

Principales parámetros histológico-estructurales de la necrosis tubular aguda. Modelo experimental de tipo isquémico

E. Vázquez Martul, A. Álvarez García, J. Forteza*, M. López** y M. A. Rodríguez Cobos***

Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Juan Canalejo. La Coruña. * Servicio de Anatomía Patológica. Hospital General de Galicia. Santiago. ** ATS Servicio de Anatomía Patológica. H. Juan Canalejo. La Coruña. *** Departamento de Morfología. Facultad de Medicina. Santiago.

RESUMEN

Con el objeto de estudiar el sustrato histológico y ultraestructural de la necrosis tubular aguda (NTA) de tipo isquémico, se desarrolla un modelo experimental en conejos, previamente uninefrectomizados, tras clampaje del pedículo renal durante sesenta minutos. Seis conejos se utilizaron como control de técnicas de perfusión fijación in vivo y los 12 restantes fueron sacrificados a las dos y veinticuatro horas, dos días, cuatro, ocho y quince días posreflujo sanguíneo. Con técnicas de perfusión-fijación in vivo para inhibir fenómenos de autólisis, se examinaron múltiples secciones utilizando microscopio óptico (MO), microscopio electrónico de transmisión (MET) y de rastreo (MER). Secciones en congelación se tiñeron con DPNH. Las principales alteraciones de las células de túbulo proximal (TP) consistían en pérdida de las microvellosidades del borde apical (BA), lesiones mitocondriales y aplanamiento del laberinto basal lateral (LBL). Todas estas lesiones junto con una importante negativización de la DPNH, fueron más acusadas entre dos-cuatro días posreflujo. Se discuten las principales alteraciones histológicas y ultraestructurales como base morfológica explicativa del fallo funcional de la célula del TP.

Palabras clave: **Necrosis tubular aguda (NTA). Microscopia óptica (MO). Microscopia electrónica de transmisión (MET). Microscopio electrónico de rastreo (MER). Túbulo proximal (TP). Borde apical (BA). Laberinto basal lateral (LBL).**

MAIN STRUCTURAL PARAMETERS OF ACUTE TUBULAR NECROSIS IN AN EXPERIMENTAL ISCHEMIC MODEL

SUMMARY

An experimental model has been designed to study the histological and ultrastructural change in ischemic Acute Tubular Necrosis in previously uninephrectomized rabbits that had the renal pedicle clamped for 60 min. The rabbits were sacrificed at two and 24 hours, 2, 4, 8 and 15 days post restoration of the renal blood flow.

Correspondencia: Dr. Eduardo Vázquez Martul.
Servicio de Anatomía Patológica.
Hospital Juan Canalejo.
Xubias de Arriba, 84.
15006 La Coruña.

(Trabajo realizado con ayuda económica del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, exp. 84/1216.)

After an in vivo perfusion-fixation technique multiple sections were studied with the light microscope, as well as with the transmission and scanning electron microscope. Histochemical studies with DANH to study possible enzymatic-oxidative changes in the cells of the proximal tubules were done simultaneously. Ultrastructurally the main abnormalities in the proximal tubules were the loss of the apical border, mitochondrial changes with loss of cristae and flattening of the lateral-basal labyrinth, together with the appearance of dense plaques of myofilaments. These changes were more florid between 48 h. and 4 days while a progressive normal appearance was seen after 8 days. The relationship between the ultrastructural lesion and the physiopathologic mechanisms of the acute renal insufficiency are discussed.

Key words: Acute tubular necrosis. Optic microscopy. Transmission electronic microscopy. Electronic scanning microscope. Proximal tubule. Apical border lateral basal labyrinthus.

Introducción

El estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la insuficiencia renal aguda (IRA), así como la búsqueda de un sustrato histopatológico que explique el grado de disfunción renal, continúa siendo objeto de investigación, desde las primeras descripciones del síndrome de aplastamiento por Dunn y cols.¹ y Bywaters y Beall².

Las primeras descripciones histológicas de la lesión tubular, basadas en estudios semicuantimétricos con microscopía óptica³⁻⁶, han permitido correlacionar parámetros lesionales histológicos y parámetros clínicos⁶⁻⁸. Posteriormente, la aplicación del microscopio electrónico (ME)^{9,10} ha demostrado importantes alteraciones celulares de los túbulos tanto a nivel del reborde apical^{11,12}, mitocondrial¹³⁻¹⁶ y más recientemente la repercusión sobre el laberinto basal lateral (LBL), tanto del túbulo proximal (TP)¹⁷⁻¹⁹ como del túbulo distal¹².

