

# APORTACION DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE SUPERFICIE Y DEL ANALISIS DISPERSIVO DE ENERGIA AL ESTUDIO DE LAS ASBESTOSIS

E. Monsó, J.M. Tura\*, M. Marsal\*\*, F. Morell\*\*\* y Ll. Bernadó\*\*\*\*.

Sección de Neumología. Hospital Arnau de Vilanova. Lleida.

Laboratorio de Microscopía Electrónica del ITQT. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Barcelona.\*

Departamento de Metalurgia y Siderurgia de la ETSII. Universidad Politécnica. Barcelona.\*\*

Sección de Neumología.\*\*\* Departamento de Anatomía Patológica.\*\*\*\* Hospital General Vall d'Hebrón. Barcelona

Se ha realizado un análisis mineralógico con microscopía electrónica de superficie (MES) y análisis dispersivo de energía (ADE), técnicas de mayor sensibilidad y especificidad que la microscopía óptica, en cinco muestras de tejido pulmonar en las que se han identificado fibras de asbesto. En tres de ellas se había establecido un diagnóstico de asbestosis después del examen con microscopía óptica y de luz polarizada. Todas las muestras mostraron fibras de asbesto en número incontable, pero en dos de ellas se identificó un número también incontable de partículas de silicatos no fibrosos, diagnosticándose definitivamente de silicoasbestosis. Las dos muestras restantes habían sido diagnosticadas previamente de fibrosis pulmonar idiopática. En las dos se identificaron incontables fibras de asbesto.

El MES con ADE, por ser una técnica mineralógica no destructiva y fácilmente reproducible, puede ser muy útil en el diagnóstico de las asbestosis.

Contribution of surface electron microscope study and energy dispersion analysis to assessment of asbestosis

In five samples of lung tissue in which asbestos fibers had been identified, a mineralogic analysis by means of surface electron microscopy and energy dispersion analysis, which are techniques whose sensitivity and specificity are higher than those of light microscope, were carried out. In three of such samples, a diagnosis of asbestosis had been established by means of light and polarizing microscope study. All samples contained uncountable amounts of asbestos fibers, and in two of them, there were also uncountable amounts of non fibrous silicate particles, thus being diagnosed of silicoasbestosis. The two remaining samples had been previously diagnosed of idiopathic pulmonary fibrosis. Uncountable asbestos fibers had been identified in the two samples.

Surface electron microscope study and energy dispersion analysis may be useful in diagnosing asbestosis because they are mineralogic techniques non destructive and easily reproducible.

*Arch Bronconeumol 1988; 24:236-238*

## Introducción

El avance que se ha producido en las técnicas de análisis mineralógico en las últimas dos décadas ha posibilitado su aplicación en medicina<sup>1,2</sup>. Entre las técnicas que es posible utilizar sobre materia orgánica destaca la microscopía electrónica de superficie (MES) asociada al análisis dispersivo de energía (ADE)<sup>3</sup>. El ADE permite la identificación de la composición atómica de una partícula hallada en una muestra, sin requerir para ello destrucción tisular. Con el uso conjunto del MES y el ADE se visualizan partículas inorgánicas en el tejido y se puede conocer su composición. Esta aproximación es especialmente adecuada para el estudio de las asbestosis, ya que el asbesto es un silicato fibroso, y como tal puede ser identificado con facilidad.

Se han estudiado con MES y ADE cinco muestras de tejido pulmonar en las que se han identificado fibras de asbesto. En tres de las muestras, el diagnóstico de asbestosis había sido establecido con microscopía óptica y de luz polarizada. El examen con MES y ADE mostró que el diagnós-

tico inicial era incompleto en dos de estos pacientes. El estudio anatomopatológico convencional no había identificado cuerpos de asbesto en los dos pacientes restantes, por lo que habían sido diagnosticados de fibrosis pulmonar idiopática.

## Material y métodos

Se han analizado con MES y ADE cinco muestras de tejido pulmonar obtenido por biopsia pulmonar del lóbulo de la lingula por toracotomía mínima (4 casos), o necropsia (un caso) en nuestro hospital. Tres de los pacientes estudiados eran varones fumadores con edades comprendidas entre 58 y 62 años, con un antecedente conocido de inhalación de asbesto. En el examen físico se hallaron estertores bibasales y la radiología de tórax evidenció un patrón reticulonodular y/o apanalado de predominio en bases. Las pruebas funcionales respiratorias mostraron un trastorno ventilatorio restrictivo de grado ligero o moderado. En el examen anatomopatológico convencional con microscopía óptica y de luz polarizada se halló fibrosis pulmonar asociada a cuerpos de asbesto, por lo que se estableció el diagnóstico de asbestosis. Los otros dos enfermos fueron diagnosticados de fibrosis pulmonar idiopática después del examen de la pieza biopsica. Uno de ellos, un varón fumador de 70 años con un patrón radiológico reticular y un trastorno ventilatorio restrictivo ligero, había estado expuesto al asbesto, pero en el tejido pulmonar

