# La Microscopia electrónica en el diagnóstico de las glomerulopatías.

Autores:

L. González[1*], L. López[2], S. Rodriguez[3], D Maza[4], A.P. Día4[5], M. Matos[6], Y. Chávez[7], M. Benchimol[8], F. Reynol[9]

1 Profesor Titular, Investigador Titular, Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch López", La Habana, Cuba.
2 Profesor Auxiliar, Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch López", La Habana, Cuba.
3 Investigador Auxiliar, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.
4 Profesor Asistente, Facultad de Ciencias Médicas ¨Finlay-Albarrán¨, La Habana, Cuba.
5 Profesor Auxiliar, Escuela Latinoamericana de Medicina, La Habana, Cuba.
6 Técnico Medio, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.
7 Licenciada, Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch López", La Habana, Cuba.
8 Investigadora Titular, Universidad de Santa Ursula, Rio de Janeiro, Brasil.
9 Técnico Medio, Universidad de Santa Ursula, Rio de Janeiro, Brasil.

Correo electrónico del primer autor: lucia.glez@infomed.sld.cu

**RESUMEN**

La microscopía electrónica ha contribuido de manera fundamental al diagnóstico y clasificación de las glomerulopatías. La más importante aportación es la localización de inmunocomplejos que con frecuencia no se observan por microscopía óptica y en las alteraciones de la membrana basal glomerular. Se exponen algunas experiencias del trabajo realizado en el diagnóstico de glomerulopatías en el Instituto de Nefrología "Dr. Abelardo Buch". Las biopsias se fijaron en formol neutro tamponado y se incluyeron en parafina, a cortes de 2µm de grosor se realizaron las coloraciones de hematoxilina y eosina, plata metenamina, ácido periódico de Schiff, tricrómica de Masson y rojo congo, para observarse por microscopía óptica. Para microscopia electrónica se fijaron con glutaraldehido y tetraóxido de osmio e incluyeron en resina sintética. Se realizaron cortes de 50-60 nm de grosor y se montaron en rejillas de 200 mesh; se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión. Se observó fusión de los pies de los podocitos, depósitos electróndensos en mesangio y membrana basal glomerular en la glomerulosclerosis segmentaria y focal y en las enfermedades glomerulares mediadas por complejos inmunes. En el mesangio se observaron depósitos de sustancias fibrilares como el amiloide. En la membrana basal glomerular se observó adelgazamiento, engrosamiento e irregularidades con laminación en pacientes portadores de Síndrome de Alport. Se concluye que la

evaluación de las características ultraestructurales en correspondencia con la imagen histopatológica al microscopio óptico y el cuadro clínico permite un diagnóstico de certeza.

*PALABRAS CLAVE*: glomerulopatías, microscopía electrónica, diagnóstico en patología renal.

**INTRODUCCIÓN**

La patología renal fue una de las aplicaciones iniciales de la microscopía electrónica (ME) en medicina, lo cual contribuyó de manera fundamental en el diagnóstico y clasificación de las diferentes enfermedades glomerulares. Aunque el desarrollo de las técnicas inmunohistoquímicas provocó un notable descenso en la aplicación de la microscopía electrónica, ésta sigue teniendo gran importancia en el estudio de la patología renal que junto a los métodos inmunopatológicos, constituye el complemento fundamental para el diagnóstico de toda biopsia renal (1). La exploración de la muestra debe ser sistemática e incluir todos los compartimentos: glomérulos, túbulos intersticio y vasos sanguíneos, siendo el glomérulo la parte más importante en la mayoría de los casos. Una de las más significativas aportaciones de la ME es la localización de depósitos en la enfermedad glomerular mediada por inmunocomplejos, que permite localizar con exactitud los depósitos vistos por inmunofluorescencia, los depósitos fucsinófilos que se observan por microscopía óptica convencional (MO) con la coloración de tricrómica de Masson y los depósitos que no se observan por MO por su escasa cuantía (2,3), convirtiendo a la ME en instrumento fundamental para el diagnóstico. Otros ejemplos son los procesos que cursan con alteraciones de la membrana basal glomerular (MBG) como adelgazamiento (4), con o sin ruptura de la misma, laminación difusa y rarefacción, alteraciones debidas a anomalías genéticas como el síndrome de Alport y hematuria recidivante familiar, entre otras patologías (5). Otras aportaciones de la ME son: las alteraciones de la porción subendotelial de la membrana basal glomerular, como en los procesos microangiopáticos y en la glomerulopatía crónica post-trasplante (6); las alteraciones en las células epiteliales viscerales (podocitos), con fusión de los pedicelos, alteraciones nucleares y citoplasmáticas y formaciones vellositarias en el espacio urinario (7); los cambios en el mesangio, con la presencia de depósitos organizados y no organizados (8,9) y la visualización de partículas virales (10).