Confirmar las principales características ópticas-ultraestructurales de la lesión del túbulo proximal ha sido el objeto fundamental de este trabajo utilizando un modelo experimental de tipo isquémico en conejos.

Material y métodos

Se han utilizado un total de 18 conejos entre 1,5-2 kg: seis han servido como controles para conseguir niveles de perfusión-fijación *in vivo* óptimos, y en los 12 restantes, previa uninefrectomía, se ha producido una isquemia renal consistente en el clampaje del pedículo renal durante sesenta minutos, según método de Badenoch²⁰ y de Solez²¹. Los conejos se anestesiaron por vía endovenosa con tiopental sódico diluido al 2,5 %. Una vez abordada la celda renal por vía lumbar, tras incisión paravertebral, se ligó el pedículo vascular renal durante sesenta minutos. Reintroducido el riñón en situación anatómica, los animales fueron sacrificados a las dos horas (casos 1 y 2), veinticuatro horas (casos 3 y 4), cuarenta y ocho horas (casos 5 y 6), cuatro días (casos 7 y 8), ocho

días (casos 9 y 10) y quince días (casos 11 y 12). En todos ellos se realizó perfusión-fijación *in vivo*, previa a su sacrificio, tras cateterización vía aorta de arteria renal, con suero fisiológico a temperatura ambiente, e inmediatamente al cambio de coloración renal, con glutaraldehído al 2 % en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,3, durante diez minutos. Extraído el riñón, se realizaron secciones transversales muy finas de 1 mm de espesor, incluyendo corteza, médula y papila renal. Posteriormente se posfijaron durante doce horas en formol tamponado al 10 %. Se han examinado un total de cinco secciones de cada riñón utilizando tinciones de hematoxilina-eosina, PAS y azul alcian-PAS. Los principales parámetros con MO quedan reflejados en la tabla I y consistían en: presencia de cilindros, grado de descamación celular tubular, grado de dilatación tubular-aplanamiento celular, vacuolización, necrosis celular y calcificaciones.

Para el estudio con MET, pequeños segmentos se posfijaron en glutaraldehído al 2 %, 0,1 M en tampón fosfato, pH 7,4 durante dos horas. De cada riñón se realizaron cinco o siete secciones de una micra para cortes control, utilizando ultramicrotomo Pyramitome (LKB 11.800). Seleccionadas las áreas, se examinaron con ME Phillips modelo 301. Los parámetros ultraestructurales quedan reflejados en la tabla II, que consistían en la valoración de: BA, mitocondrias, LBL y presencia de placas densas basales.

Para el estudio con MER se realizaron secciones de 1 mm de espesor. Se posfijaron en glutaraldehído al 6 % durante una semana para su endurecimiento. Posteriormente se posfijaron en osmio al 1 % durante una hora. Una vez deshidratadas se realizó el punto crítico de secado utilizando Critical Point Drier SPC-900 Bomar a una presión de 1.300 milTorr a temperatura de 45° C^{22,23}. Las secciones fueron metalizadas durante tres minutos en Vacuum Hummer 5 (Technics).

En todos los casos se tomaron muestras de ambos riñones, que se congelaron en nitrógeno líquido. Se realizaron secciones en congelación y se tiñeron con DPNH²⁴. Como corte control se utilizó el riñón previamente nefrectomizado en cada caso.

Tabla I. Principales parámetros con microscopía óptica

N.º caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cilindros	+ +M	- +M	+C +++M	+C +++M	+C +++M	++C +++M	++C +++M	+C +++M	- +M	- -	- -	- -
Descamación	- +M	- +M	- +	- ±	++C +++M	++C +++M	+C +++M	++C +++M	- -	- -	- -	- -
Dilatación/ Aplanamiento	- -	- -	- +M	- -	++C +++M	++C +++M	+C +++M	++C +++M	- -	- -	++ +	+ +
Vacuolización/ Edema celular	- -	+C +M	- +++M	- +M	- +M	- ++M	+C +M	+C +M	++M ++M	++M ++M	++M ++M	+M +M
Necrosis/ Tubulorrexis	+C +M	- +M	- +++M	- +++M	+C +++M	++C +++M	++C +++M	++C +++M	+M +M	+M +M	- -	- -
Calcificaciones	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	+++	+	-
Nucléolos	+	+	+	±	+++	+++	+++	++	+	±	+	-
Mitosis	-	-	-	-	++	+	+++	++	+	++	+	±
Cromatismo	+	+	-	++	+	+	+++	+++	+	+	+	-
Edema interst.	-	-	-	-	+	++	++	-	+	-	++	+
Inflamación	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

C = corteza; M = médula.

