

¹⁰ BACLESSE, F.; WILLEMIN, A., *Atlas of Mammography*. Libraire des Facultés, París, 1967.

¹¹ HOEFFKEN W. & LANYI, M., *Mammography. Technique. Diagnosis. Differential diagnosis Results*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1977, 159-165.

¹² GROS, C. M., *Les maladies du sein*. Masson et Cie., París, 1963.

Pel que fa a l'estructura cristal·lina o bé amorfa de les microcalcificacions a l'organisme Anderson¹³ diu que, en un principi, aquestes estan formades, en general, per un material amorf que més endavant cristal·litza.

En revisar la literatura hom es veu sorprès per la utilització del terme «calcificació». La manera com hi és emprat fa pensar que les opacitats radiològiques que són observades a la mamografia es troben formades per algun compost de calci. Hom suposa que fou adoptat aquest terme perquè en estudiar-les amb tincions especials es tenyien amb els mateixos colorants que el calci.

Gros¹² diu que les calcificacions del càncer de mama són constituïdes per lactats, carbonats, fosfats, etc., però sense aportar-ne evidència experimental. Hassler¹⁴ estudia tres casos per difracció de raigs X i afirma que es tracta d'hidroxiapatita i fosfat tricàlcic. De tota manera, el reduït nombre de mostres estudiat per aquest autor no permet de poder extrapolar els seus resultats a la població general de tumoracions amb calcificacions.

Ahmed, el 1975,¹⁵ després d'un estudi amb microscòpia electrònica i sense especificar el nombre de casos investigats, diu haver trobat una relació Ca/P de 5/3, de la qual cosa dedueix que es tracta del fosfat càlcic $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{OH}$.

Hoeffken, el 1977,¹¹ cita uns autors que, sense referències de cap mena ni explicacions dels mètodes emprats ni tampoc del nombre de casos estudiats, arriben a la conclusió que les calcificacions mamàries són formades per:

- $\text{CO}_3(\text{PO}_4)_2$, en el 55 % dels casos,
- CaCO_3 , en el 9,7 % dels casos,
- $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en el 13 % dels casos,
- proteïnes, en el 22 % dels casos.

Büsing, el 1981 i el 1982,^{16, 17} diu que mitjançant difracció de raigs X estudia 5 carcinomes, 3 mastopaties i 1 carcinoma lobel·lar i que aconsegueix de diferenciar les calcificacions benignes de les malignes en trobar que les primeres són d'oxalat càlcic mentre que les segones són d'apatita o de fosfat càlcic.

Finalment, hom vol esmentar el treball trobat que més s'apropa, per les seves característiques, a aquest que presentem. Es tracta del dut a terme per Galkin, el 1982,¹⁸ amb microscòpia electrònica de rastreig. Hi són estudiades les mostres

¹³ ANDERSON, H. C.; Calcific diseases. *Arch. Pathol. Lab. Med.* July 1983, vol. 107: 341-348.

¹⁴ HASSLER, O., Microradiographic investigations of calcifications of de female breast. *Cancer.* 1969, 23: 1103-1109.

¹⁵ AHMED, A., Calcifications in human breast carcinomas: Ultrastructural observations. *J. Pathol.*, 1975, 117: 247-251.

¹⁶ BÜSING, G. M.; MENGES, Comparaison des microcalcifications dans les maladies prolifératives et malignes de la glande mammaire. *Senologia*, 1981, vol. 6, n.º 2, 67-71.

¹⁷ BÜSING, L. M.; KEPPLER, U., Differences in microcalcification in breast tumors *Virchows. Arch. (Pathol. Anat.)* 1981, 393, 307-313.

¹⁸ GALKIN, B. M. et al., Non Calcified breast particles a possible new marker of breast cancer. *Investigative Radiology*, 1982, 17: 119-128.

en teixit (únicament 4 casos, en els quals fa 42 preparacions), però no especifica massa la morfologia de la mostra per bé que diu que hi troba Ca i P. Així mateix també fa esment que en «esclafar» les biòpsies que contenen les microcalcificacions, troba a l'interior d'aquests microcristalls altres elements, tals com Al, Zn, etc.

En el treball present hom s'ha proposat d'aconseguir una major informació de la composició química i estructural de les microcalcificacions detectades a les tumoracions benignes i malignes. Amb les dades aconseguides hom pretén orientar-se respecte a l'origen de les microcalcificacions. Així doncs, si llur *composició és semblant* en tots els casos, hom podria acceptar que formen part d'un mecanisme *no específic*; en canvi, si la composició de les benignes és diferent de la de les malignes, hom podria pensar que hi ha un mecanisme d'acció diferent, i per tant *específic*, i això podria tenir un valor pràctic de cara al diagnòstic alhora que ajudaria a conèixer millor la biologia de la cèl·lula neoplàsica.

Fou amb la finalitat de conèixer la composició de les calcificacions mamàries, tant en tumoracions benignes com en les malignes, que hom posà a punt la utilització de mètodes de treball molt poc emprats fins a la data en aquest camp, com la microscòpia electrònica de rastreig (SEM), l'anàlisi per energia dispersiva de raigs X (EDXA) i la difracció de raigs X (XRD).

2. *Material i mètodes*

El material objecte d'estudi en aquest treball han estat les calcificacions observades a les mames de pacients que, per algun tipus de patologia, acudiren al Dispensari de Patologia Mamària de l'Hospital Clínic de Barcelona. En tots els casos fou aplicada una mateixa metodologia. El protocol fou establert prèviament per a una sèrie de paràmetres (clínic, radiològic, histològic). Les anàlisis específiques, en tractar-se d'una primícia en aquest camp, requerien, en una primera etapa, l'establiment d'unes normes d'estudi, i posteriorment caldria detallar el protocol.

2.1. *Material*

Es tracta de 31 casos de pacients afectades d'algun tipus de patologia mamària i que van necessitar d'intervenció quirúrgica.

Podem desglosar aquests 31 casos en:

1 cas de mama normal, 8 casos de pacients que presentaven algun tipus de patologia benigna amb calcificacions i 22 casos de tumoracions malignes de mama d'entre les quals 5 no presentaven calcificacions però van servir com a control.

Les microcalcificacions observades a tots els casos malignes estudiats presentaven una consistència pastosa que, en tocar-la amb la mà, es desfeia entre els dits. En canvi, les benignes eren dures al tacte.

2.2. Mètodes

Hom dugué a terme per a totes les pacients un protocol clínic, radiològic i anatomo-patològic, a més dels estudis específics, que són descrits breument a continuació:

2.2.1. *Protocol clínic:* hom hi valora només els paràmetres referents a l'edat, T N M (T, dimensió clínica de la tumoració; N, adenopaties axil·lars, i M, presència o no de metastasi al moment d'ésser detectat el càncer de mama) i localització clínica de la tumoració.

Fig. 1. CALCIFICACIONS BENIGNES

1. Vasculars
2. Fibro-adenoma
3. Microquist
4. Galactofòriques
5. Distròfiques

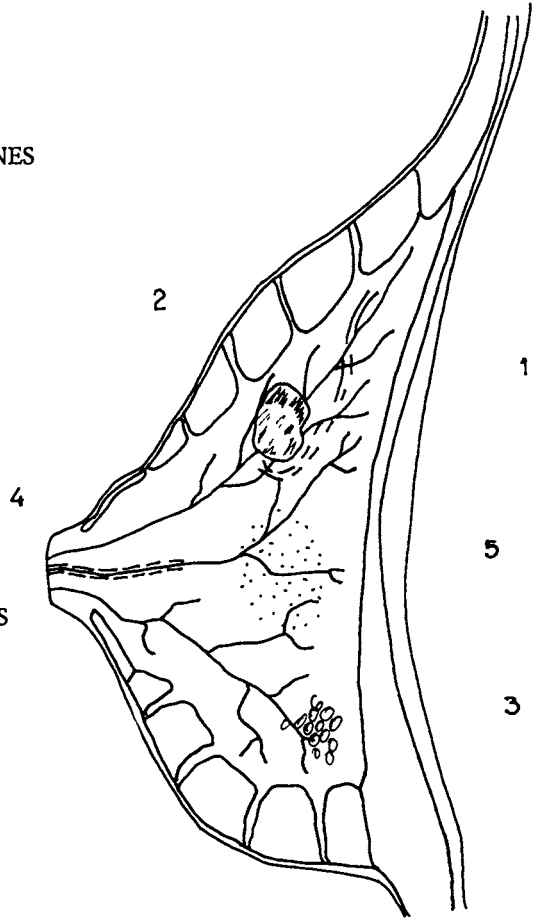


Fig. 1. BENIGN CALCIFICATIONS

1. Vascular
2. Fibroadenoma
3. Microcyst
4. Galactophorous
5. Dystrophic

2.2.2. *Protocol radiològic:* Mamografia, atenint-se a:

- dimensió radiològica de la tumoració
- tipus de mama que presenta la pacient:

- greixosa
- amb abundant teixit glandular, etc.
- tipus de tumor:
 - nòdul estrellat
 - sense tumoració, només microcalcificacions, etc.
- dimensió de les calcificacions
- nombre de calcificacions per centímetre
- localització de les calcificacions respecte del tumor.

Fig. 2. CALCIFICACIONS MALIGNES

1. Grup petit, associat o no a nòdul palpable
2. Microcalcificacions en paquets

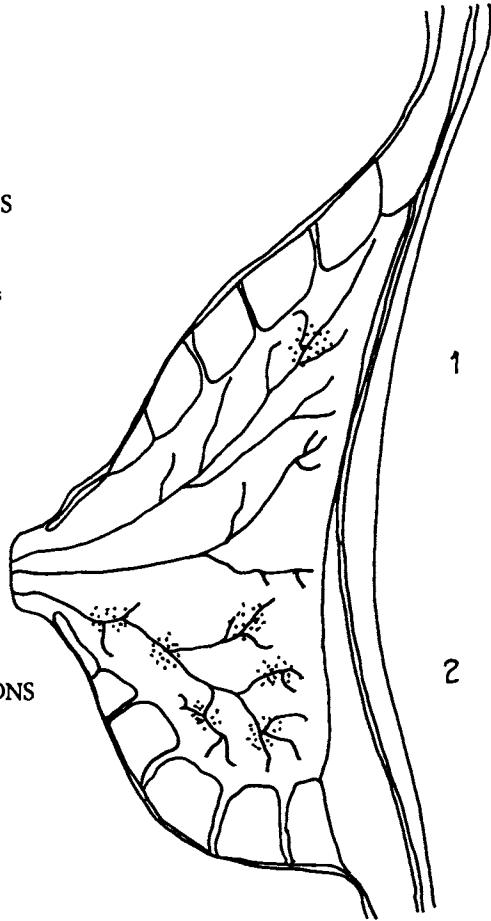


Fig. 2. MALIGNANT CALCIFICATIONS

1. Small group associated or not with a palpable nodule
2. Microcalcifications in clusters

(A les figures 1 i 2 hom observa l'esquema de com es troben les calcificacions en una mamografia.)

2.2.3. Protocol anatomo-patològic:

Totes les peces operatòries foren estudiades, tal com hom fa habitualment, amb el microscopi òptic, per tal d'establir el diagnòstic definitiu de la lesió.

2.2.4. Microanàlisi SEM i EDXA:

Els mètodes utilitzats foren la microanàlisi EDX (energia dispersiva de raigs X) acoblada a un microscopi electrònic de rastreig (SEM). Aquestes tècniques permeteren l'estudi de la mostra en el seu medi, és a dir, la calcificació envoltada del teixit orgànic. D'altra banda, hom aconseguí de separar la matèria orgànica de la inorgànica de tal manera que hom pogué conèixer els cristalls per separat.

No hi són especificats els principis de funcionament del SEM ni de l'EDXA ja que es poden trobar a la literatura,¹⁹ però sí que hom vol detallar els diferents processaments de les mostres per tal d'arribar a obtenir resultats satisfactoris en ambdós estudis.

Preparació de la mostra:

Hom divideix aquest punt en dos apartats diferents:

a) Preparació de la mostra amb tots els seus components (teixit i concrecions).

b) Aïllament de les concrecions contingudes en el teixit, per dissolució de la matèria orgànica.

a) La preparació de la mostra objecte d'aquest estudi requereix una sèrie de condicionaments especials puix que es tracta d'una mostra biològica.

La primera cosa que cal fer és assecar la mostra. Es tracta de submergir una porció, d'uns $0,5 \times 0,5$ cm del teixit a estudiar, dins diferents concentracions d'acetona, progressivament de 60, 70, 80, 90 i 96 % restant en cada una un temps mínim de 15 minuts.

Tot aquest procés d'assecatge pretén de substituir l' H_2O i fluids líquids existents a la mostra, els quals impedirien una bona visualització, per acetona en principi i, posteriorment, a la cambra de Punt Crític, per CO_2 , primer líquid i després gasós, cosa que és aconseguida amb una pressió de 81,6 atmosferes.²⁰ Un cop el teixit és ben eixut, el colloquem en un portaobjectes de grafit per a SEM.

¹⁹ TURA I SOTERAS, J. M. La física microanalítica: Una recerca fonamental com a suport de la recerca aplicada. *Butlletí de la Societat Catalana de Ciències Físiques, Químiques i Matemàtiques*. Segona època, 1984, vol. 2, n.º 3, 241-249.

²⁰ FROMME, H. G.; PFEFFERKORN, G.; PFAUTSCH, M.; BYSTRICKY, V.; *Erfahrungen mit der «Kritischen Punkt» Trocknung als Präparationsmethode für die Raster-Elektronenmikroskopie*. Beitr. Elektronenmikroskopischen Direktabbildung von Oberflächen, 1972, vol. 5, 893-901.

b) La segona tècnica, l'aïllament de les concrecions, consisteix a digerir la matèria orgànica tot deixant únicament la part inorgànica. Hom ho aconsegueix amb una concentració a l'1 % de potassa aquosa. Hom la deixa durant un temps (diversos dies, depenent de la mida de la mostra) dins una estufa a 50 °C fins a la desaparició total del teixit, restant tan sols un pòsit blanquinós al fons del recipient. Aquest és rentat 4 o 5 cops amb aigua destil·lada i centrifugant-ho cada vegada.

En acabar aquest procés, hom recull el pòsit que resta al fons del tub centrifugat i hom en diposita una gota sobre un porta de grafit.

Tant les mostres de teixit com les de les concrecions aïllades són ja a punt perquè, un cop introduïdes dins la cambra de buit del SEM, siguin observades directament a diversos augments (fins a 5.000 x, en el nostre cas) i siguin analitzades amb EDX. Quan hom treballa a grans augments, amb la finalitat d'obtenir una millor qualitat a les imatges, cal recobrir la mostra amb or o bé amb grafit.

2.2.5. *Difracció de raigs X*

Un cop sotmeses les biòpsies al procés de digestió del teixit orgànic, una part dels cristalls aïllats foren estudiats per difracció de raigs X (XRD) amb una càmera Guinier de Wolf, marca Stoe, la qual portava incorporat un monocromador de grafit.

3. *Resultats*

Hom divideix aquest apartat en dues parts:

- a) Casuística.
- b) Resultats globals.

Aquest treball ha consistit en l'estudi morfològic de les microcalcificacions mamàries i llur entorn. Presentem una gran part de la iconografia obtinguda fins ara, i diem fins ara perquè aquesta línia d'investigació continuarà més endavant amb altres casos i altres mètodes.

Hom ordena la casuística en tres grups:

1. Tumors de mama malignes amb microcalcificacions.
2. Tumors de mama benignes amb calcificacions.
3. Casos de control, constituïts per tumoracions de mama sense calcificacions.

3.1. Casuística

3.1.1. Tumors de mama malignes amb microcalcificacions

Hom en presenta la iconografia més representativa.

Cas núm. 1 (Figures 3)

Clinica: Pacient de 76 anys que presenta una tumoració a la mama dreta compatible clínicament i radiològica amb neoplàsia de la mama.

Anatomia patològica: Carcinoma ductal infiltrant.

El material radioopac és de consistència tova.

Case 1 (Figures 3)

History: 76 year old patient with tumour in right breast clinically and radiologically compatible with breast neoplastia.

Pathology: Infiltrating ductal carcinoma.

The radiopaque material was of a soft consistency.

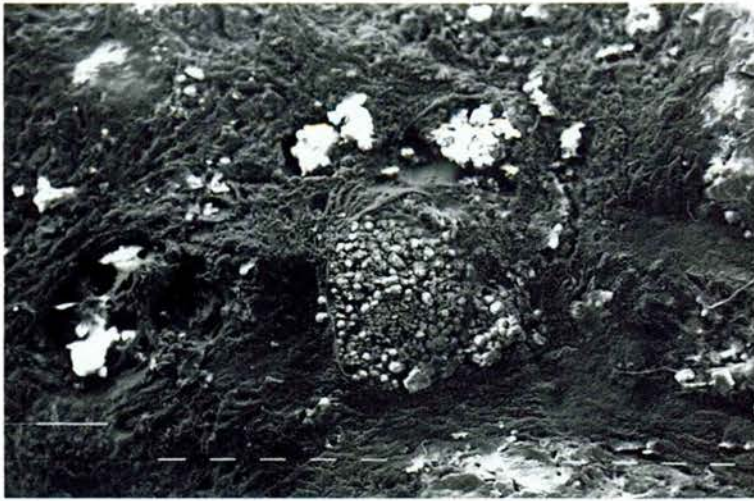


Fig. 3 a. - Hom pot distingir diversos conductes en el teixit mamari, el més gran dels quals mesura $750 \times 625 \mu\text{m}$, essent la concreció continguda al seu interior de la mateixa mida. Fotomicrografia a 40 x. Marques: $100 \mu\text{m}$.

Fig. 3 a. - Different ducts in breast tissue, the biggest of which measures $750 \times 625 \mu\text{m}$. The ducts are full of crystals. Photomicrography (x 40). Markers: $100 \mu\text{m}$.

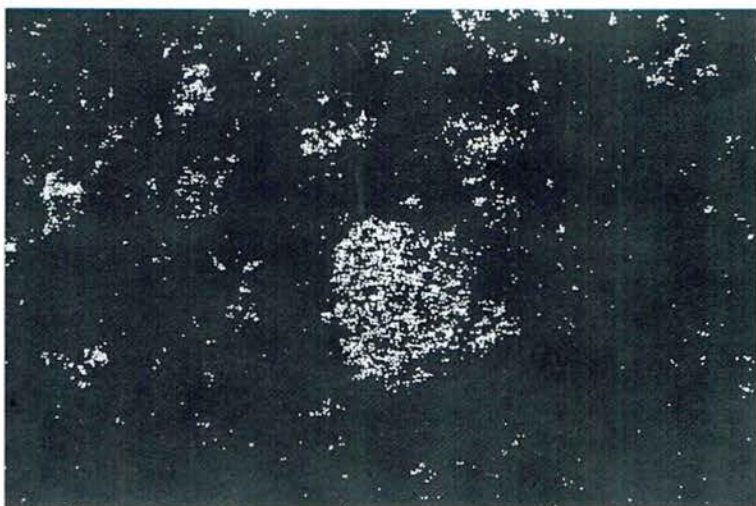


Fig. 3 b. - Mapping de fotons de raigs X característics del Ca. Correspon a la mateixa zona que 3 a.

Fig. 3 b. - Mapping of X-rays which are characteristic of Ca. It corresponds to the same zone as 3 a.



Fig. 3 c. - Mapping de fotons característics del P. Correspon a la mateixa zona que 3 a.

Fig. 3 c. - Mapping characteristic of P. It corresponds to the same zone as 3 a.



Fig. 3 d. - Aquesta zona correspon a un conducte a major augment. (x 160). Marques: 10 μ m.

Fig. 3 d. - Close-up of a duct. (x 160). Markers: 10 μ m.

Cas núm. 2 (Figures 4)

Clinica: Pacient de 47 anys que presenta una tumoració a la mama esquerra, quadrant superior extern.

Anatomia patològica: Carcinoma ductal infiltrant, amb una adenopatia envaïda.

La consistència del material radioopac és tova.

Case 2 (Figures 4)

History: 47 year old patient with a tumour in left breast, outer upper sector.

Pathology: Infiltrating ductal carcinoma with affected adenopathy. The consistency of radiopaque material was soft.

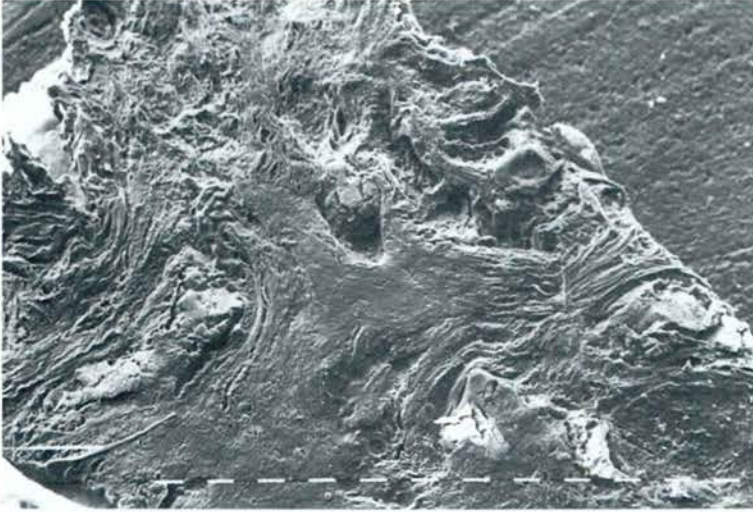


Fig. 4 a. - Rastreig d'una secció amb càncer de mama. Hom hi distingeix conductes dins els quals hi ha una concreció. (x 40). Marques: 100 μ m.