En este trabajo se exponen algunos casos diagnosticados en el Instituto de Nefrología Dr. Abelardo Buch, donde se muestra el aporte de la ME sin seguir una

clasificación específica etiopatogénica o clínico-patológica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La toma de las muestras se realizó con Trócar de Menghini, con ayuda de un equipo de ultrasonido. Para el estudio con MO se fijaron en formol tamponado durante 1 hora. Se realizó el procesamiento de tejidos en un equipo automático Sakura. Se procedió a la inclusión en parafina y al corte de 2µm de grosor en un micrótomo vertical marca Leitz 1512. Se realizaron las tinciones con hematoxilina y eosina (HE) y además se hicieron tinciones especiales de ácido peryódico de Schiff (PAS), tricrómica de Masson (TM), plata metenamina (PM) y rojo congo. Los cortes se observaron en microscopios Olympus y Nikon 50i. Las imágenes se obtuvieron mediante una cámara digital de alta resolución DS-5M-U1 acoplada al microscopio.

Para el estudio por ME, la fijación se realizó con glutaraldehído 3,2 % y tetróxido de osmio 2 %, en disolución estabilizadora de fosfato de sodio 0,1 mol/L, pH 7,2-7,4; la deshidratación se realizó con acetona a concentraciones crecientes desde 10 % hasta 100 %. Los fragmentos de tejido se incluyeron en resina Spurr (11) De los bloques obtenidos se realizaron cortes semifinos de 1 µm, mediante un ultramicrótomo LKB Ultrotome III, que se tiñeron con azul de Stevenel (12) para la localización de los glomérulos. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos de 50-60 nm de grosor y se montaron en rejillas de 200 mesh sin membrana de soporte y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron en microscopios JEOL JEM 100S y JEM 1200 EX.

## RESULTADOS

## PRESENTACIÓN DE CASOS

Es importante tener presente que los hallazgos morfológicos no son específicos de cada patología, ya que una misma alteración puede ser debida a diferentes causas, salvo raras excepciones, por lo que deben ser evaluados en el contexto clínico.

La Enfermedad por Daño Mínimo o cambios mínimos es la causa más importante del síndrome nefrótico en la infancia sensible al tratamiento con esteroides (13). Se presenta la biopsia de un paciente que en el MO los hallazgos fueron irrelevantes (Fig. 1a), pero a nivel de ME las alteraciones se localizaron en los podocitos se observó desaparición de la hendidura entre los pedicelos con fusión de los mismos

y aposición directa del citoplasma sobre la MBG, con disminución del compartimento entre el podocito y la lámina rara externa. En el espacio urinario se pudo ver transformación vellositaria de la membrana plasmática del podocito (Fig. 1b). En el resto del citoplasma se observaron vacuolas o inclusiones proteicas. La MBG presentó grosor normal y sin alteraciones significativas a nivel de sus componentes. Se observó separación de la membrana plasmática del pedicelo de la MBG en forma de semiluna, delimitando una zona electrón lúcida con gran cantidad de microfilamentos en el citoplasma podocitario (Fig. 1c). Se ha reportado que es un hallazgo ultrastructural temprano de una glomerulosclerosis segmentaria y focal sobreañadida, particularmente si el paciente es resistente a la terapia esteroidea (14).

La Glomerulosclerosis segmentaria y focal (GESF) es una designación que caracteriza a una lesión de distribución irregular en los glomérulos y se caracteriza por esclerosis en algunos de ellos (lesión focal) y de una parte del ovillo (lesión segmentaria). Se consideran dos formas de presentación: como lesión primaria o idiopática (15) y como secundaria o asociada a múltiples enfermedades.

Se presenta el caso de un paciente portador de GESF idiopática que se caracterizó en el MO por presentar lesiones segmentarias y focales (Fig. 2a). En ME por depósitos electróndensos de localización subendotelial y subepitelial (Fig. 2b), también se pudieron observar las lesiones de tipo de cambios mínimos como fusión de los pies de los podocitos y transformación vellositaria de los mismos, en las zonas correspondientes a esclerosis se pudo observar aumento de la matriz mesangial y material membranoide (Fig. 2c) y algunas células espumosas que contienen en su citoplasma vacuolas lipídicas (fig 2d).