Resultados

Conejos control

En los conejos utilizados como control, el grado de apertura tubular es óptimo y tiende a ser homogéneo en grandes áreas renales, lo que fue indicativo de una perfecta fijación *in vivo*. En secciones semifinas y con MER se puede identificar la constancia y regularidad de la altura del reborde en cepillo (figs. 1a y 1b). Una de las características ultraestructurales del TP es la presencia de microvellosidades apicales, la riqueza mitocondrial y numerosas prolongaciones basales y laterales, más finas que en túbulos contorneados distales, que configuran el LBL ce-

lular, fácilmente identificable tanto con el MET como con el MER (fig. 2).

La técnica histoquímica utilizando DPNH tiñe intensamente tanto los túbulos proximales como distales en el área cortical, así como los segmentos rectos (S3) del TP en el área medular, dando lugar a un límite nítido con la zona medular profunda (fig. 3).

Conejos con isquemia

Con MO a las dos horas postreflujo se inicia un cambio histológico con respecto a casos control. Las principales características, que quedan resumidas en la tabla I, consisten en inicio de cilindros, pérdida focal de células

Tabla II. Principales parámetros ultraestructurales

N.º caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Túbulo proximal												
Pérdida B. A.	++	+	+++	+++	+++	+++	++	++	±	-	-	-
Mitocondrias												
Edema	++	++	++	+	+++	+++	+	++	+	+	-	-
Pérdida crestas	+	++	+++	++	+++	+++	+	++	±	-	-	-
Partículas densas			+		+	+++	+	+	-	-	-	-
BBL												
Aplanamiento	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	-
Despegamiento	-	-	++	+	++	+++	-	-	-	-	-	-
Placas densas	-	-	++	++	++	+++	+++	++	+	+	+	+
Glomérulos												
Alt. epitelio	++	+	++	++	+	+	+	±	-	-	-	-
Alt. endotelio	++	-	++	++	-	++	+	-	-	-	-	-
Capilar tubular												
Endotelio	+	+	++	++	+	++	++	+	-	-	-	-

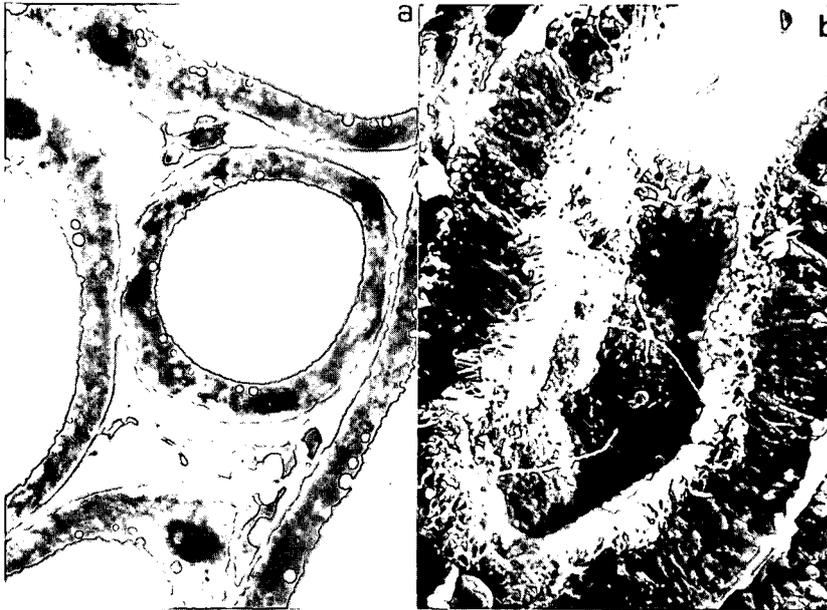


Fig. 1.—a) Sección semifina en la que se observa una apertura constante irregular de la luz del TP, observándose con nitidez el reborde en cepillo apical (azul de metileno $\times 400$).
b) Aspecto de un TP con el MER reconociéndose abundantes mitovellosidades apicales ($\times 800$). TP= túbulo proximal. MER = microscopio electrónico de rastreo.

con descamación, irregularidad en el borde apical-luminal celular y vacuolización celular. Sin embargo, no se observaron fenómenos de necrosis, componente inflamatorio, si bien comienzan a evidenciarse cambios nucleares con hiper cromatismo nuclear y configuración más angulada de núcleos (tabla I).