Fig. 4 a. - Secondary electron scan of section of breast tumour. Ducts with concentration of crystals (x 40). Markers: 100 μ m.



Fig. 4 b. - Mapping de Ca corresponent a la mateixa zona de la fig. 4 a.

Fig. 4 b. - Ca mapping of same zone as Fig. 4 a.



Fig. 4 c. - Mapping de P de la mateixa zona de la fig. 4 a.

Fig. 4 c. - P mapping of same zone as Fig. 4 a.

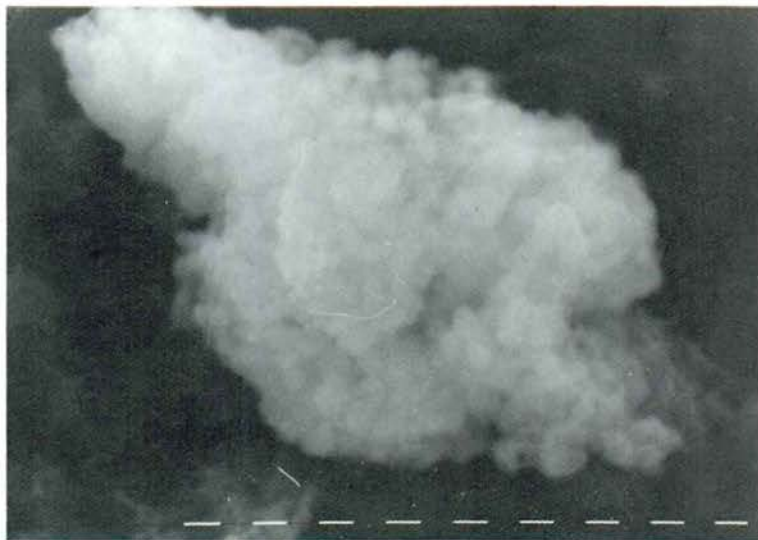


Fig. 4 d. - Correspon a la mostra tractada amb potassa aquosa. Hom hi observa els cristalls, formant acumulacions que mesuren uns $0,8 \times 0,8 \mu\text{m}$. ($\times 5.000$). Marques: $1 \mu\text{m}$.

Fig. 4 d. - Sample treated with potassium hydroxide. Crystals forming accumulations which measure $0,8 \times 0,8 \mu\text{m}$ ($\times 5.000$) Markers: $1 \mu\text{m}$.



Fig. 4 e. - Mapping de Ca de la fig. 4 d.
Fig. 4 e. - Ca mapping as for Fig. 4 d.



Fig. 4 f. - Mapping de P de la fig. 4 d.
Fig. 4 f. - P mapping as for Fig. 4 d.

Cas núm. 3 (Figures 5)

Clínica: Pacient de 41 anys que presenta una zona amb induració a la mama esquerra i que es correspon amb una zona de microcalcificacions a la mamografia.

Anatomia patològica: Carcinoma ductal infiltrant, amb 16 adenopaties, de les quals 12 eren envaïdes.

Case 3 (Figures 5)

History: 41 year old patient with hardening of left breast which corresponds to zone with microcalcifications in mammography.

Pathology: Infiltrating ductal carcinoma with 16 adenopathies of which 12 were affected.

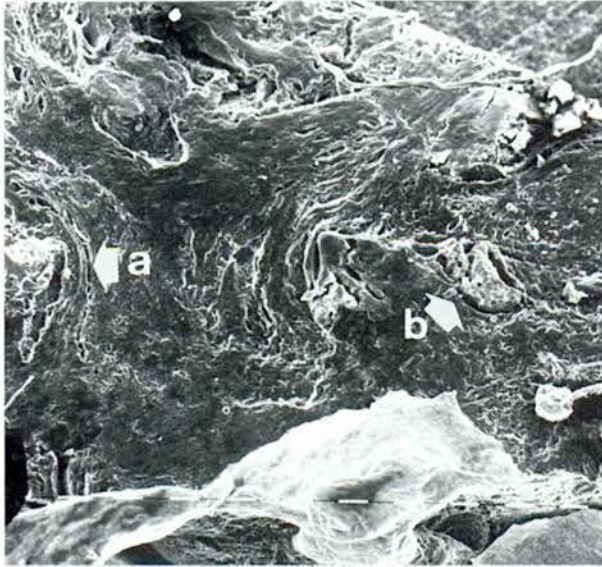


Fig. 5 a. - Hom hi observa diversos conductes, el més gran dels quals, de $800 \times 100 \mu\text{m}$ (fletxa a) presenta al seu interior una concreció de la mateixa mida, mentre que el conducte de menor dimensió, de $300 \times 200 \mu\text{m}$ (fletxa b) conté una concreció de $220 \times 120 \mu\text{m}$. (x 40). Marques: $100 \mu\text{m}$.

Fig. 5 a - We observed different ducts the biggest of which was $800 \times 100 \mu\text{m}$. (Arrow a) shows crystal concentration of same size inside the ducts whereas a smaller duct, $300 \times 200 \mu\text{m}$ (arrow b) contains a concentration of $200 \times 120 \mu\text{m}$. (x 40). Markers: $100 \mu\text{m}$.



Fig. 5 b. - Mapping de fotons de Ca correspondent a la mateixa zona de la fig. 5 a.

Fig. 5 b. - Ca mapping of same zone as Fig. 5 a.

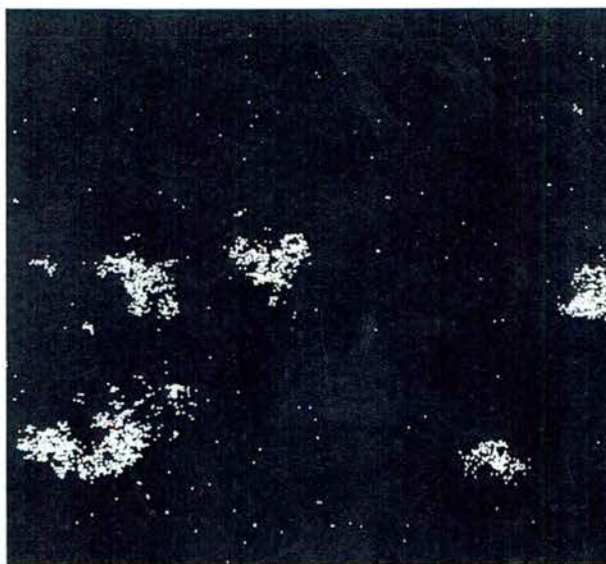


Fig. 5 c. - Mapping de P de la mateixa zona de la fig. 5 a.

Fig. 5 c. - P mapping of same zone as Fig. 5 a.

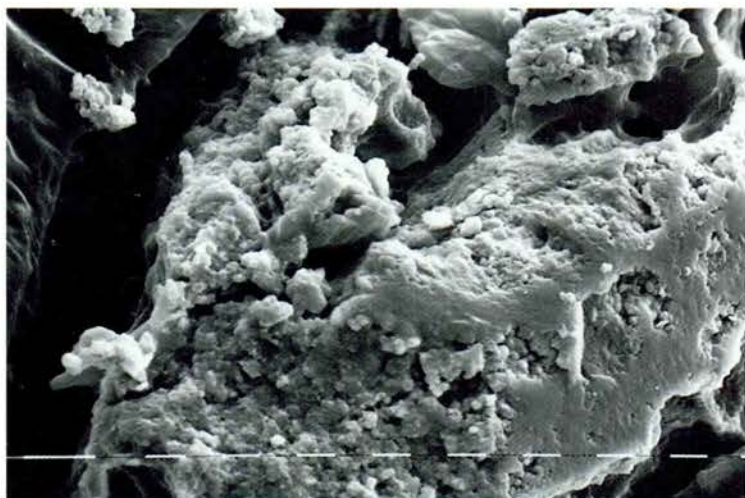


Fig. 5 d. - La mateixa preparació que 5 a però a més augments. Hom hi visualitza un conducte longitudinal. (x 160). Marques: 100 μm .

Fig. 5 d. - Same sample as for 5 a but with increased magnification Longitudinal duct was observed (x 160). Markers: 100 μm .

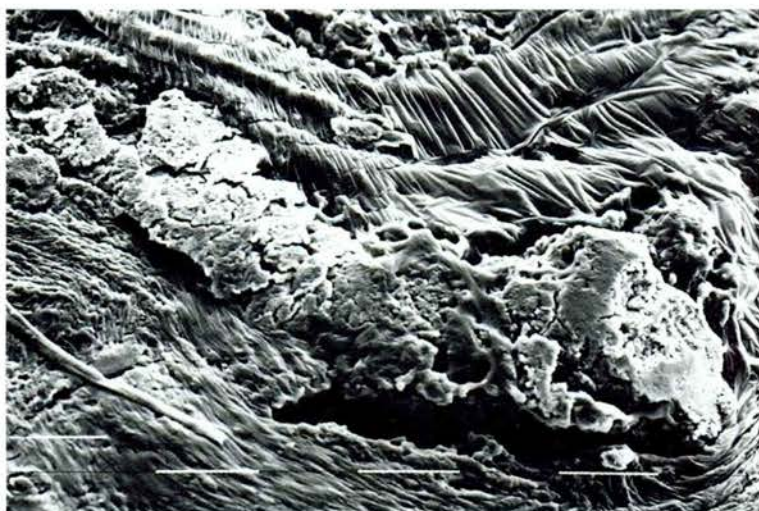


Fig. 5 e. - La mateixa zona que 5 d però, encara a més augments. (x 640). Marques: 10 μm .

Fig. 5 e. - Same zone as for 5 d but with increased magnification (x 640). Markers: 10 μm .



Fig. 5 f. - La mateixa zona de la fig. anterior, a 1.250 augments. Hom hi visualitza esfèrules d'apatita. Marques: 10 μm .

Fig. 5 f. - The same zone as for Fig. 5 e (x 1.250). Microspheroids of apatite are observed. Markers: 10 μm .

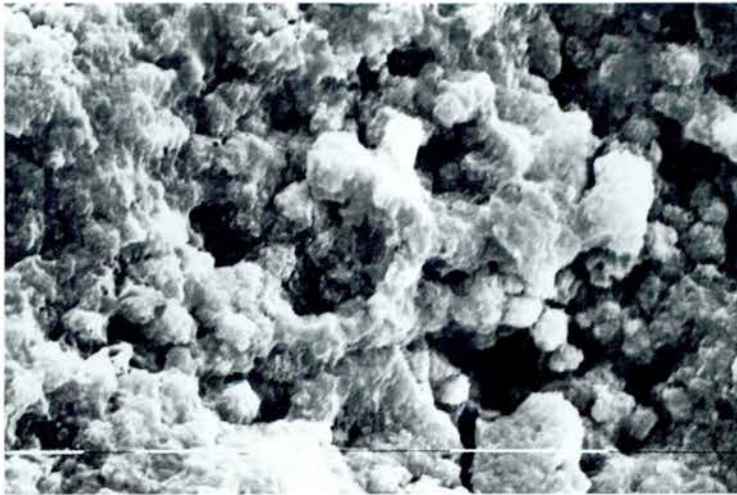


Fig. 5 g. - Hom hi distingeix cada cop més bé les esfèrules que constitueixen la concreció. (x 2.500). Marques: 10 μm .

Fig. 5 g. - Microspheroids constituting the crystal concentration can be observed with more clarity. (x 2.500). Markers: 10 μm .



Fig. 5 b. - Hom hi diferencia perfectament les esfèrules que donen resposta al Ca i al P. (x 5.000). Marques: 1 μ m.

Fig. 5 b. - Microspheroids with response to Ca and P clearly differentiated (x 5.000).
Markers: 1 μ m.



Fig. 5 i. - Es tracta de cristalls ja aïllats de la matèria orgànica. Hom els pot veure en dues formes, esfèrica i polièdrica. (x 2.500). Marques: 1 μ m.

Fig. 5 i. - Crystals isolated from organic material. Two shapes observed: spherical and polyhedral. (x 2.500). Markers: 1 μ m.

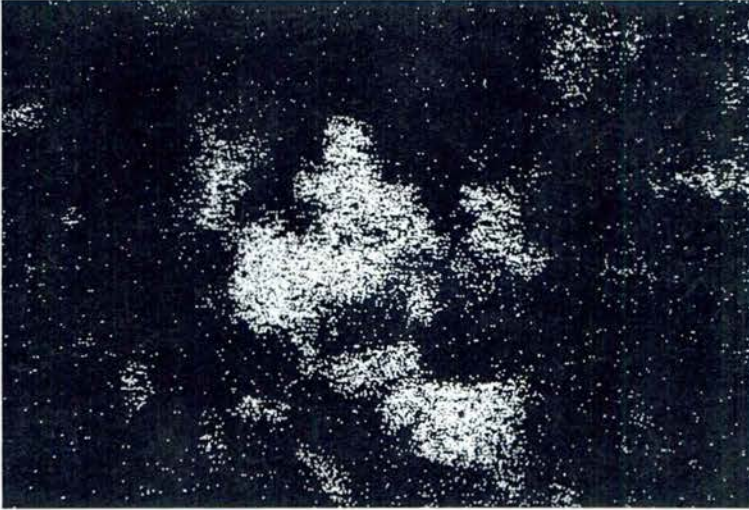


Fig. 5 j. - Mapping de Ca dels cristalls anteriors.

Fig. 5 j. - Ca mapping of the above crystals.

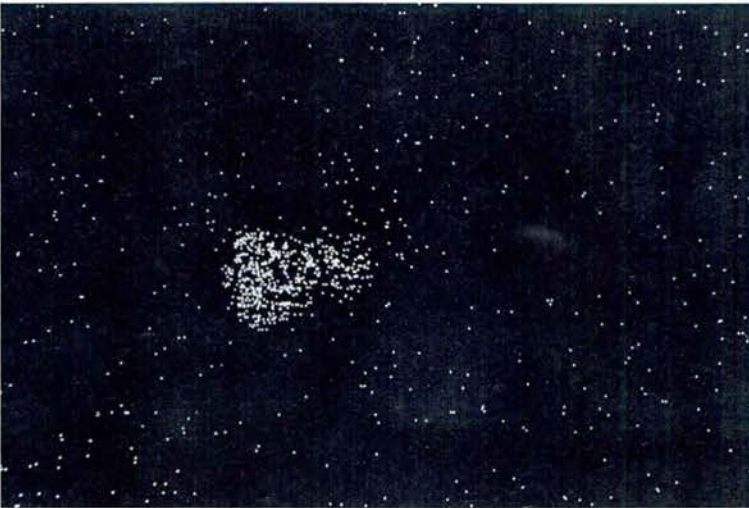


Fig. 5 k. - Mapping de P de la mateixa preparació que 5 i. Només responen al P els cristalls esfèrics.

Fig. 5 k. - P mapping of the same sample as Fig. 5 i. Spherical crystals respond only to P.

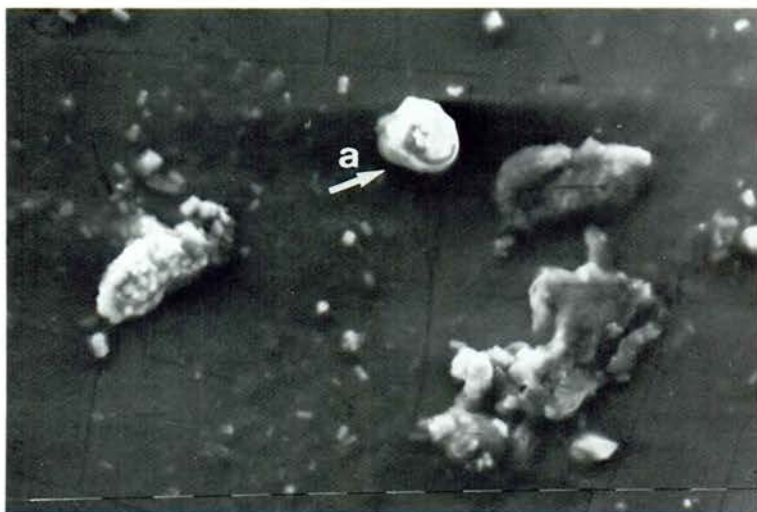


Fig. 5 l. - Preparació de cristalls aïllats i amb una esfera central (a) de $24 \times 24 \mu\text{m}^2$. (x 640).
 Marques: $10 \mu\text{m}$.

Fig. 5 l. - Sample of isolated crystals. Centre (a) $24 \times 24 \mu\text{m}$ (x 640).
 Markers: $10 \mu\text{m}$.

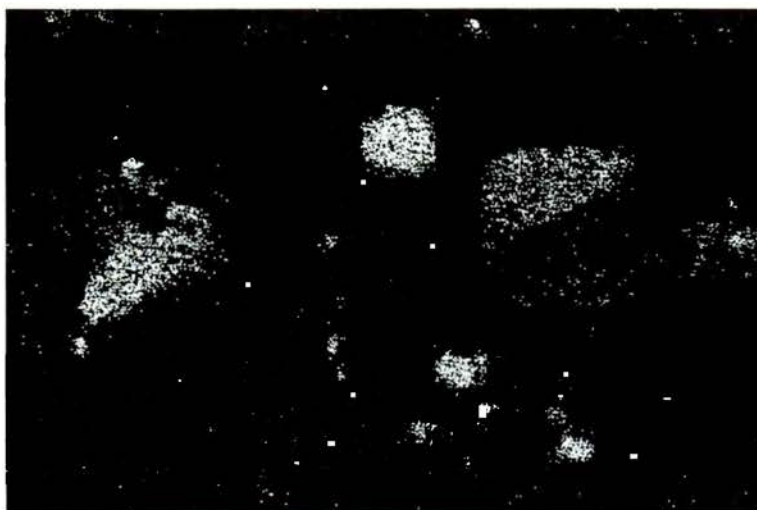


Fig. 5 m. - Mapping de Ca de la preparació anterior.

Fig. 5 m. - Ca mapping of the above sample.

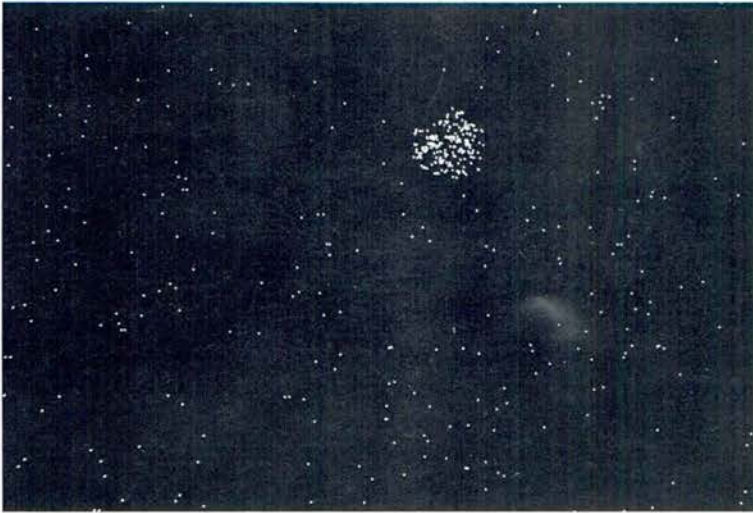


Fig. 5 n. - Mapping de P de la mateixa zona de la fig. 5 l.

Fig. 5 n. - P mapping of same zone as for Fig. 5 l.

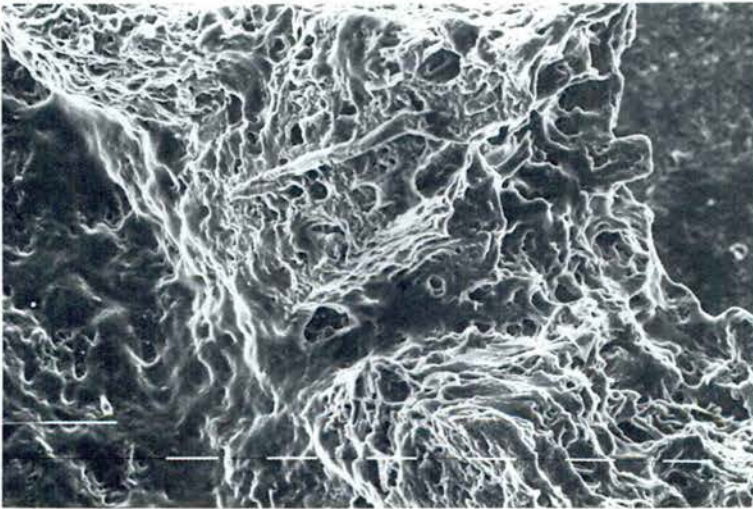


Fig. 5 o. - Cristall amb hàbit octaèdric de $8 \times 8 \mu\text{m}$, amb resposta a Ca solament. Es tracta d'oxalat càlcic anhidre ($\times 5.000$). Marques: $1 \mu\text{m}$.