Recibido el 18-3-1988 y aceptado el 24-6-1988.

no se visualizaron cuerpos de asbesto. El quinto paciente, una mujer no fumadora, había trabajado por un período largo de tiempo en una fábrica textil, sin exposición reconocida al asbesto. En el estudio histopatológico con microscopía óptica y de luz polarizada se observaron algunas fibras aisladas que no pudieron ser identificadas, diagnosticándose finalmente la paciente de fibrosis pulmonar idiopática. La biopsia pulmonar se indicó en los pacientes con un antecedente ocupacional significativo, porque dicho antecedente había sido de breve duración y/o existían otras posibilidades en el diagnóstico diferencial inicial, no confirmables sin la obtención de una muestra tisular.

Las muestras tisulares fueron incluidas en parafina, y cortadas con un microtomo de rotación en secciones de 20 micras. Posteriormente fueron desparafinadas con dos baños de xilol y deshidratadas por punto crítico (Polaron E300). Para el análisis con MES (Phillips SEM500) y ADE (EDAX) las muestras se colocaron sobre un portaobjetos de carbón puro. Se descartó contaminación con asbesto u otras partículas inorgánicas de la parafina y los portaobjetos. El examen visual se realizó inicialmente a baja magnificación (160x), evitando las áreas subpleurales, peribronquiales y perivascularales. Cuando fue necesario la magnificación se aumentó hasta 5000x para visualizar partículas inorgánicas. Al identificarse una imagen morfológica de fibra (longitud superior a 3 veces la anchura), se hizo un análisis de composición atómica con ADE. La fibra fue considerada de asbesto si el nivel de detección de silicio en la misma estaba significativamente elevado (fig. 1). El hallazgo de fibras de asbesto sólo fue estimado como patológico si su número era incontable. En un pulmón normal pueden hallarse fibras aisladas de asbesto en nuestro país<sup>4</sup>.

### Resultados

En las tres muestras de tejido pulmonar con diagnóstico previo de asbestosis se observaron incontables fibras de asbesto, que reafirmaban el diagnóstico inicial. No obstante, en dos de las muestras analizadas se visualizó asimismo un número también incontable de partículas de silicatos no fibrosos, que no habían sido detectadas en el examen anatomopatológico convencional (tabla I). Se consideró que el diagnóstico inicial era incompleto, estableciéndose un diagnóstico definitivo de silicoasbestosis.

En las dos muestras histológicas diagnosticadas previamente de fibrosis pulmonar idiopática, el examen con MES y ADE mostró incontables fibras de asbesto (fig. 2, tabla I). La primera muestra correspondía a un paciente con antecedentes de inhalación de asbesto. El diagnóstico definitivo, no precisado con el examen anatomopatológico convencional, fue de asbestosis. La segunda biopsia procedía de una paciente que había trabajado en la industria textil sin exposición conocida al asbesto, en la que se habían visto fibras con el microscopio óptico que no habían podido ser reconocidas. Se comprobó que las fibras, en número incontable y de morfología atípica, eran realmente fibras de asbesto. En ninguno de estos dos casos se detectaron en número significativo otras partículas inorgánicas distintas del asbesto en el tejido pulmonar.

### Discusión

Las limitaciones de la microscopía óptica en el reconocimiento de partículas inorgánicas en el parénquima pulmonar son conocidas<sup>5-8</sup>. Actualmente se considera que la ausencia de partículas inorgánicas al examen con microscopía óptica en el contexto de una fibrosis pulmonar no descarta la neumoconiosis, aunque la hace improbable<sup>9</sup>. El reconocimiento de partículas inorgánicas en el parénquima pulmonar, cuando la desestructuración tisular por fibrosis es importante, puede no ser fácil y un número no determinado de partículas en esta circunstancia escapa al examen anatomopatológico convencional. Así, pueden diagnosticarse de fibrosis pulmonar idiopática, pacientes que estén realmente afectados de neumoconiosis<sup>10,11</sup>.