La Nefropatía de Alport o Síndrome de Alport es una nefropatía de carácter hereditario que se caracteriza por una anomalía del colágeno tipo IV de la membrana basal. En la forma clásica es una nefropatía evolutiva con insuficiencia renal progresiva que termina en fracaso renal, asociada a sordera neurosensorial y alteraciones oculares, fundamentalmente del cristalino. En la mayoría de los casos se debe a una mutación del gen para la cadena α5 del colágeno IV: COL4A5, que se encuentra en el cromosoma X, síndrome de Alport ligado al sexo (16) aunque existen otras formas menos frecuentes: el síndrome de Alport recesivo y el autosómico dominante. Se presenta la biopsia de un paciente que en el examen por ME se pudo observar en la lámina densa de la MBG aspecto laminado reticular que encierra áreas electrón lúcidas (Fig. 3a), variación del espesor de la MBG con zonas

de adelgazamiento y expansión lúcida de la lámina rara interna (Fig. 3b). Estas alteraciones también pueden verse en las membranas basales de la cápsula de Bowman y membrana basal tubular (Fig. 3c). En niños con hematuria con o sin sordera neurógena se debe investigar en la familia la existencia de miembros con insuficiencia renal, hematuria o sordera y el síndrome de Alport debe estar incluido en el diagnóstico diferencial. Ante la sospecha clínica de nefropatía de Alport se debe realizar estudio ultrastructural que permita descartar otros procesos que pueden cursar con hematuria, principalmente con la nefropatía IgA.

Actualmente se conoce que existen un amplio número de enfermedades glomerulares que se caracterizan en el estudio ultrastructural por presentar depósitos de microfibrillas o microtúbulos, la demostración ultrastructural de estos depósitos no es patognomónica de ninguna entidad clínica, Kolbert y col (17) han propuesto un esquema de clasificación basados en la presencia o ausencia de parámetros clínicos y serológicos además de estudios de histoquímica (rojo congo) e inmunohistoquímica (inmunoglobulinas), en la biopsia renal.

En la clasificación de las glomerulopatías con depósitos fibrilares, el primer paso es descartar la amiloidosis con la tinción de rojo congo. Si los depósitos no son congófilos se evalúa mediante inmunofluorescencia para determinar si los depósitos son derivados o no de inmunoglobulinas, si no lo son pueden estar relacionados con la diabetes mellitus, colágeno III o fibronectina. Si son derivados de inmunoglobulinas se puede estar en presencia de alguna enfermedad sistémica como crioglobulinemia, disproteinemias o lupus eritematoso sistémico entre otras.

La Amiloidosis es el prototipo de estas glomerulopatías. Se presenta el caso de un paciente que mostró en el estudio histopatológico una esclerosis glomerular avanzada con gruesos haces de colágeno no pudiéndose definir con precisión su etiología por lo que se realizó estudio ultrastructural. Se encontró infiltración de depósitos de filamentos no ramificados de 8-10 nm de diámetro, dispuestos irregularmente constituyendo haces compactos gruesos que a veces se disponían

perpendicularmente a la MBG a modo de espinas, como las observadas en los casos de glomerulopatía membranosa (Fig. 4a y 4b).

**CONCLUSIONES**

Se concluye que la evaluación de las características ultrastructurales de la biopsia renal en correspondencia con la imagen histopatológica al microscopio óptico,

apoyados en el cuadro clínico permite un diagnóstico de certeza en el diagnóstico de las glomerulopatías.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Barat A., del Barrio M., Manzarbeitia F. (2002) *Rev Esp Patol* 35:2:151-166

2. Castro H., Valenzuela R., Ruiz P., Lenz O., Monrroy M. (2008) *Cases J* 1: 333-339

3. Scholtze D., Varga Z., Imhof A. (2011) *J Med Case Rep* 9:5:299-306

4. Liapis H., Neriman G., Hmiel P.Miner J.H. (2002) *Human Pathol* 33:8:836-845

5. Haas M. (2009) *Arch Pathol Lab Med* 133:224-232

6. Roufosse C.A., Shore I., Moss J., Moran L.B., Willicombe M., Galliford J., Chan K.K., Brookes P.A., de Kort H., McLean A.G., Taube D., Terence Cook H. (2012) *Transplantation* 15:94:3:269-274