Fig. 5 o. - Anhydrous oxalate crystal with octahedral habit $8 \times 8 \mu\text{m}$ with response to Ca only ($\times 5.000$). Markers: $1 \mu\text{m}$.

Cas núm. 4 (Figures 6)

Clinica: Pacient de 59 anys que presenta una tumoració a la zona retro-areolar de la mama dreta.

Anatomia patològica: Carcinoma ductal infiltrant, amb àrees de comedo-carcinoma.

El material radioopac és de consistència tova.

Case 4 (Figures 6)

History: 59 year old patient with a tumour in retro-areolar zone of right breast.

Pathology: Infiltrating ductal carcinoma with areas of comedo-carcinoma. The radiopaque material was of a soft consistency.

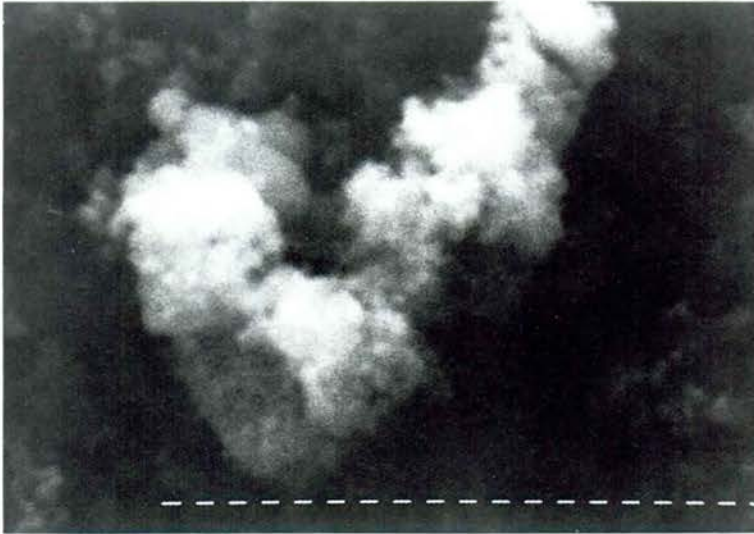


Fig. 6 a - Correspon a cristalls aïllats que formen un conglomerat de cristalls petits amb resposta a Ca i P. (x 2.500). Marques: 1 μ m.

Fig. 6 a. - Isolated crystals forming a conglomerate of small crystals with response to Ca and P. (x 2,500). Markers: 1 μ m.

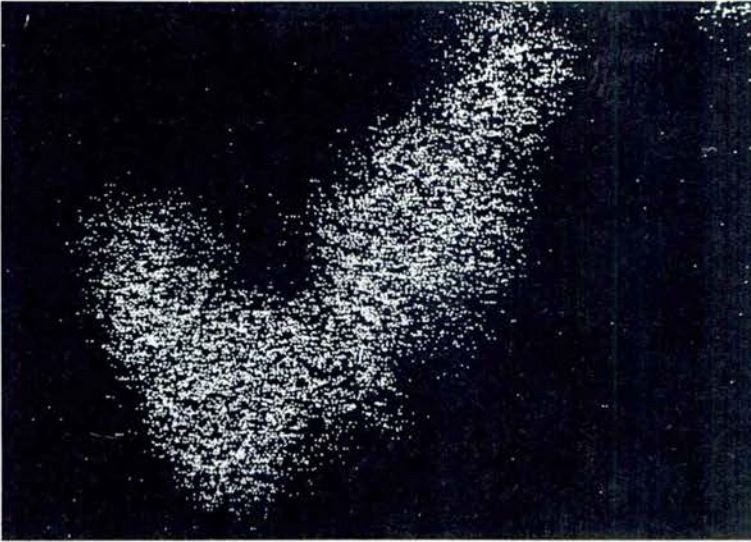


Fig. 6 b. - Mapping de Ca de la fig. 6 a.

Fig. 6 b. - Ca mapping of Fig. 6 a.

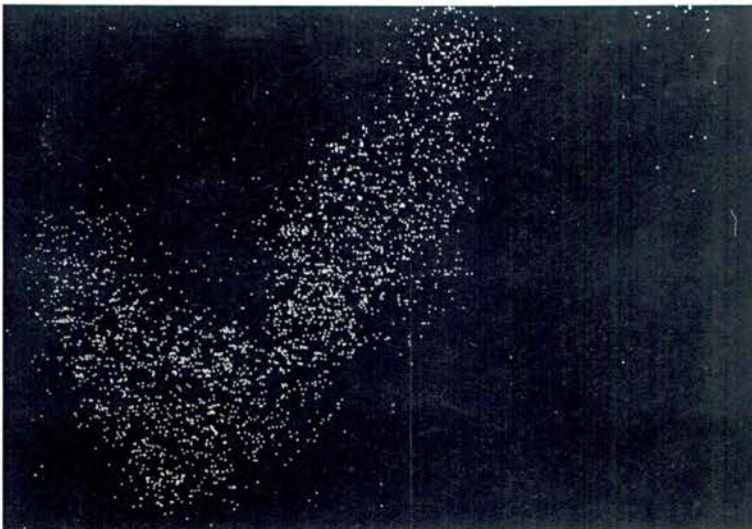


Fig. 6 c. - Mapping de P de la mateixa zona.

Fig. 6 c. - P mapping of same zone.

Cas núm. 5 (Figures 7)

Clinica: Pacient de 53 anys amb tumoració a la mama dreta. Com tots els casos, presenta tumoració a la mamografia.

Anatomia patològica: Carcinoma ductal infiltrant. De les 15 adenopaties extirpades, hom en trobà 6 d'envaïdes.

La consistència del material radioopac és tova.

A més a més de fer els estudis rutinaris, com en els altres casos, és a dir, estudi de la mostra a 40 x amb el SEM i mappings de Ca i de P, també és estudiada a 640 x, cosa que permet de trobar conductes de 50 μm amb concrecions a l'interior i que donen resposta al Ca i al P.

En aquest cas hom presenta la mostra de cristalls aïllats de la matèria orgànica.

Case 5 (Figures 7)

History: 53 year old patient with tumour in right breast. Mammography revealed tumour.

Pathology: Infiltrating ductal carcinoma. Of the 15 adenopathies 6 were affected. The radiopaque material was of a soft consistency.

In addition to the routine studies performed as in the other cases, i.e., SEM EDX analysis at (x 40) and mappings of Ca and P, a study at (x 640) was carried out which revealed ducts of 50 μm with crystal concentrations in-

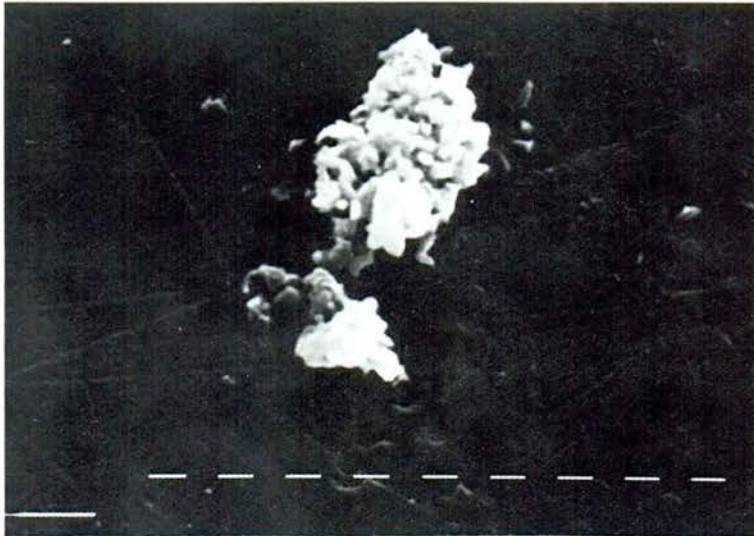


Fig. 7 a. - Es tracta de cristalls que només donen resposta al Ca. (x 5.000). Marques: 1 μm .

Fig. 7 a - Crystals with response to Ca only (x 5.000). Markers: 1 μm .

side with response to Ca and P. The sample of crystals were isolated from the organic material.

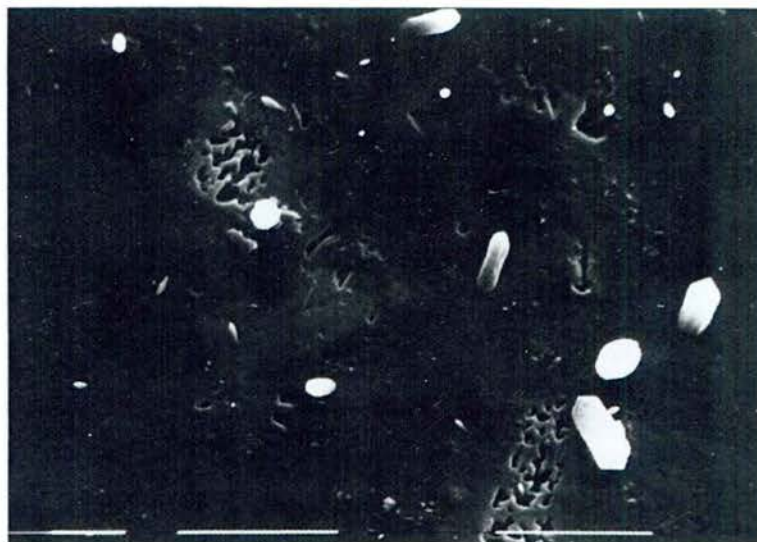


Fig. 7 b. - Cristalls isolats, la majoria dels quals mesuren 1,85 μm de grandària. (x 2.500). Marques: 10 μm .

Fig. 7 b. - Isolated crystals most of which measure 1,85 μm . (x 2.500).
Markers: 10 μm .

Cas núm. 6 (Figures 8)

Clínica: Pacient de 55 anys que presenta una tumoració a la mama esquerra.

Anatomia patològica: Carcinoma ductal infiltrant, amb àrees de comedo-carcinoma. De les 21 adenopaties, 6 en són afectades.

La consistència del material radioopac és tova.

Hom estudia la preparació a 40 x i en fa mappings de Ca i de P.

Case 6 (Figures 8)

History: 55 year old patient with tumour in the left breast.

Pathology: Infiltrating ductal carcinoma with areas of comedo-carcinoma. Six of the twenty-one adenopathies were affected. The radiopaque material was of a soft consistency. The study was performed (x 40) and Ca and P mappings were carried out.

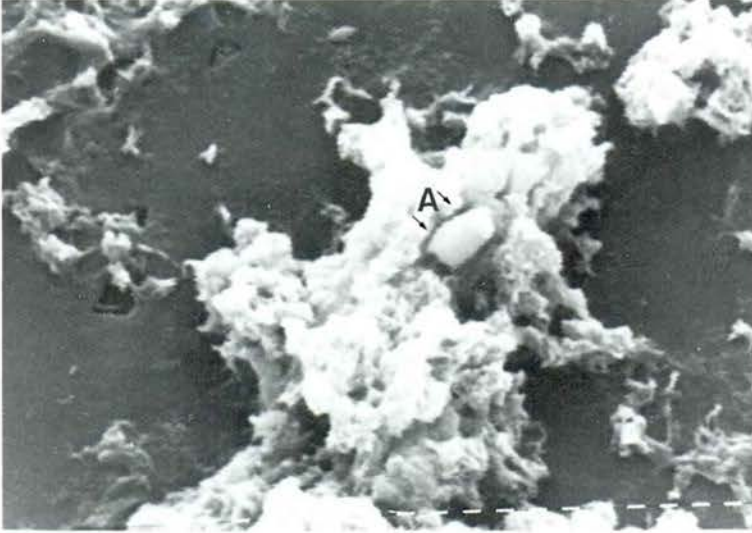


Fig. 8 a. - Cristalls aïllats que presenten un cristall central (A) de 3 μm que dona resposta al P i al Fe. (x 2.500). Marques: 1 μm .

Fig. 8 a. - Isolated crystals of which the crystal in the center (a) was 3 μm with response to P and Fe (x 2.500). Markers: 1 μm .

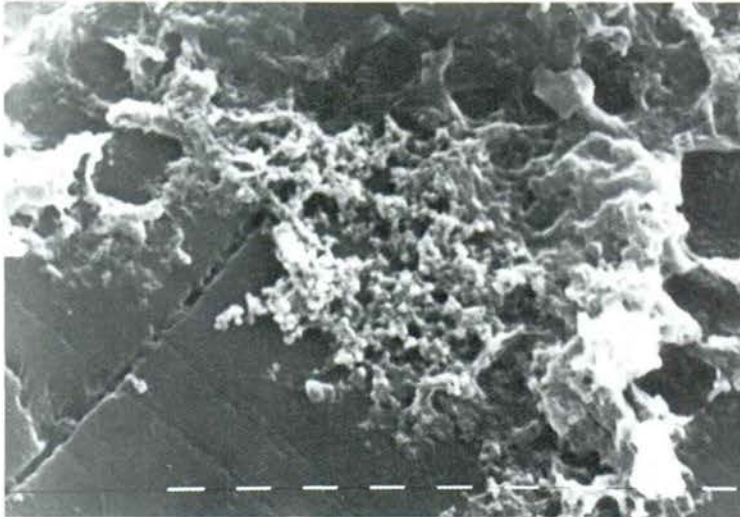


Fig. 8 b. - Cristalls aïllats els més grans dels quals mesuren 0,33 μm de diàmetre, mentre que els més petits mesuren 0,16 μm . Hom hi observa molts cristalls amb resposta al Ca i al P. (x 5.000). Marques: 1 μm .

Fig. 8 b. - Isolated crystals the biggest of which measure 0,33 μm in diameter whereas the smallest mesure 0,16 μm . Response to Ca and P. (x 5.000). Markers: 1 μm .

Cas núm. 7 (Figures 9)

Clinica: Pacient de 72 anys que presenta una tumoració a la mama esquerra.

Anatomia patològica: Carcinoma ductal infiltrant, amb àrees de comedocarcinoma.

No presenta adenopaties envaïdes.

El material radioopac és de consistència tova.

Hom fa l'estudi de la mostra a 40 x, amb els seus corresponents mappings de Ca i P, alhora que posa cura en l'estudi dels conductes o motlles.

Case 7 (Figures 9)

History: 72 year old patient with tumour in the left breast.

Pathology: Infiltrating ductal carcinoma with areas of comedocarcinoma. No affected adenopathies. The radiopaque material was of a soft consistency. Sample was studied (x 40) and the corresponding Ca and P mappings were performed.

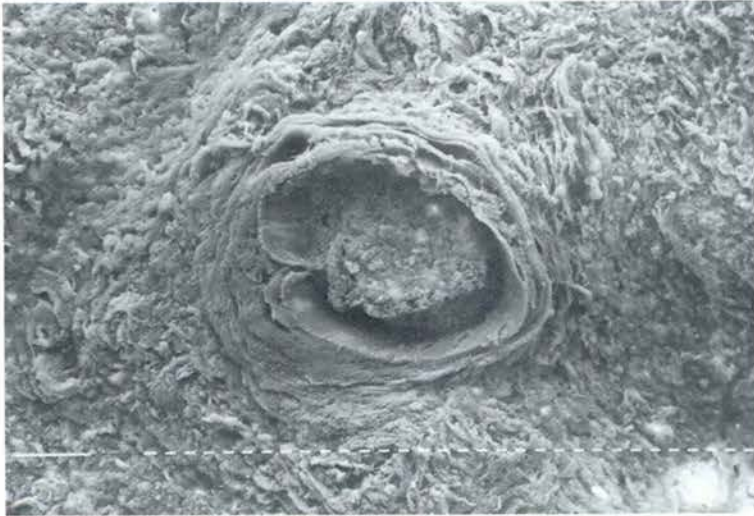


Fig. 9 a. - Mostra metallitzada en la qual hom pot observar amb claredat un conducte, de $400 \times 150 \mu\text{m}$, que conté una concreció a l'interior. (x 160). Marques: $10 \mu\text{m}$.

Fig. 9 a. - Coated sample clearly revealing a duct, $400 \times 145 \mu\text{m}$, containing a crystal concentration (x 160). Markers: $10 \mu\text{m}$.



Fig. 9 b. - Detall de la fotomicrografia anterior. (x 640). Marques: 10 μm .

Fig. 9 b. - Close up of above (x 640). Markers: 10 μm .

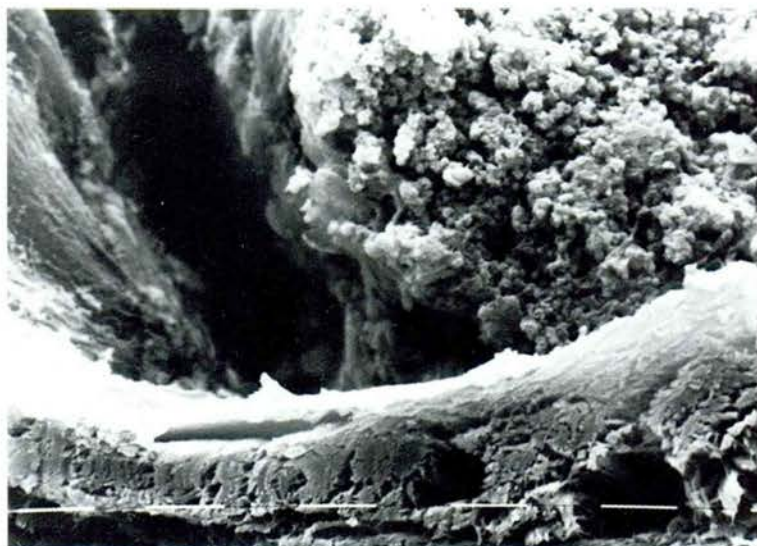


Fig. 9 c. - Detall de la paret del ducte (que se'ns mostra tallat) i de la concreció. Hom hi distingeix cristalls esfèrics amb resposta al Ca i al P. Els diàmetres dels cristalls mesuren entre 2,5 μm i 1,66 μm . (x 1.250). Marques: 10 μm .

Fig. 9 c. - Close up of wall of duct (section of sample) and of the crystal concentration. Spherical crystals with response to Ca and P detected. Crystal diameters measured between 2,5 μm and 1,66 μm (x 1.250). Markers: 10 μm .

Cas núm. 8 (Figures 10)

Clínica: Pacient de 72 anys que presenta una tumoració maligna de mama.

Anatomia patològica: Carcinoma ductal infiltrant, amb àrees de comedo-carcinoma.

El material radioopac és de consistència tova.

Hom fa l'estudi de la mostra a 40 x, els mappings de Ca i de P i l'estudi dels cristalls aïllats.

Case 8 (Figures 10)

History: 72 year old patient with malignant tumour in breast.

Pathology: Infiltrating ductal carcinoma with areas of comedo-carcinoma. The radiopaque material was of a soft consistency. Sample (x 40), Ca and P mappings and study of isolated crystals were performed.



Fig. 10. - Mostra metallitzada en la qual hom observa un conducte o motlle, de 220 μm de diàmetre, ple d'una concreció.

Fig. 10. - Gold coated sample with a duct of cavity mold with a diameter of 220 μm containing a crystal concentration.

Cas núm. 9 (Figures 11)

Clínica: Pacient de 75 anys que presenta una tumoració maligna a la mama esquerra.

Anatomia patològica: Carcinoma ductal infiltrant, que afecta deu adenopaties de les onze que hi ha.

El material radioopac és de consistència tova.

Hom estudia la mostra a 400 x i en fa els mappings de Ca i de P.

Case 9 (Figures 11)

History: 75 year old patient with a malignant tumour in the left breast.

Pathology: Infiltrating ductal carcinoma. Ten out the eleven adenopathies were affected. The radiopaque material was of a soft consistency. The sample was studied (x 400) and the Ca and P mappings were performed.

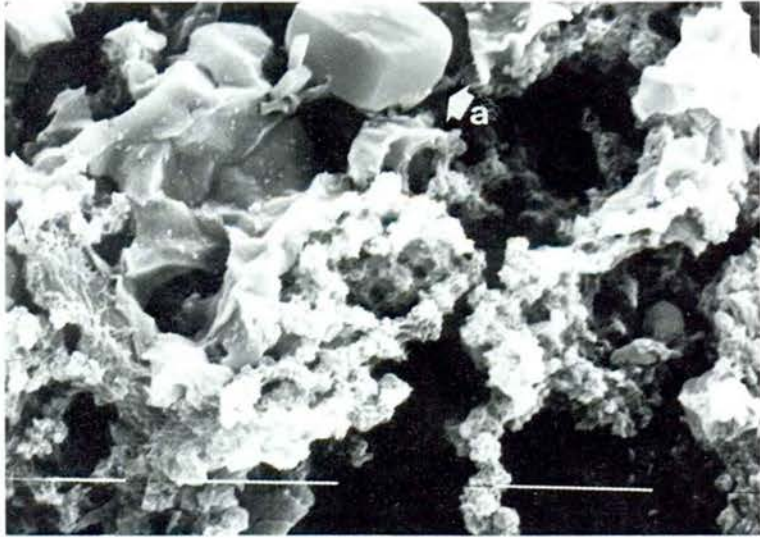


Fig. 11. - Mostra dels cristalls aïllats. A la part superior hom distingeix un cristall (a) de grans dimensions $9,61 \times 3,84 \mu\text{m}$. La resta de la mostra apareix constituïda per múltiples acumulacions de petites boletes amb resposta al Ca i al P. (x 2.500). Marques: $10 \mu\text{m}$.