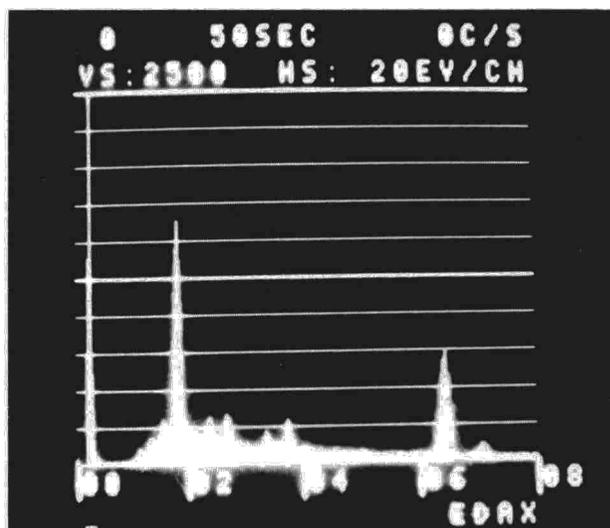


Fig. 1. Análisis dispersivo de energía de una fibra de asbesto.



Fig. 2. Fibras de asbesto en una trabajadora de la industria del algodón con fibrosis pulmonar (x1250).

Para superar estas limitaciones es aconsejable la aplicación de técnicas mineralógicas sobre el tejido pulmonar, con una sensibilidad y especificidad superior al microscopio óptico y de luz polarizada en la detección de partículas inorgánicas. El MES con ADE reúne estas características, ya que es una técnica de elevada fiabilidad, fácilmente reproducible y que no requiere destrucción tisular.

TABLA I  
Hallazgos mineralógicos

Caso	Partículas halladas
1	incontables fibras de asbesto incontables partículas de un silicato de Al y Mg
2	incontables fibras de asbesto incontables partículas de un silicato no identificado
3	incontables fibras de asbesto
4	incontables fibras de asbesto
5	incontables fibras de asbesto una partícula de Fe

Casos 1, 2 y 3 con diagnóstico anatomopatológico de asbestosis, previo al análisis mineralógico. Casos 4 y 5 con diagnóstico previo de fibrosis pulmonar idiopática.



El examen con MES y ADE de tres muestras de tejido pulmonar con diagnóstico previo de asbestosis no ha implicado modificaciones sustanciales en el diagnóstico, pero sí ha evidenciado un diagnóstico incompleto en dos casos, realmente afectados de silicoasbestosis. Es conocido que la presencia de sílice y silicatos en la naturaleza es generalizada y que frecuentemente estos minerales actúan como contaminantes de otros materiales. De hecho, son frecuentes las exposiciones a varios compuestos de sílice, en muchos casos no conocidas o conocidas incompletamente por el personal expuesto a su inhalación<sup>12-14</sup>. Aunque en ocasiones las neumoconiosis por polvos mixtos, como la silicoasbestosis, presentan características radiológicas que pueden hacer sospechar el diagnóstico, en muchas ocasiones esto no ocurre<sup>5</sup>, por lo que pueden producirse con facilidad diagnósticos erróneos. Los resultados obtenidos subrayan la importancia que puede tener la inhalación de polvos mixtos de sílice en la génesis de las neumoconiosis, inhalación mixta que puede permanecer desconocida con el examen anatomopatológico convencional.

El diagnóstico de asbestosis se puede establecer ante una fibrosis pulmonar en la que se visualizan dos o más cuerpos de asbesto<sup>15</sup>. El microscopio óptico permite identificar con facilidad los cuerpos de asbesto, fibras de asbesto recubiertas de proteínas y ferritina-hemosiderina. Sin embargo, la mayoría de fibras de asbesto no recubiertas no son visualizadas con el microscopio óptico y escapan a su límite de resolución (0,2  $\mu$ )<sup>16</sup>. Es sabido que la cantidad intrapulmonar de fibras de asbesto es muy superior a la cantidad de cuerpos de asbesto<sup>17,18</sup>; y hay una relación entre el número de fibras de asbesto recubiertas (cuerpos de asbesto) y no recubiertas<sup>19,20</sup>. No obstante, esta relación es extremadamente variable<sup>17</sup>. Así, es posible, aunque probablemente infrecuente, que ante un tejido pulmonar sin evidencia de cuerpos de asbesto al examen patológico convencional el contenido en fibras de asbesto sea lo suficientemente grande como para causar una fibrosis pulmonar. El paciente comentado con diagnóstico previo de fibrosis pulmonar idiopática y antecedente de inhalación de asbesto es una muestra de las limitaciones del examen anatomopatológico convencional en el diagnóstico de asbestosis. En este caso únicamente la utilización del MES con ADE ha permitido establecer un diagnóstico correcto.