7. Barisoni L., Schnaper H. W., Kopp J. B. (2007) *Clin J Am Soc Nephrol* 2: 529-542

8. Spasovski G., Ivanovski N., Masin-Spasovska J., Dzikova S., Grcevska L., Petrusevska G., J., Popov Z, Polenaković M. (2005) *Prilozi* 26:2:79-90

9. Cuchard P., Cuchard R., Rotman S., Burnier M., Gauthier T. (2012) *Rev Med Suisse* 29:8:330:446-51

10. Gutiérrez E., Morales E., Gutiérrez Martínez E., Manzanares M.J., Rosello G., Mérida E., Praga M. (2007) *Nefrología* 27:4:439-447

11. Spurr A.R. (1969) *J. Ultrastruct Res* 26:31-36

12. Del Cerro M., Cogen J., Del Cerro C. (1980) *Microsc Acta* 83:117-121

13. Vogel A., Azócar M., Nazal V., Salas P. (2006) *Rev Chil Pediatr* 77:3:295-303

14. Nochman P.H., Jennette J.Ch., Falk R.J. (2007) Primary glomerular disease. In: Brenner BM, ed. *Brenner and Rector's the Kidney*. 8th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; chap 30.

15. Maric C., Sandberg K., Hinojosa-Laborde C. (2004) *J Am Soc Nephrol* 15:6:1546-56.

16. Medeiros-Domingo M., Fuentes Y., García-Roca P., Hernández A.M., Morán-Barroso V.F., Velásquez-Jones L. (2008) 65:5:331-340

17. Kolbert S. M., Schwartz M. M., Lewis E. J. (1994) *Am J Kidney* 23:751-765

ANEXOS

Pies de grabado.

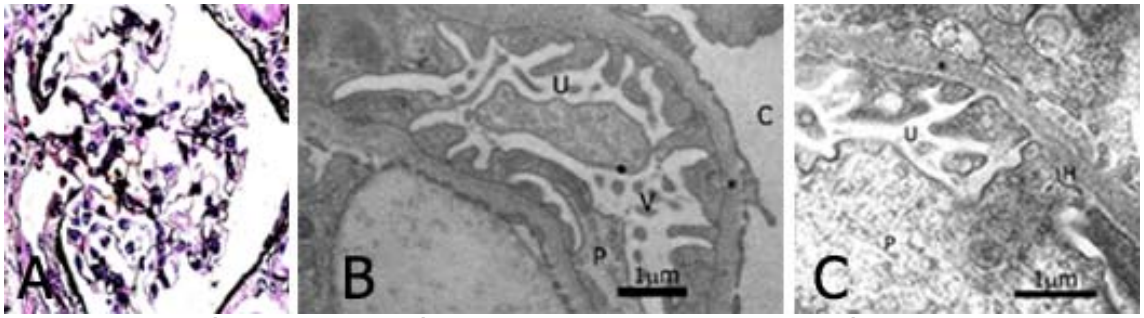


Fig 1. Daño Mínimo. A Glomérulo de aspecto normal. Tinción PM 600X. B MET. Ensanchamiento y fusión de los procesos de los pies de los podocitos (P), membrana basal glomerular (*) de aspecto y grosor normal, no se observan depósitos, en el espacio urinario proyecciones en forma de vellosidades (V) de los podocitos. C MET. Separación de la membrana plasmática del podocito de la membrana basal glomerular en forma de semiluna (H). U espacio urinario, C luz capilar.