Fig. 11. - Sample of isolated crystals. Upper part shows a large crystal, $9,61 \times 3,84 \mu\text{m}$ in size. The rest of the sample appears to be constituted of multiple accumulations of small balls with response to Ca and P. (x 2.500). Markers: $10 \mu\text{m}$.

3.1.2. Tumors de mama benignes amb calcificacions.

Hom en presenta la iconografia més representativa.

Cas núm. 10 (Figures 12)

Clínica: Pacient de 55 anys que presenta una tumoració de mama amb caràcters benignes.

Anatomia patològica: Papiloma intracanalicular.

El material radioopac és de consistència dura.

Case 10 (Figures 12)

History: 55 year old patient with benign breast tumour.

Pathology: Intraductal papiloma.

The radiopaque material was of a hard consistency.

Hom observa que, a aquest nivell, no hi ha massa diferències entre les preparacions de tumoracions malignes i benignes.

At this level of observation there were not many differences between the samples of malignant and benign tumours.

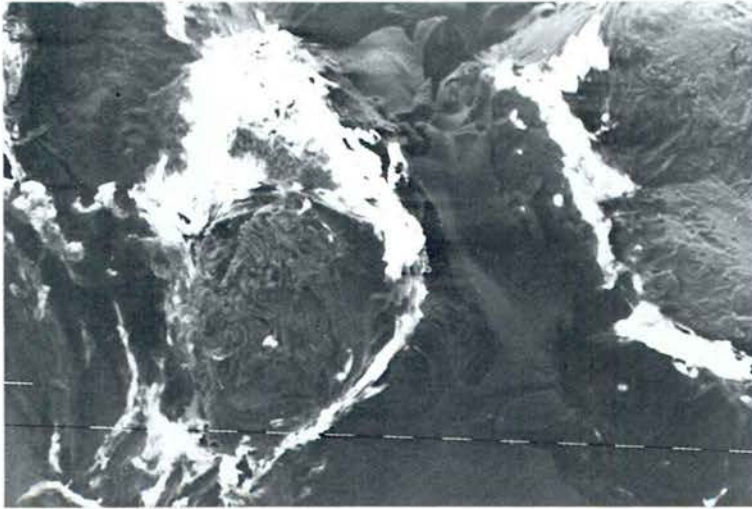


Fig. 12 a. - Biòpsia de la tumoració benigna. Zona amb concrecions. Mostra sense metallitzar. (x 40). Marques: 100 μ m.

Fig. 12 a. - Biopsy of benign tumour. Zone with crystal concentration. Uncoated sample (x 40). Markers: 100 μ m.

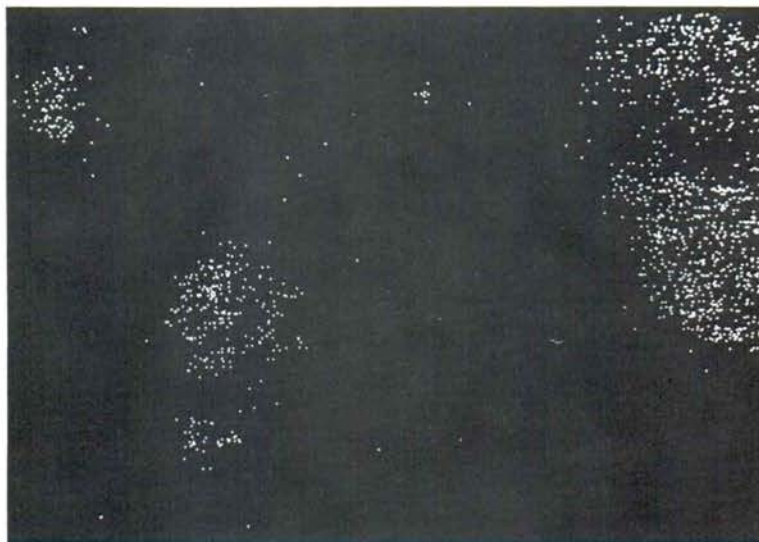


Fig. 12 b. - Mapping de Ca de la mateixa zona de la fig. anterior.

Fig. 12 b. - Ca mapping of same zone as for above figure.



Fig. 12 c. - Mapping de P de la mateixa zona de la fig. 12 a.

Fig. 12 c. - P mapping of same zone as Fig. 12 a.

Cas núm. 11 (Figures 13)

Clínica: Pacient que presenta una tumoració benigna a la mama dreta.

Anatomia patològica: Fibroadenoma de mama calcificat.

El material radioopac és de consistència dura.

Hom estudia els cristalls aïllats, a 40 x, i en fa els mappings de Ca i de P.

Case 11 (Figures 13)

History: Patient with benign tumour in right breast.

Pathology: Calcified fibroadenoma of breast.

The radiopaque material was of a hard consistency. Isolated crystals were studied (x 40) and Ca and P mappings were carried out.

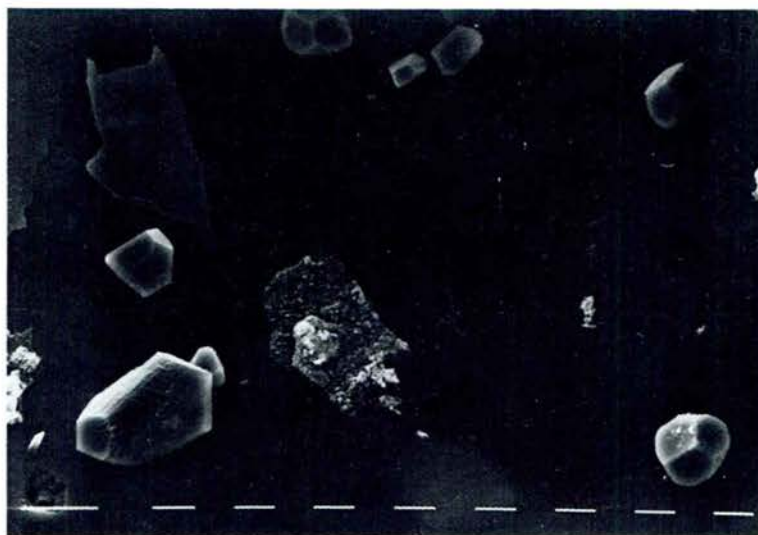


Fig. 3 a. - Tots els cristalls són polièdrics, i amb resposta al Ca, tal com hom mostra a 13 b. (x 640). Marques: 10 μ m.

Fig. 13 a. - All the crystals are polyhedral with response to Ca as for sample in 13 b. (x 640). Markers: 10 μ m.

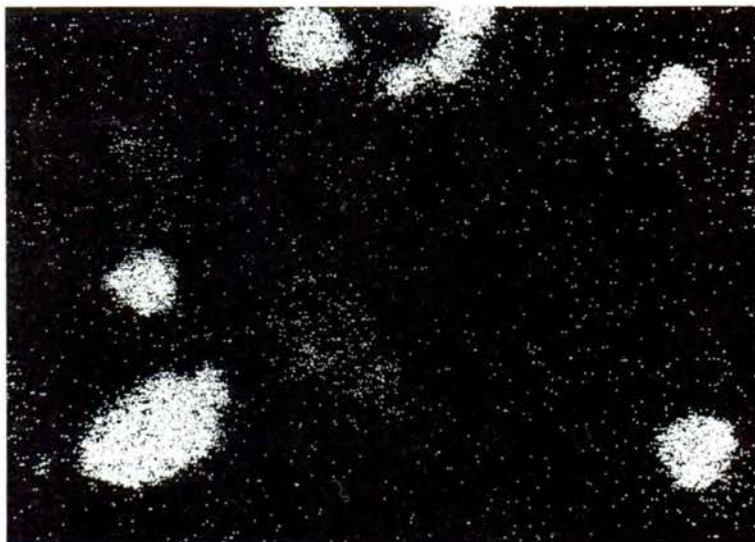


Fig. 13 b. - Cristalls polièdrics amb resposta al Ca. (x 1.250). Marques: 10 μm .

Fig. 13 b. - Polyhedral crystals with response to Ca (x 1.250). Markers: 10 μm .

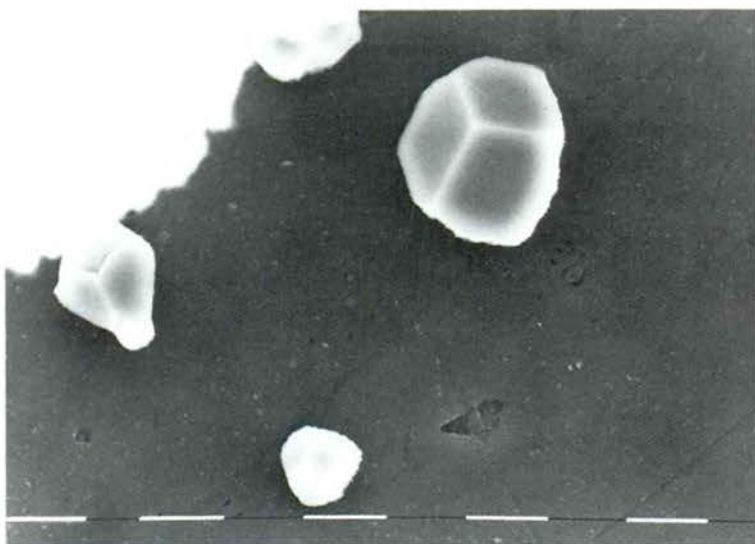


Fig. 13 c. - Cristalls polièdrics amb resposta al Ca. (x 1.250). Marques: 10 μm .

Fig. 13 c. - Polyhedral crystals with response to Ca (x 1.250). Markers: 10 μm .

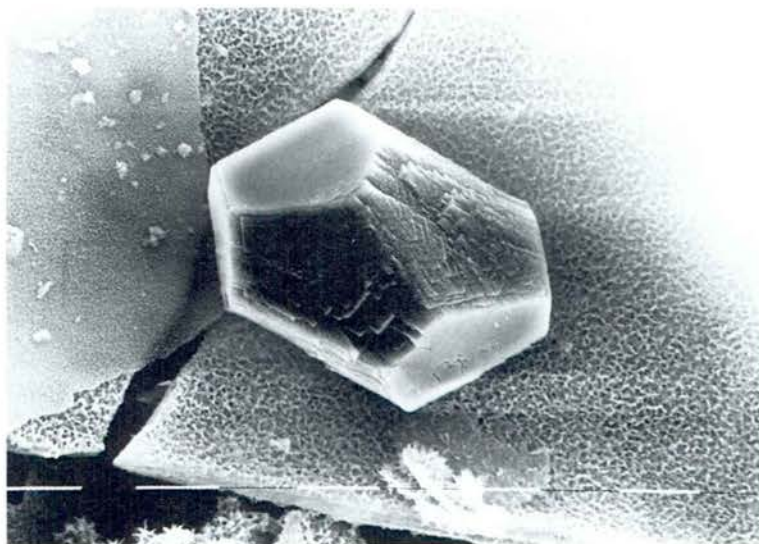


Fig. 13 d. - Cristall d'hàbit dodecaedre pentagonal de grans dimensions, 42,8 x 28,5 μm , amb resposta solament al Ca. (x 1.250). Marques: 10 μm .

Fig. 13 d. - Large crystals (42,8 x 26,5 μm) with response only to Ca. These have a habit of a pentagonal dodecahedron (x 1.250). Markers: 10 μm .

Cas núm. 12 (Figures 14)

Clinica: Pacient de 18 anys que presenta tumoracions benignes a la zona retroareolar de la mama esquerra.

Anatomia patològica: Fibroadenomes.

El material radioopac és de consistència dura.

L'estudi a 40 x i els mappings de Ca i P, no presenten diferències respecte dels processos malignes.

Case 12 (Figures 14)

History: 18 year old patient with benign tumours in the retroareolar zone of left breast.

Pathology: Fibroadenoma.

Radiopaque material was of a hard consistency. Sample was studied (x 40) and Ca and P mappings were performed. There were no differences with respect to malignant processes.

3.1.3. Casos de control, sense calcificacions (Figures 15-16)

Hom ha estudiat un total de sis casos de control que no posseïen calcificacions; l'anàlisi EDX de llurs biòpsies no donà en cap resposta al P ni al Ca.

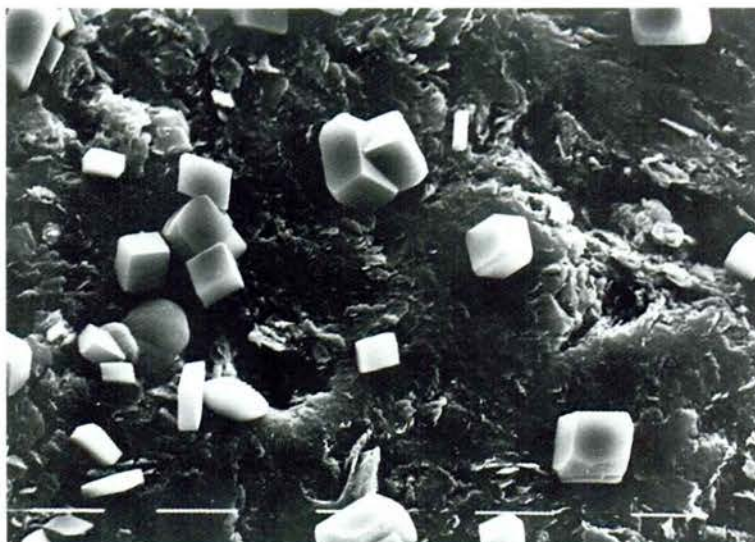


Fig. 14 a. - Mostra de cristalls aïllats damunt un suport de grafit. (x 1.250). Marques: 10 μm .

Fig. 14 a. - Sample of isolated crystals (x 1.250) on a graphite support. Markers: 10 μm .



Fig. 14 b. - Cristalls aïllats amb resposta al Ca solament, no obstant haver-hi al fons petites partícules, d'aproximadament 0,1 μm , que donen resposta al Ca i al P. (x 1.250). Marques: 10 μm .

Fig. 14 b. - Isolated crystals with response to Ca only. However, small particles (0,1 μm approx.) at the back are observed with response to Ca and P. (x 1.250). Markers: 10 μm .

3.1.3. Controls without calcifications (Figures 15-16)

Six cases without calcifications were studied. EDX analysis failed to give response to P and Ca.

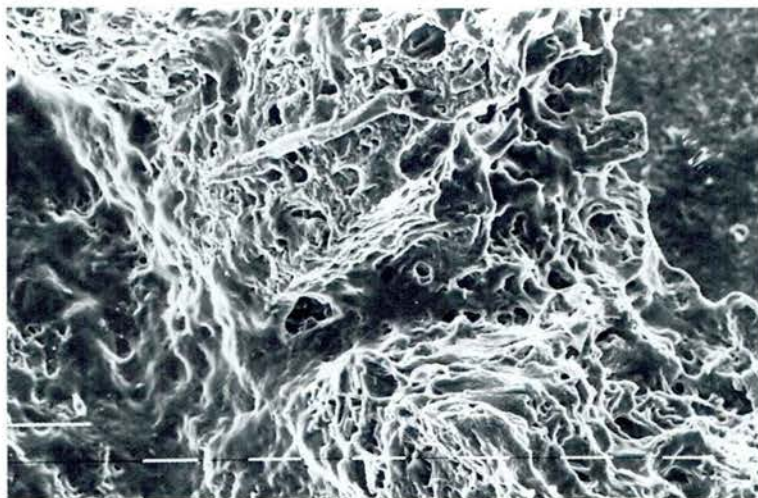


Fig. 15. - Es tracta d'un carcinoma sense microcalcificacions. No hi ha resposta al Ca ni al P (x 80). Marques: 100 μ m.

Fig. 15. - Carcinoma without microcalcifications. No response to Ca and P (x 80).
Markers: 100 μ m.

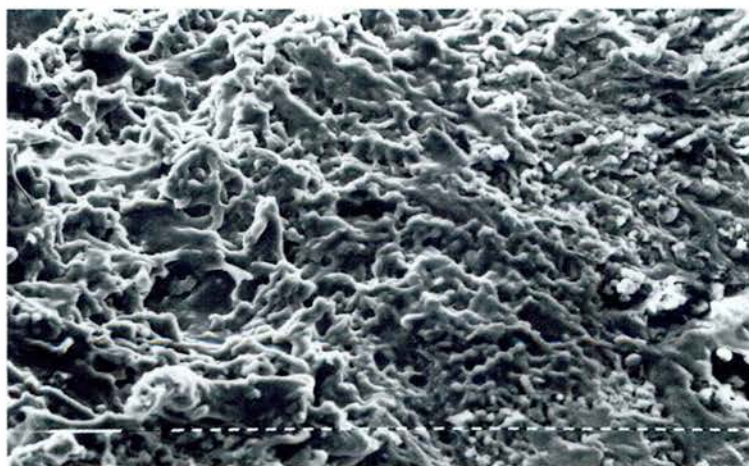


Fig. 16. - Mostra de la mama normal d'una dona de 20 anys intervinguda per un procés benigne. No hi ha resposta al Ca ni al P. (x 160). Marques: 10 μ m.

Fig. 16. - Sample of normal breast of 20 year old woman operated for benign tumour. No response to Ca and P. (x 160). Markers: 10 μ m.

3.2. Resultats globals

Hom presenta els casos estudiats i els tracta conjuntament a fi de poder arribar a uns resultats globals i, d'aquesta manera, poder-ne obtenir unes conclusions vàlides.

Aquest estudi ha estat centrat principalment en cinc paràmetres:

- 1) Consistència del material radioopac.
- 2) Aspecte morfològic de la calcificació, dels cristalls que la constitueixen i del seu entorn.
- 3) Composició elemental d'aquestes calcificacions i dels cristalls.
- 4) Lloc on ha estat formada la calcificació dins el tumor.
- 5 Estructura cristal·logràfica dels cristalls.

Els resultats obtinguts de l'estudi dels paràmetres clínics, radiològics i anatomo-patològics no són detallats en aquest treball car concorden amb els existents a la literatura.^{21, 22, 23}

1. Pel que fa a la consistència del material radioopac, cal dir que, en tots els casos de tumoració maligna, excepció feta d'un, les microcalcificacions presentaven una consistència pastosa i tova, contràriament al cas de les tumoracions benignes en què les calcificacions eren dures (Taula 1).

TAULA 1 - CONSISTÈNCIA DEL MATERIAL RADIOOPAC
TABLE 1 - CONSISTENCY OF RADIOPAQUE MATERIAL

| Consistència Consistency | Benignes Benign | Malignes Malignant |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------|
| Tova/Soft | 0 | 16 |
| Dura/Hard | 8 | 1 |

2. Quant a la morfologia, hom ha diferenciat dos grups: els de cristalls esfèrics i el dels polièdrics, i n'han estat trobats d'ambdós tipus tant a les calcificacions benignes com a les malignes (Taules 2 i 3).

3. Respecte de la composició, els *mappings* de fotons han demostrat que els cristalls esfèrics donen resposta al Ca i al P, mentre que els polièdrics només la donen al Ca (Taula 3).

²¹ FANDOS MORERA, A., *Microcalcificaciones mamarias. Composición.* Tesi Doctoral. Barcelona 1985, 284-303.

²² GROS, C. M., Les cancers ocultes du sein et de la mamelle tumorale. *Jour. Rad Electrol* 1952, 33: 602.

²³ LAMARQUE, J. L., *Le sein, radiodiagnostic clinique.* M.E.D.S.I., París, 1981, 237-247

4. Ha estat recollida informació sobre el lloc on s'assenten les calcificacions trobades, tot comprovant la presència o no de motlle així com les dimensions d'aquest (Taula 4).

En aquest sentit, hi ha diferències entre les calcificacions malignes i les benignes; a les malignes hom hi distingeix sempre un motlle, les benignes no acostumen a tenir-lo, si de cas seria el tumor mateix que actuaria com a motlle.

5. Mitjançant l'ús de la difracció de raigs X foren identificades les fases cristal·logràfiques següents: apatita, calcita, oxalat càlcic, àcid oxàlic i en un sol cas, aragonita (Taula 5).

4. *Discussió*

Quant al caràcter benigne de la tumoració, la presència d'apatita no té significància. Sembla raonable de pensar que, qualsevol alteració patològica de la mama, amb calcificacions, produeix alteracions de tipus apatític. Segons l'apunt d'estadística d'aquest treball, la presència d'oxalats podria posar de manifest la malignitat d'una tumoració. Per més que la calcita significaria una alteració específica independent de l'apatítica, no constitueix un caràcter específic en malignitat o benignitat de la tumoració.

En aquells casos que el diagrama de l'oxalat càlcic presenta línies intenses, hom hi pot identificar a la vegada àcid oxàlic; per contra, en aquells en què l'àcid oxàlic no ha estat determinat, les línies de l'oxalat són molt febles. Això fa pensar que l'oxalat sempre va acompanyat de l'àcid corresponent. Sembla raonable de concloure que l'oxalat és produït a través de l'àcid oxàlic.