Es de remarcar la eficacia del MES con ADE para precisar la composición atómica de partículas y fibras no identificadas con microscopía óptica y de luz polarizada. En el segundo caso con diagnóstico previo de fibrosis pulmonar idiopática el análisis mineralógico ha permitido reconocer las fibras visualizadas previamente en el examen anatomopatológico convencional como asbesto, y así precisar un diagnóstico no sospechado inicialmente.

El MES con ADE, por ser una técnica mineralógica no destructiva y fácilmente reproducible, tiene gran utilidad en el diagnóstico de las asbestosis y de las neumoconiosis en general. Resulta especialmente importante el realizar un análisis mineralógico en los pacientes con antecedentes ocupacionales significativos e histología de fibrosis pulmonar sin cuerpos de asbesto, ya que en estos casos el examen anatomopatológico convencional puede llevar a un diagnóstico erróneo. Asimismo, con el MES y el ADE se pueden identificar partículas y fibras visualizadas con el microscopio óptico pero no reconocidas. El examen mineralógico con MES y ADE puede diagnosticar también neumoconiosis por polvos mixtos, con las implicaciones etiopatogénicas que esto supone.

## Agradecimiento

Este trabajo forma parte del programa de investigación «Estudio físico de cálculos antropogénicos», de la Secció de Ciències de l'Institut d'Estudis Catalans.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abraham JL. Recent advances in pneumoconiosis. The pathologist's role in etiologic diagnosis. En: The lung. Thurbeck WT, Abell M Eds. Baltimore Williams and Wilkins Co. 1978; 96-137.
2. Abraham JL. Diagnostic applications of scanning electron microscopy and microanalysis in pathology. Israel J Med Sci 1979; 15:716-723.
3. Morgenroth K, Blaschke R, Schlake W. Energy dispersive X ray analysis of semi-thin section in the scanning transmission. Beiträge zur Pathologie 1973; 150:406-411.
4. Monsó E. Aplicació de la microscopia electrònica de superfície i de l'anàlisi dispersiva d'energia al estudi de la histopatologia pulmonar. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona 1987.
5. Parkes WR. Occupational lung disorders. 2.ª ed. Butterworths. Londres 1982.
6. DeNee PB. Identification and analysis of particles in biological tissue using SEM and related techniques. SEM/1976/III. SEM Inc. AMF O'Hare. Johari O, Becker RP Eds. IIT Research Institute. IL60666. Chicago; 461-468.
7. Vallyathan NV, Green FHY, Craighead JE. Recent advances in the study of mineral pneumoconiosis. Pathol Ann 1988; 15:77-104.
8. Miller A, Teirstein AS, Bade ME et al. Talc pneumoconiosis: significance of sublight microscopic mineral particles. Am J Med 1971; 50:395-402.
9. Case Records of the Massachusetts General Hospital. N Engl J Med 1986; 315: 437-449.
10. Berry JP, Henoc P, Galle P, Pariente R. Pulmonary mineral dust. A study of ninety patients by electron microdiffraction. Am J Path 1976; 83:427-438.
11. Rüttner JR, Spycher MA, Sticher H. The detection of etiologic agents in interstitial pulmonary fibrosis. Hum Pathol 1973; 4:497-512.
12. Hammer DH, Rolle FR, Schelz JP. Characterization of talc and associated minerals. Am Ind Hyg Assoc J 1976; 37:296-304.
13. Rohl AN, Langer AM, Selikoff IJ. Consumer talcums and powders: mineral and chemical characterization. J Toxicol Environ Health 1976; 2:255-284.
14. Abraham JL, Burnett B, Rodríguez-Roisin R. Correlated environmental, radiologic, physiologic, pathologic and mineralogic analysis in asbestos workers. Am Rev Respir Dis 1982; 125:154.
15. Craighead J, Abraham J, Churg A et al. Pathology standarts for the diagnosis of asbestos related diseases. Arch Pathol Lab Med 1982; 106:543-597.
16. Churg A. Non asbestos pulmonary mineral fibers in the general population. Environ Res 1983; 31:189-200.
17. Morgan A, Holmes A. Concentrations and dimensions of coated and uncoated asbestos fibres in the human lung. Br J Ind Med 1980; 37:25-32.
18. Suzuki Y, Churg J. Formation of the asbestos body: a comparative study with three types of asbestos. Environ Res 1970; 3:107-118.
19. Whitwell F, Scott J, Grimshaw M. Relationship between occupations and asbestos fibre content of the lungs in patients with pleural mesotelioma, lung cancer and other diseases. Thorax 1977; 32:377-386.
20. Ashcroft T, Heppleston AG. The optical and electron microscopic determination of pulmonary asbestos fibre concentration, and its relation to the human pathological reaction. J Clin Pathol 1973; 26:224-234.