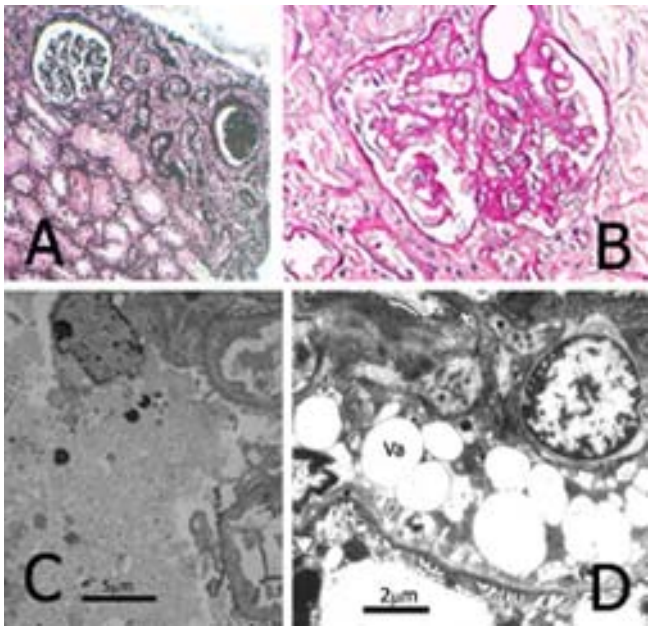


Fig. 2. Glomerulosclerosis segmentaria y focal. A Se observa una lesión focal en la parte superior de la lámina con la esclerosis total de un glomérulo y otro glomérulo

con estructura conservada y marcada afectación de los túbulos. Tinción PM. B Glomérulo con luces capilares de la zona afectada obliteradas por material amorfo con zonas de hialinosis. Tinción PAS. C Aspecto del mesangio ensanchado con matriz finamente granular y estructuras electrón densas redondeadas dispersas redondeadas. D Marcada vacuolización citoplasmática (Va) en células epiteliales viscerales y endoteliales, la membrana basal glomerular (*) se observa adelgazada.

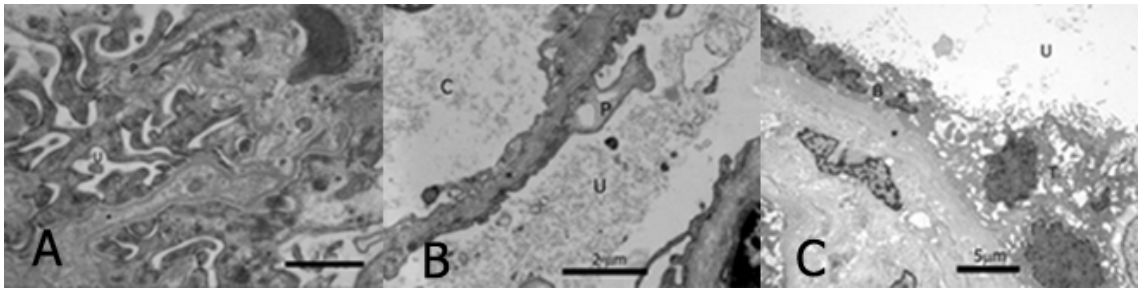


Fig. 3. Síndrome de Alport A engrosamiento y laminación de la membrana basal glomerular con microesférulas de diámetro diverso y aspecto electróndenso, pies de podocitos fusionados en áreas. Barra=1µm. B Marcada fusión de los pies de los podocitos y membrana basal glomerular de grosor normal. C Aspecto laminado de la membrana basal de la cápsula de Bowman y de inicio del túbulo proximal, el citoplasma de las células epiteliales tubulares presentan marcada vacuolización. (P) pocito, (C) luz capilar, (U) espacio urinario

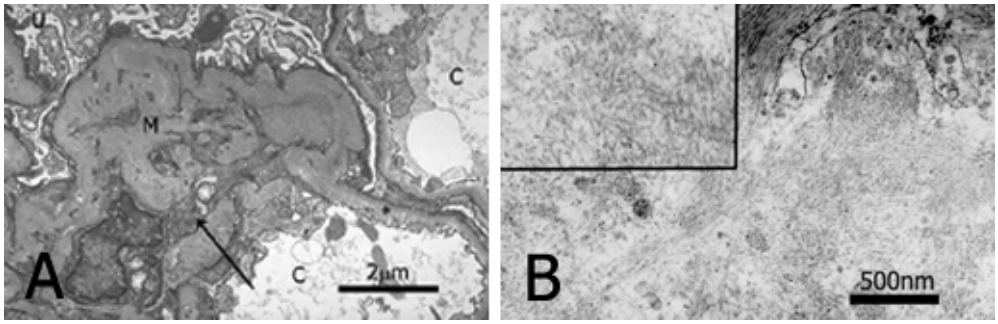


Fig. 4. Amiloidosis A Se observa mesangio (M) ensanchado (flecha) introduciéndose en membrana basal glomerular (*) con depósitos de aspecto hialino difuso, hay fusión de los pies de los podocitos. B Membrana basal glomerular infiltrada de

sustancia filamentosa. Insertado Mayor aumento de la lesión anterior donde se observan finas fibrillas dispuestas al azar.