Dels resultats obtinguts encara roman oberta una pregunta i és el per què de l'existència de motlles envoltant les calcificacions malignes i l'absència d'aquests en les calcificacions benignes. Potser un estudi aprofundit del teixit cel·lular que envolta les calcificacions ajudaria a interpretar les diferències observades en les fases cristal·logràfiques d'aquestes.

Agraïments

Els autors agraeixen a la Fundació Universitària Agustí Pedro i Pons l'atorgament d'una beca de foment a la recerca. També agraeixen als Mestres Industrials i becaris de la CIRIT Srs. Josep Elvira, Ferran Garcia i Joan Pujades la seva col·laboració en el processament de les mostres, i a les senyores Remei Leyva i Carme Sansó el seu ajut en el mecanografiat del treball.

TAULA 2 - MORFOLOGIA DELS CRISTALLS MALIGNES
TABLE 2 - MORPHOLOGY OF THE MALIGNANT CRYSTALS

| Núm. Casos Num. Cases | Cristalls esfèrics (Ca i P) Spherical crystals (Ca and P) | | | | Cristalls polièdrics (Ca) Polyhedral crystals (Ca) | | | |
|------------------------------------|---|------|--|------|---|-------|--|-------|
| | Cristall major Largest crystal | | Cristall menor Smallest crystal | | Cristall major Largest crystal | | Cristall menor Smallest crystal | |
| | Longitud màxima en μm Maximal length in μm | | Longitud mínima en μm Minimal length μm | | Longitud màxima en μm Maximal length in μm | | Longitud mínima en μm Minimal length μm | |
| 1 | 1,5 | 1,5 | — | — | — | — | — | — |
| 2 | 0,8 | 0,8 | 0,2 | 0,2 | — | — | — | — |
| 3 | 2 | 2 | 0,33 | 0,33 | 4 | 3 | — | — |
| 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | — | — | — | — |
| 5 | Mostra insuficient/Insufficient sample | | | | Mostra insuficient/Insufficient sample | | | |
| 6 | 24 | 24 | 3,33 | 3,33 | 8 | 8 | 5 | 2 |
| 7 | 0,50 | 0,50 | 0,1 | 0,1 | — | — | — | — |
| 8 | 1,85 | 1,85 | 0,37 | 0,37 | 2 | 0,83 | 0,50 | 0,16 |
| 9 | 0,33 | 0,33 | 0,16 | 0,16 | — | — | — | — |
| 10 | 7 | 6 | 0,2 | 0,2 | 5 | 3 | 2 | 1,5 |
| 11 | 3 | 3 | 1 | 1 | 10 | 9,23 | 3 | 2 |
| 12 | 0,2 | 0,2 | — | — | 10,76 | 9,23 | 3,07 | 2,36 |
| 13 | 0,33 | 0,33 | 0,16 | 0,16 | — | — | — | — |
| 14 | 0,38 | 0,38 | — | — | 9,61 | 3,84 | 1,92 | 1,53 |
| 15 | 2 | 2 | — | — | 61,42 | 14,28 | 7 | 7 |
| 16 | 2,85 | 2,85 | 1,42 | 1,42 | 38,57 | 7,14 | 31,42 | 11,42 |
| 17 | 2 | 1,5 | 0,2 | 0,2 | 5 | 3,65 | 4 | 3 |

TAULA 3 - MORFOLOGIA DELS CRISTALLS BENIGNES
 TABLE 3 - MORPHOLOGY OF THE BENIGN CRYSTALS

| Núm. Casos | Cristalls esfèrics (Ca i P) Spherical crystals (Ca and P) | | | | Cristalls polièdrics (Ca) Polyhedral crystals (Ca) | | | |
|---------------|---|--|---|--|---|---|---|--|
| | Cristall major Largest crystal | | Cristall menor Smallest crystal | | Cristall major Largest crystal | | Cristall menor Smallest crystal | |
| | Longitud màxima en μm Maximal length in μm | Longitud mínima en μm Minimal length μm | Longitud màxima en μm Maximal length in μm | Longitud mínima en μm Minimal length μm | Longitud màxima en μm Maximal length in μm | Longitud mínima en μm Minimal length in μm | Longitud màxima en μm Maximal length in μm | Longitud mínima en μm Minimal length μm |
| 18 | 2,5 | 2,16 | — | — | — | — | — | — |
| 19 | 2,5 | 2,16 | — | — | — | — | — | — |
| 20 | — | — | — | — | 5 | 3 | 1 | 1 |
| 21 | 4 | 4 | 1 | 1 | 7,2 | 1 | 1,6 | 1,16 |
| 22 | 4 | 4 | 1 | 1 | 7 | 2 | 1 | 1 |
| 23 | 4 | 4 | 1 | 1 | 42,8 | 28,5 | 11,6 | 4,2 |
| 24 | 0,1 | 0,1 | — | — | 9,47 | 9,47 | 2,10 | 1,05 |
| 25 | 0,1 | 0,1 | — | — | 6,92 | 5,38 | — | — |

TAULA 4 - PRESENCIA DEL MOTLLE CAVITARI/GRANDÀRIA
TABLE 4 - CAVITY MOLD PRESENCE/SIZE

| Tumoració Disease | Motlle Cavity mold | | Grandària Size |
|----------------------|-----------------------|-------|-------------------|
| | Sí/Yes | No/No | |
| Benigna Benign | 1 | 7 | 16 µm |
| Maligne Malignant | 10 | 7 | 2.000 - 37 µm |

TAULA 5 - RESULTATS ESTADÍSTICS
DE LES FASES CRISTAL·LOGRÀFIQUES IDENTIFICADES
MITJANÇANT XRD

TABLE 5 - STATISTICAL RESULTS OF THE CRYSTALLINE
PHASES IDENTIFIED BY XRD

| | Tumoració maligna Malignant diseases | Tumoració benigna Benign diseases |
|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Apatita Apatite | 100% | 100% |
| Oxalat càlcic Calcium oxalate | 29% | — |
| Carbonat càlcic Calcium carbonate | 12% | 25% |

ADDENDA

Aspectes parcials d'aquest treball foren presentats als congressos següents:
a) «IV Reunión de la Asociación Española de Senología y Patología Mamaria» celebrada a Sevilla el mes de març de 1985, amb una comunicació que portà per títol: «Valeur des Microcalcifications mammaires a partir de leur composition»;
y c) «V Reunión de la Asociación Española de Senología y Patología Mamaria», celebrada a Madrid el mes de maig de 1986, amb una comunicació que portà per títol «Composición de microcalcificaciones en tumores de mama».

SILICATS EN ELS GANGLIS LIMFÀTICS D'UN NOI EUROPEU AMB SIMPTOMATOLOGIA D'ELEFANTIASI A LES CAMES

per

ELIES CAMPO *, JOSEP M. TURA **, ADOLF TRAVERIA ***,
MANUEL CORACHAN ****, MONTSERRAT MARSAL *****

* Departament d'Anatomia Patològica. Hospital Clínic i Provincial. Societat Catalana de Biologia. IEC. Barcelona. ** Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi (I.T.Q.T.). Consell Superior d'Investigacions Científiques. Societat Catalana de Ciències Físiques, Químiques i Matemàtiques. IEC. Barcelona. *** Institut Jaume Almera. Consell Superior d'Investigacions Científiques. Societat Catalana de Ciències Físiques, Químiques i Matemàtiques. IEC. Barcelona. **** Secció de Medicina Tropical (Servei de Malalties Infeccioses). Hospital Clínic i Provincial. Societat Catalana de Biologia. IEC. Barcelona. ***** Departament de Metal·lúrgia i Siderúrgia. Universitat Politècnica de Catalunya. Societat Catalana de Ciències Físiques, Químiques i Matemàtiques. IEC. Barcelona.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans, carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona.

This work is part of programme number 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Carme Street 47. 08001 Barcelona.

SILICATES IN FEMORAL LYMPH NODES OF A EUROPEAN BOY WITH SYMPTOMS OF PRE-ELEPHANTIASIS IN THE LOWER LEGS

SUMMARY

A European child with symptoms of pre-elephantiasis was studied. The child had lived sporadically in the volcanic island of Bioko (formerly Fernando Poo). Biopsy of the femoral lymph nodes revealed particles that presented birefringency under polarized light. SEM, EDX and XRD analyses showed that isolated particles corresponded to a phase of the amphibole group with a composition akin to Eckermannite.

RESUM

Hom estudià un cas d'aparença preelefantiàsica en un nen europeu que d'una manera intermitent residia a l'illa volcànica de Bioko (abans Fernando Poo). Hom féu una biòpsia dels ganglis limfàtics femorals en la qual foren observades partícules que presentaven birefringència sota llum polaritzada. Mitjançant les anàlisis SEM, EDX i XRD, hom conclou que aitals partícules responen a una fase del grup dels amfibols amb una composició pròxima a eckermanita.

Paraules clau: Elefantiasi. Ganglis limfàtics. Silicats. Microscòpia Electrònica de Rastreig. Anàlisi per energia dispersiva de raigs X. Difracció de raigs X.

Key Words: Elephantiasis. Lymph nodes. Silicates. Scanning Electron Microscopy (SEM). Energy Dispersive X-ray Analysis (EDXA). X-Ray Diffraction (XRD).

1. Introducció

L'existència d'una forma d'elefantiasi de les extremitats inferiors que no es trobava associada a la filariasi limfàtica ni dèrmica fou assenyalada per primera vegada a Uganda per Lowenthal (1934).¹

Els estudis epidemiològics de camp duts a terme per Oomen el 1969² en mercats rurals d'Etiòpia, permeteren l'establiment d'una correlació entre l'elefantiasi i els habitants de zones geogràfiques de sòl rogenic (laterita). Aquestes localitats es trobaven lliures de filàries i les persones afectadas acostumaven a ser pagesos que no utilitzaven cap mena de calçat.

D'ençà de llavors, allò que fou anomenat «elefantiasi endèmica no filariàtica» ha estat ja descrita a Kenya, Tanzània, Etiòpia, Rwanda, Burundi i Camerun.³

L'any 1972, Price⁴ observà la presència de partícules birefringents a ganglis femorals i inguinals hipertrofiats de pacients etiòps afectats per aquella síndrome. El mateix autor observà el 1978⁵ que la composició de les partícules cristallines era constituïda principalment per silici i alumini en la mateixa proporció que es trobaven en el sòl d'aquella àrea d'Etiòpia.⁶

La composició d'aquest tipus de sòl correspon a la de la lava volcànica, i la seva associació amb l'elefantiasi havia estat descrita per Robles⁷ a l'Amèrica Central. Aquesta mateixa constatació és la que l'any 1976 dugué a terme Price⁸ a l'àrea de la cadena de volcans extingits que estableix la frontera entre Zaire i Rwanda al Nord del llac Kiwu. L'elefantiasi seria produïda (segons aquest autor) pel blocatge limfàtic i la fibrosi induïda pels cristalls de sílice que devien

1. LOWENTHAL, L. J. A., «On the probable inclusion of several diseases in the title Mossy Foot», *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* 1934, 28, 47-62.

2. OOMEN, A. P., «Studies on elephantiasis of the legs in Ethiopia». *Trop. Geogr. Med.* 1969, 21, 236-253.

3. FYFE, N. C. M. and PRICE, E. W. «The effects of silica on lymph nodes and vessels, a possible mechanism in the pathogenesis of non filarial endemic elephantiasis». *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 1985, 79 (5), 645-651.

4. PRICE, E. W., «The pathology of non filarial elephantiasis of the lower legs». *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 1972, 66, (2), 150-159.

5. PRICE, E. W. and HENDERSON, W. J. «The elemental content of lymphatic tissues of bare-footed people in Ethiopia with reference to endemic elephantiasis of the lower legs». *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 1978, 72 (1), 132-136.

6. PRICE, E. W., MC HARDY, W. J. and POOLEY, F. D., «Endemic elephantiasis of the lower legs as a health hazard of bare-footed agriculturalists in Cameroon, West Africa». *Ann. of Occupation Hyg.* 1981, 24, 1-8.

7. ROBLES, R. V., «Report of 1st. Sanitary Congress of Central America» (Guatemala) IX, n.º 46 1938, 353.

8. PRICE, E. W., «Endemic elephantiasis of the lower legs in Rwanda and Burundi». *Trop. Geogr. Med.* 1976, 28 (4), 283-290.

ésser absorbits per la pell. La composició mineral dels silicats hauria de variar segons l'àrea geogràfica i l'estructura del seu sòl volcànic.

Abans que s'arribi a instaurar una elefantiasi dels membres inferiors, el pacient passarà per un llarg període de diversos anys que pot iniciar-se a la infantesa i que en els seus primers estadis rep el nom de «podoconiosi».⁹

Una de les províncies de l'ex-colònia espanyola de Guinea Equatorial és constituïda per l'illa de Bioko (abans Fernando Poo). El sòl de Bioko (a diferència del sòl de la província continental) és de lava fosca pertanyent a diversos cons volcànics inactius que abunden en aquella illa, caracteritzada per les seves platges de sorres grises.

La descripció d'un cas originat en aquella illa i que afecta un nen espanyol que presentava un quadre clínic compatible amb una podoconiosi ens sembla d'un interès elevat, perquè no hem trobat a la bibliografia cap cas d'aquest tipus en individus de raça blanca.

2. Cas clínic

El pacient és un nen de deu anys de pares espanyols amb domicili a Gijón i que entre les edats de dos i vuit anys visita anualment i per un període de tres mesos el seu pare que resideix a Luba, a l'illa de Bioko (abans Fernando Poo) de la República de Guinea Equatorial. La casa familiar es troba a la vora d'una platja de sorra grisa fosca, i el sòl de la residència és de terra d'aspecte negroide.

Des de fa dos anys es queixa d'una manera transitòria i intermitent de sensació de calor i de picor a ambdues zones pretibials i sacres. El generalista que l'atén adverteix la presència d'adenopaties inguinals bilaterals significatives que hom decideix d'investigar.

L'hemograma complet, els perfils bioquímics hepàtic i renal i el sediment urinari donaven resultats dins la normalitat en diverses ocasions, a excepció d'una eosinofília que venia explicada per la presència de *Tr. trichiura* i *A. lumbricoides* a les femtes i per la qual cosa rebé tractament amb mebendazol (100 mg cada 12 h. durant 3 dies). També fou decidit un tractament empíric amb dietil-carbamazida davant l'eventualitat d'una possible filariasi (no comprovada) donat que els símptomes de prurit intermitent continuaren després del tractament. Finalment, hom decideix de consultar el Departament de Medicina Tropical de l'Hospital Clínic de Barcelona.

L'exploració clínic amb aparells no revela cap anormalitat excepte el palpatament d'una pell seca (comparada amb les àrees veïnes) a ambdues zones pretibials i àrea sacra, que havia perdut la seva turgència habitual. A ambdues

9. PRICE, E. W., «Pre-elephantiasis stage of endemic nonfilarial elephantiasis of lower legs: *podoconiosis*». *Trop. Doctor* 1984, 14 (3), 115-119.

zones inguinals, hom palpa adenopaties de la grandària d'una fava, mòbils, dures, no doloroses. Foren practicades dues gotes grosses que foren negatives per a filàries sanguícoles, i una biòpsia de pell sacra en àrea de raspat que, després d'ésser submergida en sèrum salí, no provocà l'aparició de microfilàries d'oncocerca. La rutina del laboratori (hemograma, perfil hepàtic i renal i sediment urinari) mostrà resultats dins la normalitat, per la qual cosa hom decidí de practicar una limfografia. El test de Mantoux era positiu a 8 mm amb una radiografia de tòrax sense alteracions.

La limfografia mostrà: disfuncionalisme dels ganglis inguinocrurals amb vies de suplència bilaterals a nivell del psoas i imatges de defecte de repleció a l'interior dels ganglis. L'aspecte general és la d'una fibrosclerosi ganglionar de bastant temps d'evolució.

Davant la possibilitat que (pels seus antecedents epidemiològics) pogués tractar-se d'una podoconiosi i també per tal de descartar la possibilitat d'un procés maligne del qual haguéssim detectat altres localitzacions, o per evidenciar la presència de microfilàries intraganglionars, decidírem finalment de dur a terme la biòpsia d'un gangli inguinal íntegre.

3. *Material i mètodes*

El gangli limfàtic fou fixat amb formol; una part d'aquesta biòpsia fou inclosa en parafina per a la seva observació amb microscòpia òptica sota llum polaritzada i sota radiació U.V. Una part del gangli fou sotmesa a un procés de substitució del formol per acetona; a continuació aquesta mostra fou dessecada en un aparell de punt crític Polaron E-3100 utilitzant CO₂ com a criolíquid.¹⁰

Una part de la biòpsia del gangli dessecada fou observada i analitzada amb un SEM Philips equipat amb un analitzador dispersiu d'energia de raigs X EDAX. Hom emprà un portamostres de grafit pur. Una altra part de la biòpsia dessecada fou sotmesa a un procés de digestió del teixit orgànic amb KOH al 10 %.¹¹ Hom l'escalfà a 50° C durant 24 hores. La solució fou centrifugada i rentada diverses vegades amb aigua destil·lada prèviament filtrada; a continuació, la solució fou filtrada a través d'un filtre Millipore tipus RA de 1,2 µm.

Finalment una part de la biòpsia dessecada fou estudiada per difracció de raigs X (XRD) amb una càmera Guinier de Wolff marca Stoe, la qual portava incorporat un monocromador de grafit.

10. LEWIS, E. R., NEMANIC, M. K., «Critical point drying techniques», SEM/1973, Proceedings of the 6th. Annual SEM Symposium (O. Johari and I. Corvin, eds.) (1973), 767-774.

11. DENEE, P. B., «Identification and analysis of particles in biological tissue using SEM and related techniques», SEM/1976/1, Proceedings of the 9th. Annual Scanning Electron Microscope Symposium (O. Johari, ed.) (1976), 461-468.

4. Resultats

4.1. Microscòpia òptica

L'estudi microscòpic mostrà una discreta hiperplàsia fol·licular en el parènquima i una reacció granulomatosa lipofàgica enfront del material limfogràfic. La càpsula ganglionar presentava un aspecte engruixit i fibròtic (figura 1). Hom observà en algunes àrees, acumulacions de cèl·lules limfohistiocítiques amb cèl·lules gegants multinucleades. L'examen de la secció histològica amb llum polaritzada demostrà la presència de nombroses partícules birefringents situades en la càpsula fibròtica i en el teixit fibroadipós periganglionar (figura 2). Hom pogué observar ocasionalment algun cristall a l'interior del gangli limfàtic. Aquests cristalls es trobaven a l'interior del citoplasma de cèl·lules histiocítiques mono- i multinucleades, però també eren presents a l'espai intersticial. L'observació de les preparacions sota radiació U.V. no donà cap tipus de fluorescència.

4.2. Microscòpia electrònica i microanàlisi EDX

Hom observà i analitzà amb aquestes tècniques la biòpsia un cop dessecada, sense cap recobriment protector. La figura 3 correspon a la zona de la càpsula de teixit connectiu que envolta el gangli limfàtic. Hom aprecia a la imatge efectes de la càrrega provocats per la manca de metal·lització. La figura 4 mostra el *mapping* de Si de la mateixa zona de la figura anterior. L'àrea de màxima resposta de Si apareix al llarg de la càpsula de teixit connectiu. Cal diferenciar les respostes A i B, corresponents a cristalls de l'ordre dels 10 μm , de la resta C, deguda a la presència de cristalls menors (de l'ordre dels dos microns, tal com veurem més endavant).

A continuació hom metal·litzà la mostra amb Au. La part *a* de la figura 5 és la mateixa estudiada a les figures 3 i 4; a la part esquerra d'aquesta figura apareix el còrtex exterior, així com nòduls limfàtics *b* dins aquest. La figura 6 correspon a la zona de màxima resposta de Si; les parts indicades amb les lletres *a*, *b* i *c* presentaren resposta a la línia $K\alpha$ del Si quan hom dugué a terme anàlisis puntuals damunt els microcristalls d'una grandària d'uns dos microns.