Con MET existen túbulos, preferentemente en las secciones que incluyen medular y que corresponden a S3, en los que se aprecia pérdida parcial de las microvellosidades apicales, que se acompaña de un aumento de la vesiculación pinocitótica. En relación con el estado mitocondrial se inicia una heterogeneidad lesional muy relacionada con el segmento tubular examinado. Las caracte-

terísticas más evidentes han sido una irregularidad en la disposición y pérdida parcial de crestas, así como un aumento de volumen mitocondrial con morfología más redondeada y aspecto de «hinchamiento» de las mismas (fig. 4). Sólo en ocasionales células se inicia un aplastamiento del LBL, coincidiendo con áreas citoplásmicas electrolúcidas desprovistas de organelas y aspecto de edema intracelular. Los capilares peritubulares no evidencian cambios ultraestructurales significativos. El estudio con MER demuestra, en comparación con los casos control, pérdida parcial del borde apical del BA del TP, presencia de descamación y detritus celulares (fig. 4).

Las tinciones con DPNH no revelan cambios significa-



Fig. 2.—Características ultraestructurales del TP con presencia de microvellosidades apicales, gran riqueza mitocondrial y prolongaciones basales que configuran el LBL (a, $\times 5.400$; b, $\times 650$; c, $\times 11.000$). MBT = membrana basal tubular. LBL = Laberinto basal lateral.

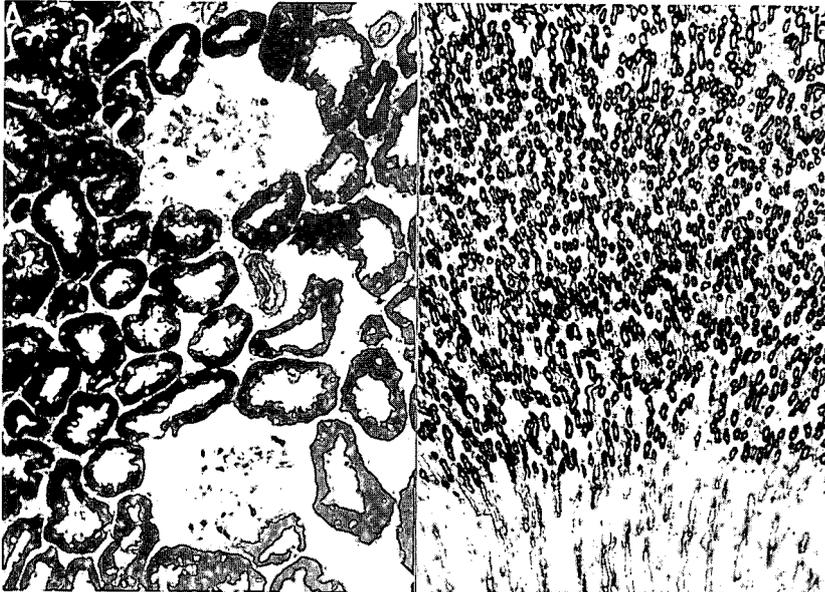
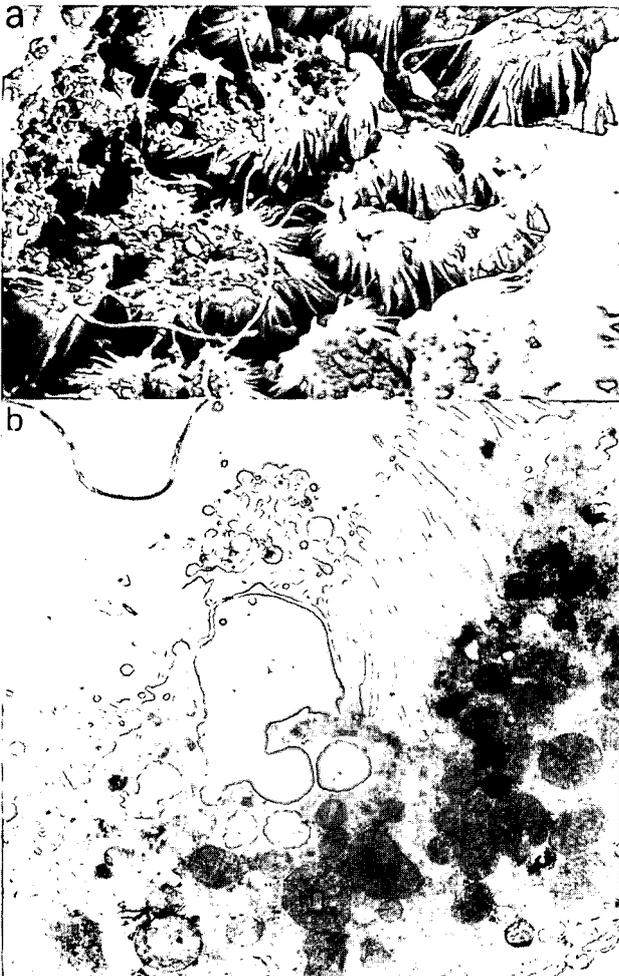


Fig. 3.—a) La tinción con DPNH tiñe intensamente los túbulos proximales y distales. b) En la zona cortical profunda se tiñe positivamente la porción recta del TP, pero son negativos los túbulos colectores (a, x 120; b, x 50).



tivos en cuanto a la intensidad tintorial en comparación con casos control.