La figura 7 mostra un altre camp d'aquesta zona de la biòpsia; la fletxa *a* assenyala un cristall d'uns 5 μm ; aquest cristall donà l'anàlisi EDX següent: Mg; Al; Si; S; Cl; K; Ca (línies $K\alpha$ i $K\beta$); Fe i traces de Ti. Cal destacar també que la resposta de S i de Ca fou molt intensa. Un cop feta la digestió del teixit orgànic, fou investigat el filtre Millipore on havien estat recollits els cristalls. La figura 8 posa de manifest la presència de dos tipus de cristalls: 1) els d'una grandària de l'ordre dels 10 microns (*a* i *b*) i 2) els d'una dimensió de l'ordre dels dos microns (*c*, *d*, *e*). La figura 9 correspon a l'anàlisi EDX del cristall *a* de la figura anterior. Hom hi pot observar els elements següents: Na; Mg; Al; Si; P; K (línies $K\alpha$ i $K\beta$); Ti (línies $K\alpha$ i $K\beta$) i Fe. La figura 10 mostra un altre

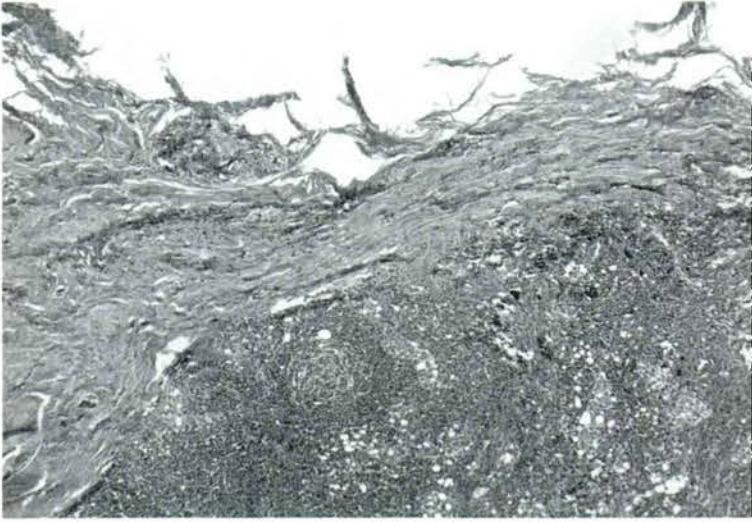


Fig. 1. - Càpsula ganglionar que presenta un aspecte engruixit i fibròtic.

Fig. 1. - Connective tissue capsule with a fibrotic and thick aspect.



Fig. 2. - Partícules birefringents sota llum polaritzada situades a la càpsula fibròtica i al teixit fibroadipós periganglionar.

Fig. 2. - Birefringent particles under polarized light localized in the fibrotic capsule and in the fibroadipose perilymphatic tissue.



Fig. 3. - Imatge per electrons secundaris de la càpsula de teixit connectiu del gangli.
Mostra sense metallitzar. Marques 10 μm (x 320).

Fig. 3. - Secondary electron image of tissue capsule connected to the nodes.
Uncoated sample (x 320).



Fig. 4. - «Mapping» de silici de la figura anterior. Presència de cristalls A i B
i de microcristalls C (x 320).

Fig. 4. - Si mapping of the above figure. Presence of crystals A and B
and of microcrystals C (x 320).

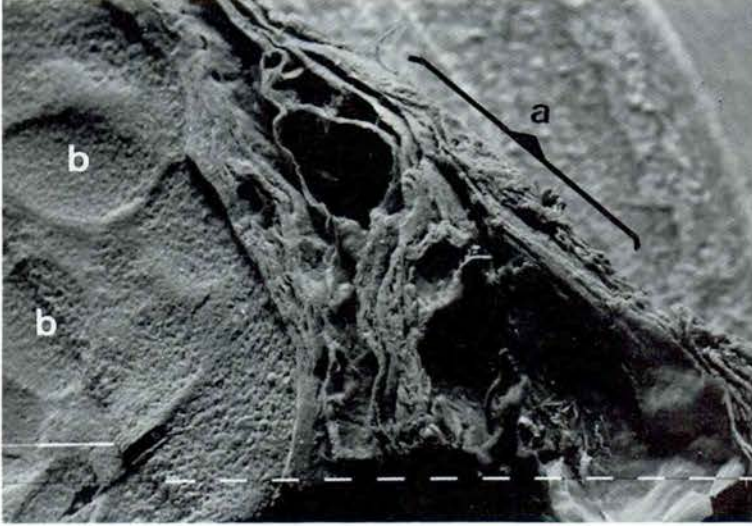


Fig. 5. - Còrtex exterior i nòduls limfàtics del gangli. Zona *a*: correspon a l'àrea on fou observada la màxima resposta EDX de Si. Zona *b*: nòduls limfàtics. Marques: 100 μm (x 40).

Fig. 5. - Outer cortex of lymph nodes of glands. Zone *a*: maximum EDX response to Si. Zone *b*: lymph nodes (x 40).

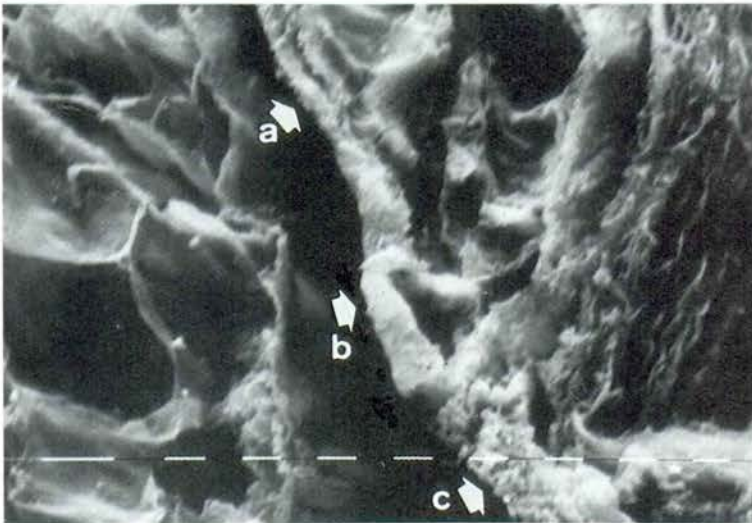


Fig. 6. - Detall de la figura anterior. Les fletxes *a*, *b* i *c* indiquen zones on aparegueren microcristalls d'una grandària de dos microns. Marques: 10 μm (x 640).

Fig. 6. - Close up of above figure. Arrows *a*, *b* and *c* indicate location of microcrystals of approximately 2 μm (x 640).

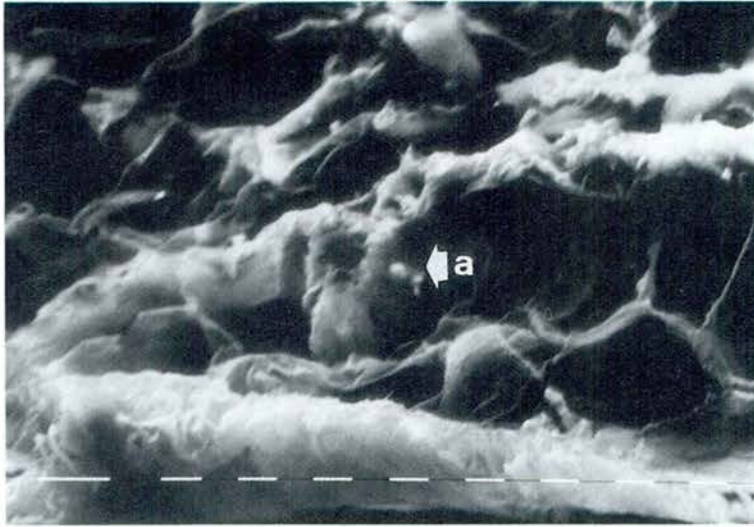


Fig. 7. - La fletxa *a* mostra un cristall que donà l'anàlisi EDX mostrat a la figura 8. Marques: 10 μm (x 640).

Fig. 7. - Arrow *a* indicates a crystal of approximately 5 μm . EDX Analysis: Mg, Al, Si, S, Cl, K, Ca, Fe, and traces of Ti (x 640).

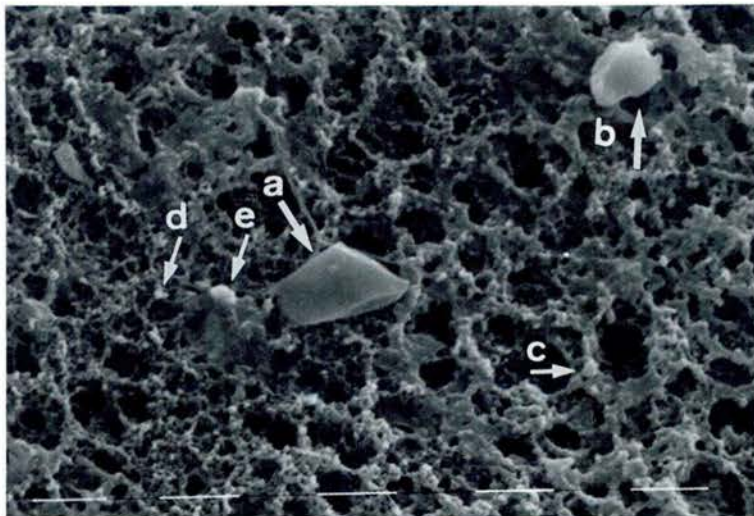


Fig. 8. - Cristalls solts dipositats damunt un filtre. Presència de dues grandàries diferents: (*a* i *b*) i (*c*, *d* i *e*). Marques: 10 μm (x 1250).

Fig. 8. - Isolated crystals deposited on a filter. Presence of two different sizes (*a* and *b*) and (*c*, *d* and *e*) (x 1250).

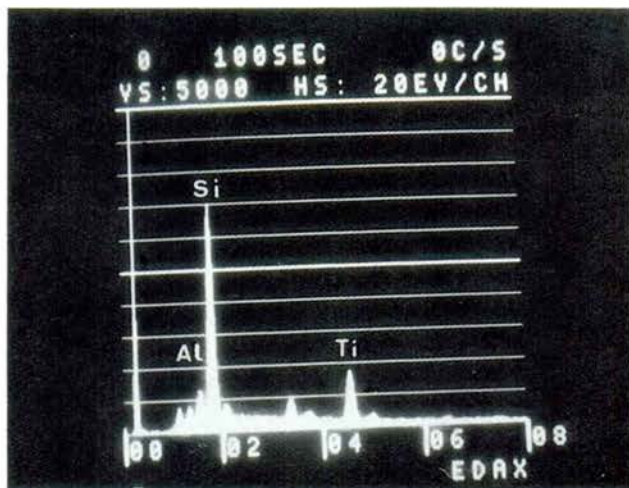


Fig. 9. - Anàlisi EDX del cristall *a* de la figura anterior.

Fig. 9. - EDX analysis of crystal *a* of above figure.

| | |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Elements: Na (K α : 1,04 KeV) | K (K α : 3,31 KeV) |
| Mg (K α : 1,253 KeV) | K (K β : 3,69 KeV) |
| Al (K α : 1,486 KeV) | Ti (K α : 4,51 KeV) |
| Si (K α : 1,739 KeV) | Ti (K β : 4,93 KeV) |
| P (K α : 2,01 KeV) | Fe (K α : 6,40 KeV) |

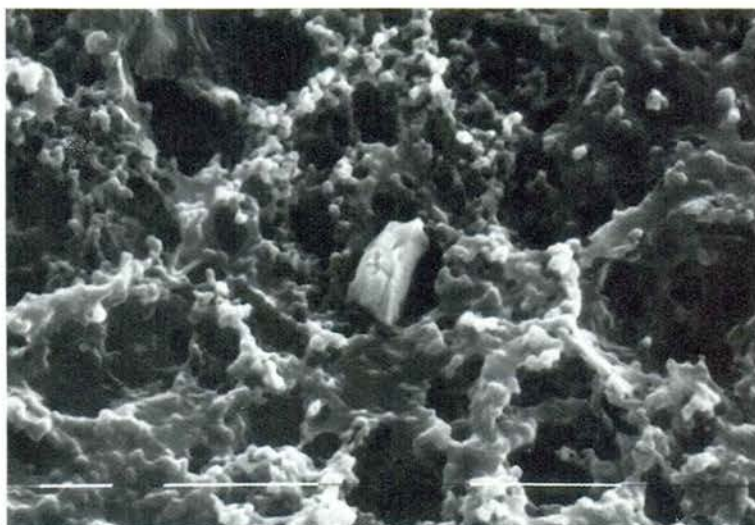


Fig. 10. - Cristalls procedents de la digestió del teixit orgànic.
Marques: 10 μ m (x 2.500).

Fig. 10. - Crystals removed from the lymph node tissue.
Markers: 10 μ m (x 2.500).

camp del filtre, on apareix un cristall d'uns 8 μm de grandària envoltat de microcristalls més reduïts; aquest darrer tipus de cristalls més petits donà resposta al Si, traces d'Al i Ca.

4.3. Difracció de raigs X

Amb la mostra ja sotmesa a la dessecació per la tècnica del punt crític i sense eliminar-ne, per tant, el teixit pròpiament dit, hom obtingué, a partir d'uns 3 mm^3 de material de la part externa, el diagrama XRD corresponent. La qualitat del diagrama obtingut és migrada, però permeté de llegir les línies poc intenses i difuses que hom presenta a la taula 1.

TAULA 1/TABLE 1

| Diagrama obtingut Diagram obtained | | | J.C.P.D.S. | |
|---------------------------------------|------|-----|-------------|-----|
| Línia núm. Line num. | dÅ | I | dÅ | I |
| 1 | 4,49 | www | 4,49 | 35 |
| 2 | 3,13 | www | 3,13 | 100 |
| 3 | 2,71 | ww | 2,707 | 85 |
| 4 | 2,59 | www | 2,583 | 25 |
| 5 | 2,48 | ww | 2,514 | 30 |
| 6 | 2,24 | www | Eckermanita | |

Diagrames de difracció de la biòpsia i d'una fitxa estàndard de raigs X

Biopsy and standard card X-ray diffraction diagram

Abreviacions / Abbreviations:

dÅ: Distància en àngstroms/Distance in Angstroms

I: Intensitat/Intensity (w: feble/weak)

J.C.P.D.S.: Joint Committee of powder diffraction standard

5. Discussió

Sota el punt de vista clínic, el diagnòstic d'elecció es decanta cap a l'oncocercosi (picor, pell seca rasposa, eosinofília). En no evidenciar-se microfilàries a la pell, desapareix l'eosinofília (després de tractament antihelmíntic); en no palpar-se nòduls en protuberàncies òssies i en no apreciar-se lesions oculars, la possibilitat d'oncocercosi quedava pràcticament descartada. L'antecedent epidemiològic de residència a terres volcàniques plantejava l'eventualitat d'una podoco-

niosi. En efecte, la presentació clínica corresponia a l'estadi inicial de l'elefantiasi endèmica no filariàsica descrita per W. Price ⁹ sota la denominació de «podoconiosi».

Fou practicada una limfografia que mostrava afectació de les vies aferents limfàtiques, així com dels ganglis mateixos. Això podria ésser compatible amb qualsevol dels processos esmentats abans, per la qual cosa hom decidí de dur a terme una biòpsia ganglionar inguinal.

L'examen microscòpic del gangli evidencià un engruiximent fibrós i inflamatori de la càpsula de teixit periganglionar amb presència de cristalls birefringents. No hi fou detectada la presència de filàries. L'estudi mitjançant tècniques físiques microanalítiques evidencià que aquests cristalls eren silicats complexos.

Tenint en compte el diagrama obtingut de la mostra representat a la taula 1, la composició elemental obtinguda per EDXA i la procedència del pacient d'una illa volcànica, calia trobar un mineral que fos compatible amb aquests tres requisits. El compost que més s'apropa a l'acompliment d'aquests tres requisits és l'eckermanita, la fórmula de la qual és la següent:



Per bé que és cert que la fórmula del mineral «identificat» no inclou Ti, K ni Fe, difícilment hom pot trobar un amfíbol que no contingui substitucions per aquests elements. D'altra banda la identificació duta a terme significa que estem en un mineral més o menys pròxim a la seva composició.

Prat *et al.*¹² han descrit recentment la presència de cristalls de talc en els sacs herniaris inguinals. Els cristalls observats en el nostre cas són diferents en llur morfologia i composició dels del talc.¹³ Cal assenyalar també que el talc és absolutament incompatible amb terrenys de natura volcànica.

Així doncs, la presència de silicats complexos en el gangli limfàtic d'aquest pacient suggereix la podoconiosi.

L'observació dels cristalls i la reacció fibròtica i histiocitària predominantment en la càpsula i en el teixit fibroadipós periganglionar està d'acord amb observacions prèvies sobre aquesta malaltia. Existeixen evidències clíniques i experimentals que l'efecte obstructiu dels silicats en el sistema limfàtic es manifesta predominantment en els vasos limfàtics aferents més que en el drenatge del mateix gangli limfàtic.³ Els silicats penetrarien a través de la pell plantar i arribarien als vasos limfàtics. L'acumulació de sílice en aquests vasos desencadenaria una resposta inflamatòria amb fibrosi i macròfags, la qual condicionaria l'obstrucció del flux limfàtic. Aquesta mateixa obstrucció impediria el pas massiu d'histiòcits carregats de silicats a l'interior dels ganglis limfàtics.

12. PRAT, P. C., GEORGE, M. H., MASTIN, J. P. i ROGGLI, V. L., «Crystalline Foreign particulate material in hernia sacs». *Hum. Path.* 1985, 11, 1141-1146.

13. MC MRONE, W. C., BROWN, J. A., STEWART, I. M., The particle atlas «Vol. VI Electron Optical Atlas and Techniques». Ann. Arbor, Michigan, Ann. Arbor Science Publishers Inc. (1980), 1527-1529.

Pel que fa a l'evolució del pacient que ens ocupa, cal esperar que aquesta sigui favorable; això és previsible pel fet que el pacient es troba allunyat de les zones geogràfiques que contenen materials volcànics, i que camina diàriament calçat. Aquests dos factors constitueixen la profilaxi recomanada per a aquesta malaltia, els quals han d'impedir la seva ulterior evolució cap a l'elefantiasi.

Agraïments

Els autors d'aquest treball agraeixen als becaris de la CIRIT, Srs. Josep Elvira, Ferran Garcia i Joan Pujades, llur valuosa col·laboració en el processament de les mostres.

ADDENDA

Aspectes parcials d'aquest treball foren presentats al Congrés organitzat per la Societat Alemanya de Microscòpia Electrònica a Aachen, el mes de setembre de 1986, amb una comunicació que portà per títol «Silikate in den phemorale Lympknoten eines europäischen Kindes mit Symptomen von Elephantiasis in den Beinen», i publicats al Volum 19 dels «Beiträge zur elektronenmikroskopischen», pàgs. 419-428, Münster, setembre de 1986.

MICROCALCIFICACIONS EN CARCINOMES I TUMORS BENIGNES DE MAMES HUMANES

(II part)

ESTUDI MITJANÇANT XRD I LAMMA

per

ADOLF TRAVERIA *, JOSEP M. TURA **, ADELAIDA FANDOS ***,
M. DOLORS DE CASTELLAR **, HENNING VOGT ****

* Institut Jaume Almera, CSIC, Barcelona. ** Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi, CSIC, Barcelona. *** Hospital Clínic, Universitat de Barcelona. **** Leybold Heraeus, Köln, Nordrhein-Westfalen, República Federal d'Alemanya.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans, carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona.

This work is part of programme number 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Carme Street 47. 08001 Barcelona.

MICROCALCIFICATIONS IN HUMAN BREAST CARCINOMAS AND BENIGN TUMOURS

Part II

AN ANALYTICAL STUDY BY XRD AND LAMMA

SUMMARY

Endogenous microcalcifications observed in benign and malignant human breast tumors have been studied. These microcalcifications were microanalyzed using XRD (X-Ray Diffraction) and LAMMA (Laser microprobe mass analyzer).

RESUM

Hom ha estudiat les microcalcificacions endògenes procedents de biòpsies de tumors benignes i malignes de mama humana.

Les tècniques emprades han estat la difracció de raigs X (XRD) i l'espectrometria de masses d'ions secundaris excitats per làser (LAMMA). La presència d'oxalats, carbonats i fosfats càlcics ha estat detectada tant en els casos benignes com en els malignes.

Paraules clau: Càncer de mama, calcificacions, difracció de raigs X, espectrometria de masses d'ions secundaris excitats per làser, física mèdica, patologia.

Key words: Breast cancer, calcifications, X-ray diffraction, laser microprobe mass analysis, pathology, medical physics.

1. Introducció

En la primera part d'aquest treball, les mostres foren estudiades mitjançant tècniques clíniques i microanàlisi SEM i EDXA. Per aprofundir en el tema fou planificada una segona etapa que comprenia l'estudi de la resta de les mostres més significatives i abundants amb XRD i LAMMA.

Una vegada eliminat el teixit orgànic, no sempre era possible d'aplicar totes les tècniques esmentades, a causa de la migrada quantitat de mostra disponible.

D'altra banda, els resultats obtinguts en la primera part, no permetien de determinar d'una manera unívoca les fases constituents de les microcalcificacions: no s'hi podia identificar d'una manera fefaent com estava el fòsfor o davant de quin polimorf de carbonat càlcic ens trobàvem.

T A U L A 1

| Cas n.º. | Diagrama GST N. | Apatita | Calcita | | Àcid Oxàlic | Caràcter benigne (B) o maligne (M) |
|----------|-----------------|---------|---------|---------|-------------|------------------------------------|
| 1 | 69 | X | | | | M |
| 2 | 70 | X | | | | M |
| 3* | 12 | X | | | | B |
| 4 | 71 | X feble | X | | | M |
| 5 | 72 | X | | X feble | | M |
| 6 | 78 | X | | X feble | | M |
| 7 | 11 | | | X | X | M |
| 8 | 77 | X | | X feble | | M |
| 9 | 18 | X | | | | M |
| 10 | 10 | | | X | X | M |
| 11 | 6 | | X | | | M |
| 12 | 8 | | X | | | B |
| 13 | 75 | X | | | | B |
| 14 | 76 | | | X | X | M |

* Indica la presència de la línia I_{100} de l'aragonita, la qual presentava una intensitat molt feble

* Indicates the presence of I_{100} line of aragonite with a very weak intensity

Aquestes foren les raons per les quals foren aplicats d'una manera sistemàtica la difracció de raigs X i el LAMMA, que resolen la qüestió i es confirmen mútuament.

2. Mètodes i resultats

A) Difracció de raigs X

Hom ha treballat amb una cambra STOE tipus Guinier amb monocromador de grafit per a la radiació de Cu.

Disposarem de mostra suficient en 14 casos, els resultats obtinguts dels quals són endreçats a la taula 1.

B) Espectrometria de masses d'ions secundaris excitats per làser (LAMMA)

El mètode és basat en un làser que indueix la producció d'ions per evaporació de microvolums d'una mostra i analitza les fraccions ionitzades (ions atòmics o bé moleculars) de material evaporat en un espectròmetre de masses de «temps de vol». Aquesta tècnica identifica tant els elements com llurs isòtops, amb una sensibilitat de l'ordre de parts per milió i un límit de detecció extremadament baix (10^{-18} i 10^{-20} g) amb una resolució lateral sobre la mostra de 0,5 a 1 μm .

Amb un microscopi òptic hom pot visualitzar el punt d'impacte del làser excitant.

Hom treballà amb un aparell LAMMA 500 Leybold Heraeus.¹

Com a materials de referència foren emprats oxalat càlcic, fosfat càlcic i carbonat càlcic a fi de poder determinar els *fingerprints* d'aquests compostos, tant per a ions positius com per als negatius, els quals coincidiren amb els que hom troba a la bibliografia.^{2, 3}

Foren obtinguts els espectres LAMMA dels cristalls inorgànics procedents de tres casos malignes i de dos de benignes.

Les figures números 1 i 2 corresponen a dos espectres de polaritat positiva, productes de dos impactes amb el làser infraroig damunt cristalls procedents d'una tumoració benigna i d'una de maligna, respectivament.

Hom identificà en tots els casos els materials compostos, oxalat, fosfat i carbonat càlcic.

A títol indicatiu, hom mostra a la figura 3 un espectre LAMMA corresponent a un fosfat càlcic monohidratat.

1. SCHMIDT, P. F., «Laser microprobe mass analyzer», Chapter 3 in Analysis of organic and biological surfaces, Edited by Patrick Echlin John Wiley and Sons, Chichester, 1984.

2. SCHMIDT, P. F., HAGEN, B., LEUSMANN, D. B., «Laser microprobe mass analysis of carbonate in apatite of biological concretions», in Microbeam Analysis (1985), J. T. Armstrong, Ed. San Francisco Press, Inc., 331-336.

3. PAU, H., KAUFMANN, R., «Laser microprobe Analysis (LAMMA) of spheruliths in human cataract Lenses», Arch. Ophthalmol. Vol. 101 Dec. (1983), 1935-1937.

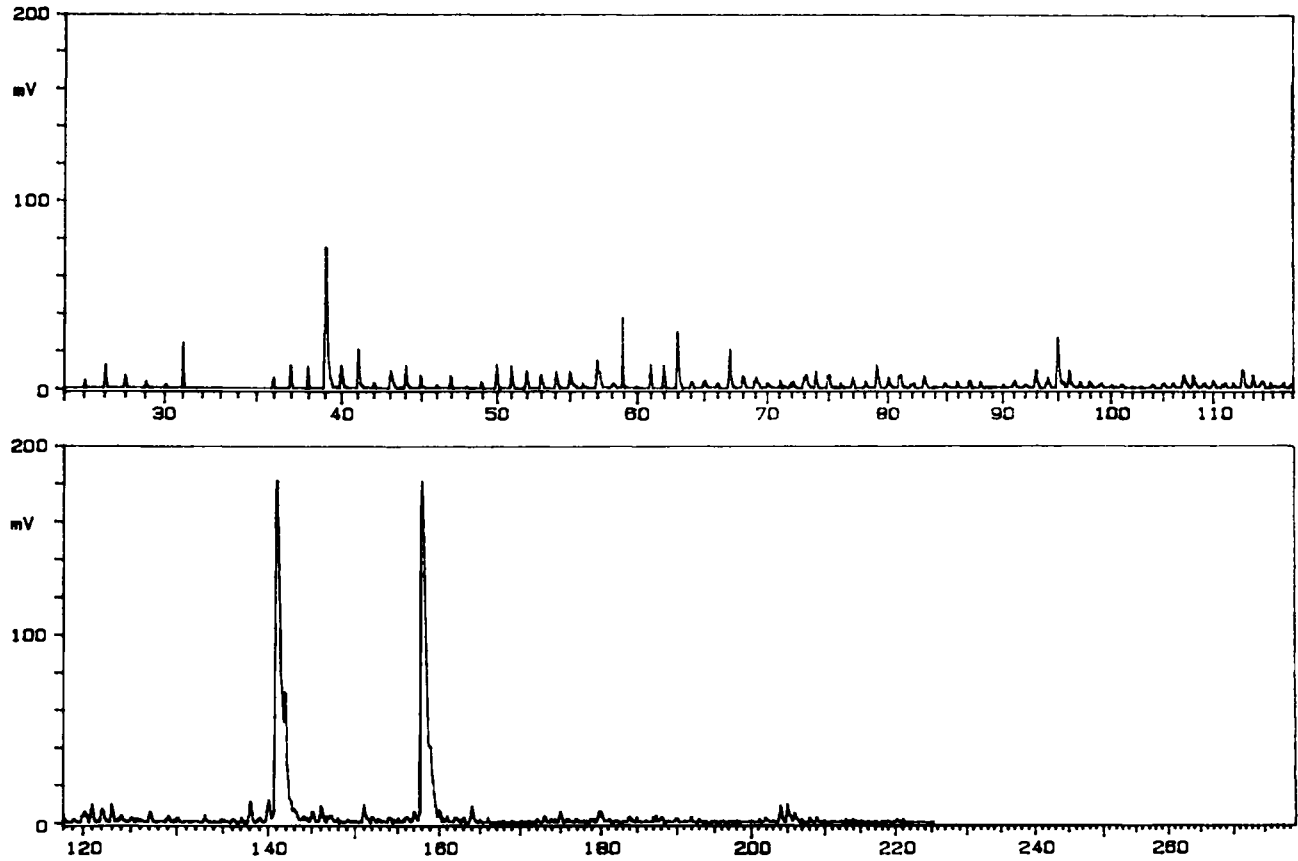


Fig. 1. - Espectre LAMMA de polaritat positiva de cristalls procedents d'un tumor benigne.

Fig. 1. - LAMMA spectrum (+) of microcrystals removed from a benign tumour.

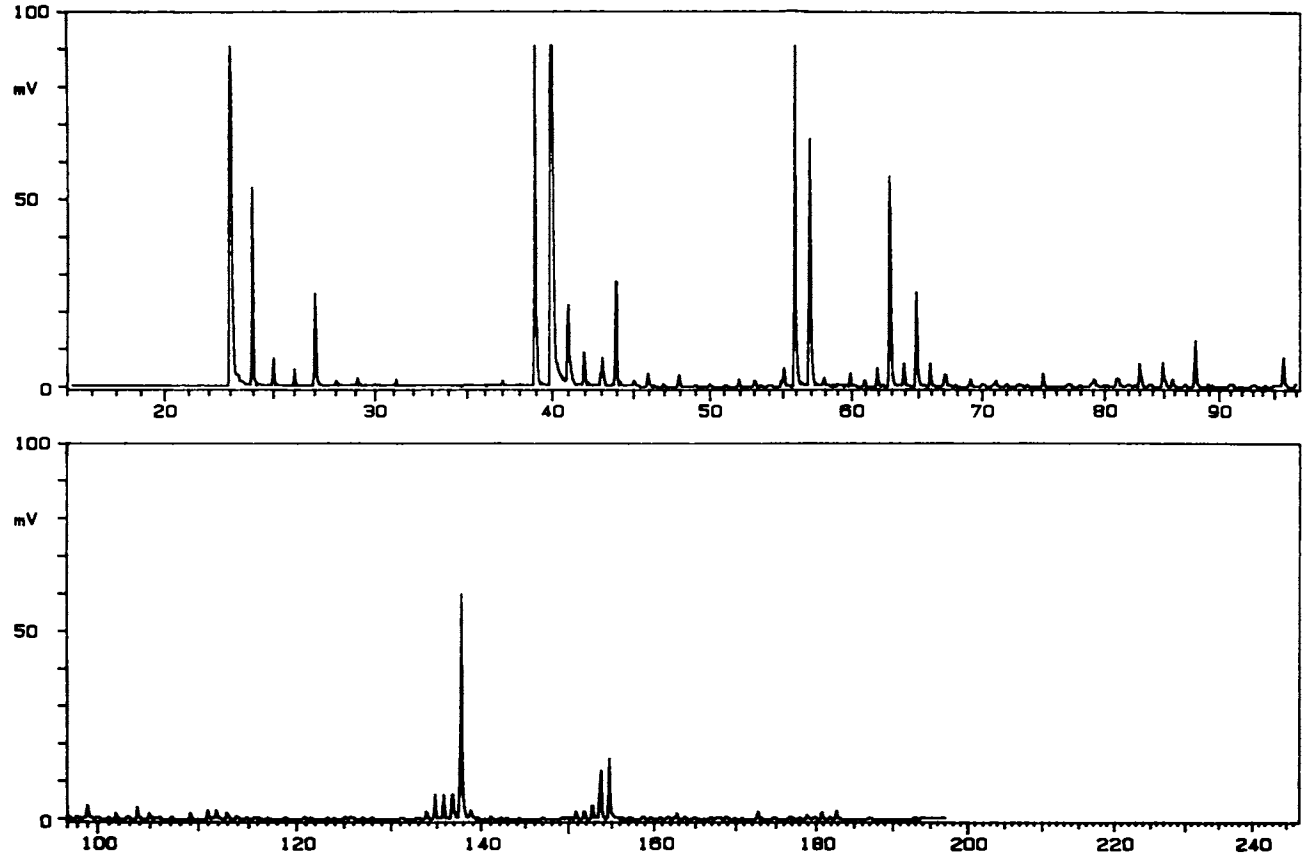


Fig. 2. - Espectre LAMMA de polaritat positiva de cristalls procedents d'un tumor maligne.

Fig. 2. - LAMMA spectrum (+) of microcrystals removed from a malignant tumour.

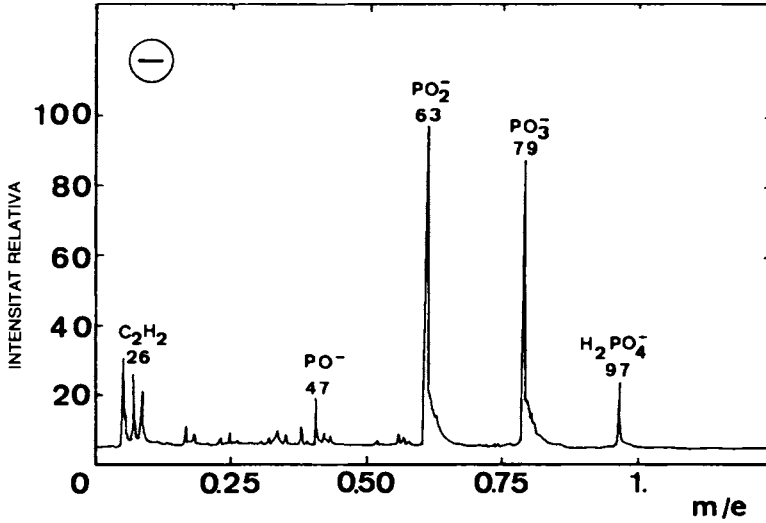


Fig. 3. - Aquesta figura mostra un espectre LAMMA de polaritat negativa corresponent a un fosfat càlcic monohidratat.

Fig. 3. - Shows a LAMMA spectrum (—) of calcium monohydrogen phosphate.

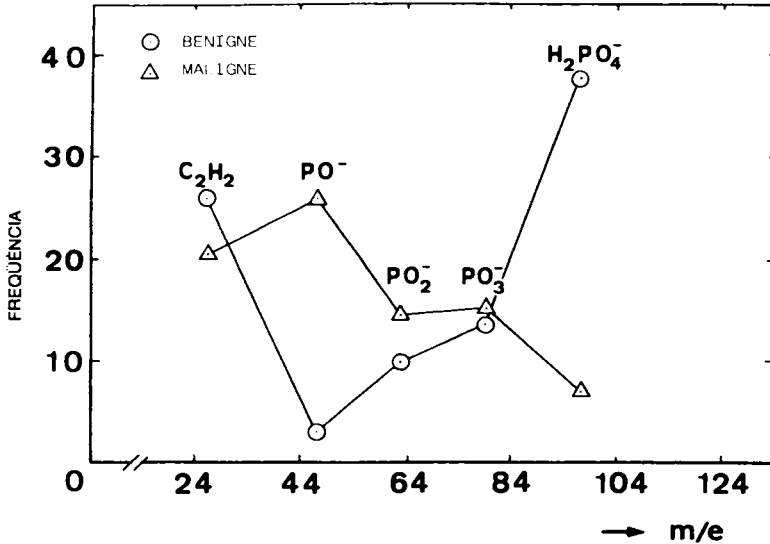


Fig. 4. - Construcció d'un diagrama de freqüències corresponent als ions negatius de fosfat de calci.

Fig. 4. - Construction of a frequency diagram corresponding to the negative ions of calcium phosphate.

3. Discussió

La presència d'apatita no té significat quant al caràcter benigne o maligne d'una tumoració. Sembla raonable de pensar que qualsevol alteració patològica de la mama amb calcificacions en produeixi d'apatítiques.

La tècnica LAMMA és molt més sensible que la XRD; això vol dir que la determinació d'oxalats per aquest segon mètode implica una acumulació d'aquest compost.

Segons l'apunt estadístic del present treball, la determinació d'oxalats per XRD podria posar de manifest la malignitat d'una tumoració.

Per més que la calcita significaria una alteració específica independent de l'apatítica, no constitueix un caràcter específic de malignitat o benignitat de la tumoració.

En aquells casos on el diagrama de l'oxalat càlcic presenta línies intenses, hom hi pot identificar alhora àcid oxàlic; per contra, en aquells casos on l'àcid oxàlic no ha estat determinat, les línies de l'oxalat són molt febles. Això fa pensar que l'oxalat sempre va acompanyat de l'àcid corresponent. Sembla raonable de concloure que l'oxalat és produït a través de l'àcid oxàlic.

Cal remarcar finalment que, segons l'àmplia bibliografia consultada, és la primera vegada que hom determina l'oxalat anhidre en patologia humana.^{4, 5, 6, 7, 8}

Com a temptativa per a l'anàlisi comparativa, LAMMA, entre malignes i benignes hom dugué a terme l'estudi estadístic dels següents ions negatius $C_2H_4^-$, PO^- , PO_2^- , PO_3^- , $H_2PO_4^-$ reunits a la figura 4. Hom pot veure-hi una gran dispersió entre els ions PO^- i $H_2PO_4^-$ de malignes i benignes. Això fa pensar en la possibilitat de definir una empremta o *fingerprint* de malignitat o benignitat.

4. FRYE, K., «Encyclopedia of Mineralogy», 1981. Hutchinson Ross Publishing Company — Stroudsburg — Pennsylvania, 201-202.

5. GLYNN, L. E., «Crystalline Bodies in tunica media of middle cerebral artery», J. Pthol. Bact. (1940), 51, 455.

6. GROSS, S., «Granulomatous thyroiditis with anisotropic crystalline material», Ach. Pathol. (1955), 59, 412.

7. BENNINGTONG, J. L., HABER, S. L., SMITH, J. V., WARNER, N. E., «Crystals of calcium oxalate in human kidney: studies by means of electron microprobe and XR Diffraction» Am. J. Clin. Pathol. (1964), 41, 8.

8. GIBSON, R. I., «Descriptive human pathological Mineralogy», Am. Miner. (1974), 59, 1.177-1.182.

ADDENDA

Aspectes parcials d'aquest treball foren presentants al «10 th International Symposium of Microchemical Techniques», que tingué lloc a Antwerpen (Anvers) el mes d'agost del 1986, amb una comunicació que portà per títol «Calcifications in Human Breast Carcinomas and Benign Tumours: A microanalytical study by SEM, EDXA, XRD and LAMMA», la qual serà publicada dins el volum monogràfic del Congrés a *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, Holanda (en premsa).

DETECCIÓ D'ALUMINI I DE FERRO AL LLARG DE LA LÍNIA DE CALCIFICACIÓ EN PACIENTS AMB INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA DURANT PROGRAMES D'HEMODIÀLISI

per

JOSEP M TURA *, SERGI SERRANO **, JAUME AUBIA **, LLUYSA MARIÑOSO **, ADOLF TRAVERIA ***, MONTSERRAT MARSAL ****

* Laboratori de Tècniques Físiques d'Anàlisi (I.T.Q.T.), Centre d'Investigació i Desenvolupament del C.S.I.C. Barcelona. ** Hospital de la Mare de Déu de l'Esperança. Ajuntament de Barcelona. *** Institut Jaume Almera, C.S.I.C. Barcelona. **** Departament de Metalúrgia i Siderúrgia. Universitat Politècnica de Catalunya.

Aquest treball forma part del programa núm. 2213 de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans, carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona i del programa n. IM866112 de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica - Barcelona.

This work is part of programme number 2213 of the Science Section of the Institut d'Estudis Catalans. Carme Street 47. 08001 Barcelona, and of programme n. IM866112 of the Institut Municipal d'Investigació Mèdica - Barcelona.

DETECTION OF ALUMINIUM AND IRON ALONG THE LINE OF BONE CALCIFICATION IN PATIENTS WITH CHRONIC RENAL INSUFFICIENCY DURING HAEMODIALYSIS PROGRAMMES

SUMMARY

High levels of aluminium were detected in the plasma of patients taking chelates (gels of aluminium).

Conventional histochemical techniques were used to detect the presence of aluminium (try-auxylic acid staining) and iron (Perls technique) in the calcification line of bone biopsies of patients with chronic renal insufficiency during haemodialysis programmes. The same biopsies were studied microanalytically by means of EDXA (Energy Dispersive X-ray Analysis) and SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry). The latter technique, which corroborated the histochemical studies, has proved to be more sensitive than EDXA and has demonstrated, probably for the first time, the simultaneous presence of aluminium and iron in the same calcification line.

Paraules clau: Medulla òssia, osteomalàcia, hemodiàlisi, espectrometria de masses d'ions secundaris, EDXA, microscòpia electrònica de rastreig.

Key words: Bone marrow, osteomalacia, haemodialysis, Secondary Ion Mass Spectrometry, Energy Dispersive X-ray Analysis, Scanning Electron Microscopy.

RESUM

Hom ha estudiat, mitjançant tècniques histoquímiques convencionals, la presència d'alumini (tècnica de l'àcid aurin-tricarboxílic) i ferro (tècnica de Perls) en els fronts de calcifi-

ció de biòpsies òssies de pacients urèmics en programa d'hemodiàlisi. Aquestes mateixes biòpsies han estat sotmeses a un estudi microanalític mitjançant EDXA (Energy Dispersive X-ray Analysis) i SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry). Aquesta darrera tècnica ha corroborat les troballes histològiques, ha demostrat que posseïa una major sensibilitat que l'EDXA i ha permès de demostrar, probablement per primera vegada, la presència simultània d'alumini i de ferro en un mateix front de calcificació.

1. *Introducció*

En pacients amb insuficiència renal crònica sotmesos a tractament mitjançant hemodiàlisi periòdica ha estat demostrat en ocasions un dèficit en la mineralització òssia (osteomalàcia) que hom ha relacionat, entre altres causes, amb l'elevació dels nivells sèrics d'alumini que presenten alguns d'aquests malalts.^{1, 2, 3} Aquesta elevació estaria relacionada amb la presència d'alumini a l'aigua d'hemodiàlisi i/o en els quelants de fòsfor que ingereixen aquests malalts. D'altra banda hom ha assenyalat més recentment que el ferro acumulat com a conseqüència de l'hemòlisi crònica i de les transfusions podria tenir, en certes ocasions, un determinat paper en aquest procés patològic.⁴

La detecció de concentracions elevades d'alumini a les cendres de les biòpsies òssies d'aquest pacients¹ i la probable identificació en els fronts de calcificació d'aquest element per mitjà de tècniques histoquímiques, permeté de confirmar la presència de dipòsits d'alumini en el teixit ossi. No obstant això, les tècniques de detecció emprades en els treballs histològics amb la finalitat d'esbrinar la distribució de l'alumini en el teixit ossi no ofereixen les garanties suficients d'especificitat; mentre que, al contrari, les tècniques que utilitzen la microincineració seguida d'una anàlisi per activació de neutrons tèrmics, malgrat llur sensibilitat i precisió, no permeten un estudi topogràfic de la distribució d'aquest element en el teixit ossi. L'objectiu del present treball és d'estudiar les possibilitats d'algunes tècniques de la física microanalítica (EDXA i SIMS) per a ajun-

1. PARSONS, V.; DAVIES, C.; GOODE, C.; OGG, C.; SIDDIQUI, J. «Aluminium in bone from patients with renal failure». *Br. Med. J.* 4 (1971), 273-275.

2. ALFREY, A. C.; HEGG, A.; MILLER, N.; BERT, T.; HEARN, A. «Interrelationship between calcium and aluminium metabolism in dialysed uremic patients». *Mineral Electrolyte Metab.* 2 (1979), 81-87.

3. MARSDEN, S. N. E.; PARKINSON, I. S.; WARD, M. K.; ELLIS, H. A. and KERR, N. S. «Evidence for aluminium accumulation in renal failure», *Proc. EDTA.* 16 (1979), 588-596.

4. PIERIDES, A. M. «Iron and Aluminium osteomalacia in hemodialysis patients», *The New England J. of Medicine*, 310 (1983) 323.

5. GOKAL, R.; RAMOS, J. M.; ELLIS, A. H. and col. «Histological renal osteodystrophy, and 25-hydroxy-cholecalciferol and aluminium levels in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis», *Kidney International.* 23 (1983), 15-21.

tar: 1) una identificació fiable; 2) una alta sensibilitat, i 3) una localització topogràfica precisa dels elements metàl·lics en estudi.^{6, 7}

2. Material i mètodes

2.1. Microscòpia òptica

Hom ha utilitzat biòpsies transil·laques obtingudes emprant un trocar Bordier⁸ de set mil·límetres de diàmetre intern. Aquestes biòpsies han estat dessecades amb alcohol etílic al 70 % i incloses sense descalcificació prèvia en metil metacrilat.^{9, 10} Els blocs de plàstic així obtinguts foren tallats en seccions de 5 µm de gruix per mitjà d'un micròtom per a teixits durs (micròtom K de Jüing equipat amb una ganiveta de carbur de tungstè de perfil HK2) i tenyits amb la tècnica de l'àcid aurin-tricarboxílic¹¹ per tal de posar de manifest l'alumini i la tècnica de Perls¹² per a tenyir el ferro.

2.2. Tècniques SEM i EDXA

A partir dels blocs de plàstic foren obtingudes seccions d'un mil·límetre de gruix mitjançant una serra elèctrica de diamant. Posteriorment foren desplastificades amb metil acetat, deshidratades amb acetona a concentracions creixents i dessecades amb la tècnica del punt crític. Un cop dessecades, foren fixades amb albúmina de Mayer a un portamostres de grafit i recobertes amb una capa de carbó polvoritzat, per tal de poder-les estudiar amb un SEM Philips 500, al qual fou acoblat un microanalitzador EDAX. L'anàlisi global per energia dispersiva

6. COURTNOT-WITHER, G.; ZINGRAFF, J.; PLACHOT, J.; ESCAIG, F.; LAFEBRE, R. and col. «Aluminium localization in bone from haemodialyzed patients: Relationship to matrix mineralization». *Kedney International*, 20 (1981), 375-385.

7. SCHMIDT, P. F.; ZUMKLEY, H.; BERTRAM, H.; LISON, A. and col. «Localization of aluminium in patients with dialysis osteomalacia». *Trace Element Analytica Chemistry in Medicine and Biology*, 3, Walter de Gruyter and Co. Berlin (1984), p. 475.

8. BORDIER, P.; MATRAJ, H.; MIRAVET, B.; HIICO, D. «Mesure histologique de la masse et de la resorption des travées osseuses». *Pathol. Biol.* 12, 1238 (1964), Paris.

9. «Bone Histomorphometric: Techniques and Interpretation», Recker R. R. Boca Raton FLORIDA CRC PRESS INC. (1983).

10. «Histomorphometric preparation and technique. Determination of trabecular bone volume». SCHULTZ, A.; DELLING, G. 106 in *First Workshop on Bone Morphometry* Meunier P. J. Ed. Armour Montagu. Paris (1973).

11. «Histochemistry», A. G. Everson Pearse Ed. Churchill Livingstone. Gloucester Place, London W1. (1972) 1402.

12. «Histochemistry», A. G. Everson Pearse Ed. Churchill Livingstone. Gloucester Place, London W1. (1972) 1407.

de raigs X fou duta a terme emprant un temps d'anàlisi de 100 segons i un feix primari d'electrons d'un diàmetre de spot de 0,125 μm .^{13, 14, 15}

2.3. Tècnica SIMS

Per a l'aplicació d'aquesta tècnica hom emprà el mateix tipus de preparació de les mostres que en el cas del SEM; en aquest cas no foren ombrejades amb grafit. L'anàlisi dels ions secundaris fou duta a terme amb un SIMSLAB VG Científic, equipat amb un espectròmetre de masses quadripolar MM12-12S. Hom utilitzà com a font d'impacte un canó d'ions metàl·lics de galli líquid del tipus MIG 300, el qual operà a una energia de 39 KeV i amb una grandària de spot menor de 500 A. Hom utilitzà la tècnica del SIMS imatge.^{16, 17, 18}

3. Resultats

3.1. Microscòpia òptica

La tècnica histoquímica per a la detecció d'alumini (àcid aurin-hidroxicòlic) demostrà la presència d'aquest element en els fronts de calcificació en forma de dipòsits de color vermell.^{5, 11} La tècnica per a la detecció de ferro (mètode de Perls) demostrà la presència d'aquest element en els fronts de calcificació en forma de dipòsits de color blau.¹² La figura 1 mostra els resultats aconseguits en el nostre cas. La impossibilitat d'aplicar simultàniament ambdues tècniques a una mateixa secció òssia impedí de demostrar la coexistència d'aquests elements en un front de calcificació.

3.2. SEM i EDXA

Aquesta tècnica^{13, 14, 15} permeté de demostrar l'existència de nivells elevats d'alumini i de ferro a les trabècules òssies, però no permeté una localització topogràfica precisa en els fronts de calcificació (figures 2 i 3).

3.3. SIMS

El SIMS^{16, 17, 18} demostrà que el Ca (figura 4) es concentra a la zona mineralitzada de la trabècula mentre que a la interfase entre l'os mineralitzat i l'os

13. OGILVIE, R. E. IITRI/SEM 1969, 21.

14. SUTFIN, L. V.; OGILVIE, R. E. IITRI/SEM 1970, 17.

15. RUSS, J. C. IITRI/SEM 1971, 65.

16. LODDING, A.; ODELIUS, H. «Application of SIMS in interdisciplinary materials characterization», *Mikrochim Acta*, Suppl. 10 (in press).

17. BENNINGHOVEN, A., et al. (Hrsg) (1979) SIMS II, Proceedings of the SIMS-Conference in Stanford 1979. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

18. BENNINGHEVEN, A., et al. (Hrsg) (1982) SIMS III; Proceedings of the SIMS-Conference in Budapest 1981. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

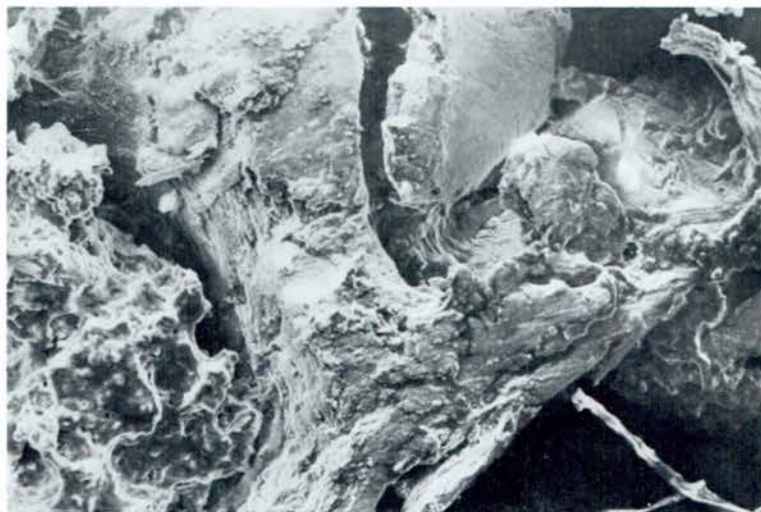


Fig. 2. - Imatge per electrons secundaris (SEM) d'una secció transversal òssia. Les cavitats observables entre les trabècules són ocupades per la medulla òssia en el teixit vivent (x 160).

Fig. 2. - Secondary electron image (SEM) of a bone cross-section. Cavities formed between the trabeculae are occupied by bone marrow in living tissue (x 160).

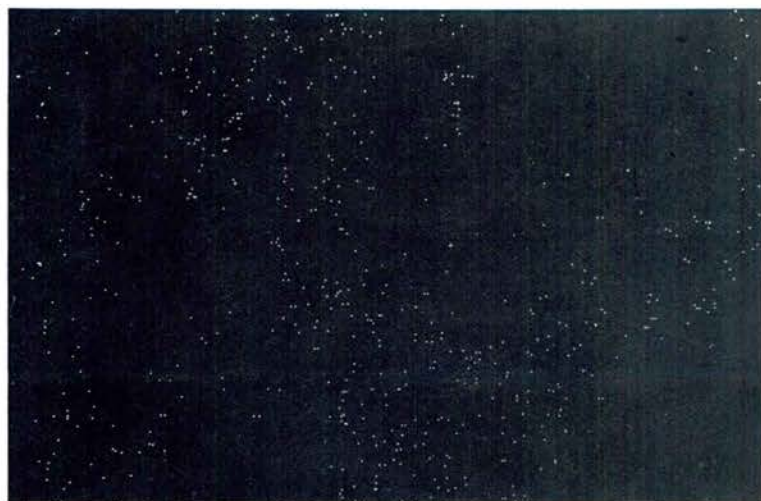


Fig. 3. - Mapping EDX d'alumini de les trabècules mostrades a la figura 2.

Fig. 3. - Aluminium EDX mapping of the trabeculae shown in figure 2.

teoide es concentraven l'alumini, el ferro i el sodi (figures 5, 6 i 7). Per consegüent, aquesta tècnica permeté una localització topogràfica precisa d'aquests elements en el front de mineralització i demostrà, probablement per primera vegada, que en una mateixa zona coexistien dipòsits d'alumini i de ferro.

La figura 8 dóna una visió de conjunt de la distribució dels ions Ca^+ , Al^+ , Fe^+ i Na^+ . Al mateix temps hom pot observar-hi que el ferro i el sodi es superposen en el front de calcificació.

A la figura 9 hom comprova que el Ca^+ i el $(\text{C}_2)^-$ s'exclouen mútuament, és a dir, on està present el calci no hi ha carboni, i a la inversa.

Agraïments

Els autors agraeixen al Dr. J. Wolstenholme, de V.G. Scientific, la seva amable col·laboració en aquest treball. També agraeixen als becaris de la CIRIT senyors Josep Elvira, Ferran Garcia i Joan Pujadas llur col·laboració en la preparació de les mostres.

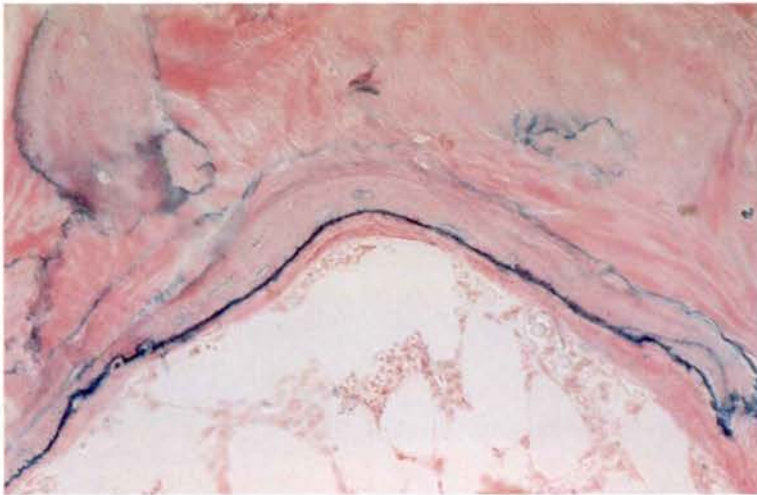


Fig. 1. - A dalt, els dipòsits d'alumini en els fronts de calcificació apareixen com a línies roges (tècnica de l'àcid aurin-tricarboxílic) (x 400). A baix, els dipòsits de ferro en un altre front de calcificació apareixen com una línia blava (tècnica de Perls) (x 250).

Fig. 1. - Above, aluminium deposits in the calcification fronts are shown as red lines (aurin tri-carboxylic acid technique) (x 400). On the bottom, iron deposits in another calcification front are shown as a blue line (Perls technique) (x 250).

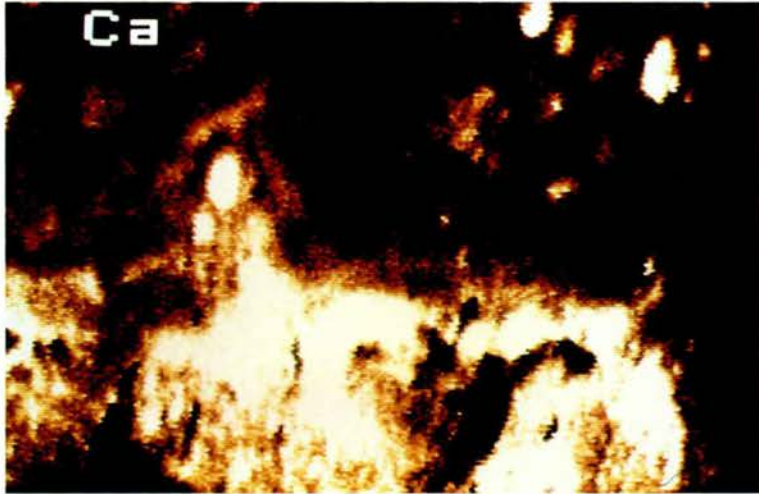


Fig. 4 - Mapa iònic $^{40}\text{Ca}^+$ d'una mostra òssia. Una àrea de teixit ossi calcificat és clarament observable com una àrea brillant en aquesta imatge.

Fig. 4. - The $^{40}\text{Ca}^+$ ion map from a sample of bone. An area of calcified bone tissue is clearly observed as a bright area on this image.



Fig. 5. - El mapa iònic $^{27}\text{Al}^+$ mostra que aquest element es troba concentrat a la vora de la juntura entre el material ossi calcificat i el no calcificat.

Fig. 5. - The $^{27}\text{Al}^+$ ion map shows that this element is concentrated near the junction between the calcified and the non-calcified bone material.

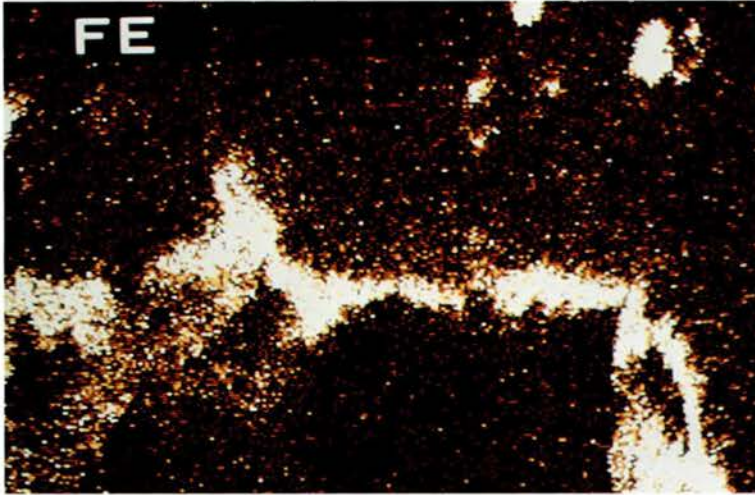


Fig. 6. - Mapa iònic SIMS positiu del ferro. La imatge mostra una gran concentració d'aquest element prop de la juntura amb l'àrea rica en calci.

Fig. 6. - SIMS positive ion map of iron. This figure shows the greatest concentration near the edge of the calcium rich area.

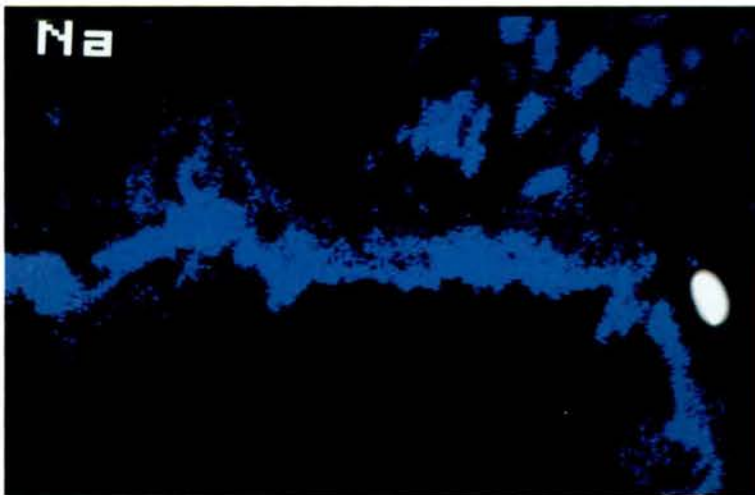


Fig. 7. - Mapa iònic SIMS positiu del Na⁺, la localització del qual coincideix amb la del Fe.

Fig. 7. - SIMS positive ion map of Na⁺ whose localization overlaps the iron one.

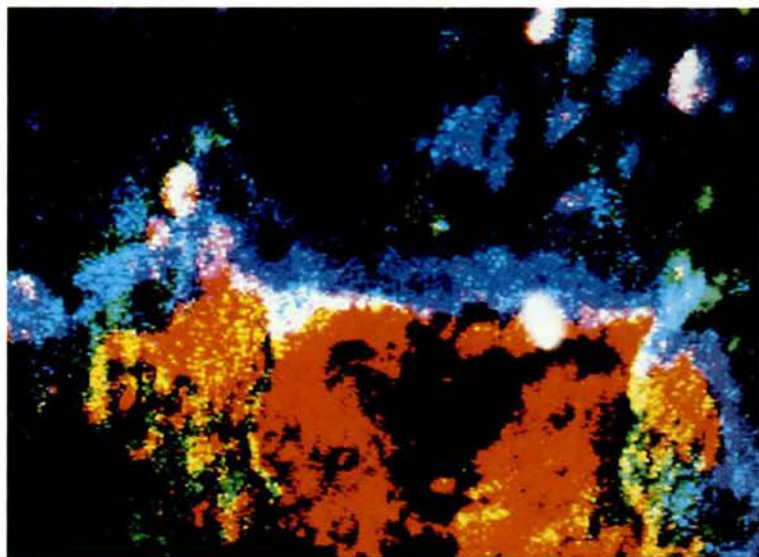


Fig. 8. - Distribució conjunta dels ions $^{40}\text{Ca}^+$ (vermell), $^{27}\text{Al}^+$ (verd), $^{56}\text{Fe}^+$ (blanc) i $^{38}\text{Na}^+$ (blau) on es pot apreciar que llur distribució és a l'entorn del front de calcificació.

Fig. 8. - This framestore overlay show $^{27}\text{Al}^+$ (green), $^{56}\text{Fe}^+$ (white), $^{23}\text{Na}^+$ (blue) and the original $^{40}\text{Ca}^+$ map (red). It is clear from the overlay that much of the sodium and aluminium is concentrated near the junction between the calcified and the non-calcified bone material.

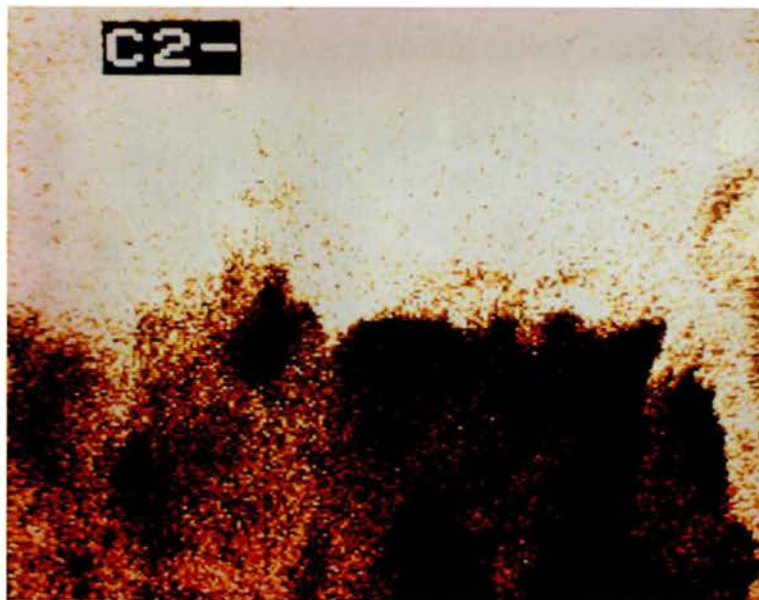


Fig. 9. - Mapa iònic SIMS negatiu del $^{24}(\text{Ca})^-$.

Fig. 9. - SIMS negative ion map of $^{24}(\text{Ca})^-$.

ACABAT D'IMPRIMIR
A LA IMPREMTA ALTÉS, S.L., DE BARCELONA
A LES PRIMERIES D'ABRIL
DE MIL NOU-CENTS VUITANTA-NOU