Estudio a las veinticuatro horas posreflujo

Con MO se observan áreas de colapso en ambos ejemplos. La presencia de cilindros se hace más evidente sobre todo en la luz de asas de Henle. Conjuntamente se visualizan fenómenos de vacuolización citoplásmica, necrosis celular y dilatación de algunos túbulos con aplanamiento citoplásmico. Los núcleos son hiper Cromáticos, con algunos nucléolos prominentes, sin observarse mitosis (tabla I).

El estudio ultraestructural (tabla II) demuestra una afectación del borde apical celular con pérdida de microvellosidades. A nivel mitocondrial, las lesiones consisten en la pérdida de crestas, fragmentación de la membrana externa y variaciones en la densidad de la matriz mitocondrial (fig. 5). El LBL presenta pequeñas áreas de aplanamiento. A nivel de los capilares peritubulares destaca la presencia de células endoteliales hipertróficas con importante vesiculación pinocitótica del citoplasma y reducción del calibre de la luz capilar (tabla II). Con MER se constata la importante afectación del borde apical celular y descamación (fig. 5).

La aplicación de DPNH demuestra una disminución de intensidad tintorial objetivamente valorable en toda la zona cortical (fig. 5). También se evidencia una disminución de túbulos positivos en zona medular.

Fig. 4.—Pérdida parcial de las microvellosidades apicales, como se demuestra tanto con el MER (a) como con el MET (b) (flecha). Las mitocondrias (M) adquieren una morfología más redondeada (a, x 850; b, x 10.125).

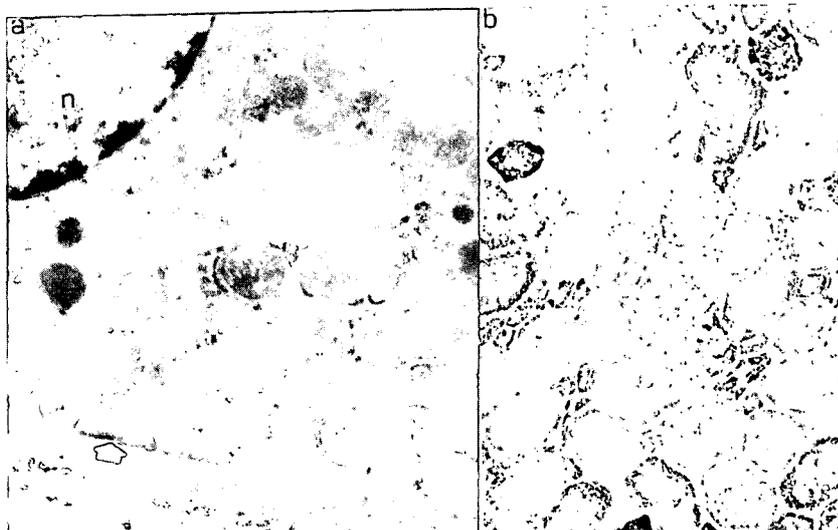


Fig. 5.—a) Pérdida de crestas mitocondriales y aplanamientos del LBL (flecha). b) Negatividad con el DPNH (N= núcleo) (a, $\times 11.000$; b, $\times 160$).

Estudio a las cuarenta y ocho horas posreflujo

Con MO se evidencian globalmente dos rasgos característicos: la presencia de abundantes cilindros hialinos sobre todo en la zona medular y la identificación de túbulos aislados con necrosis (tabla I). También se puede valorar un mayor grado de basofilia citoplásmica en los túbulos situados en la zona medular y cortical profunda. Coincidiendo con estos cambios existe un mayor grado de irregularidad nuclear, nucléolos prominentes, hipercromatismo y aisladas mitosis (fig. 6). A nivel intersticial se aprecia edema, ligera inflamación peritubular y aisladas células nucleadas hematopoyéticas (tabla I).

Con MET puede observarse un espectro lesional que abarca desde las mínimas alteraciones ultraestructurales hasta fenómenos de total desestructuración celular, rotura citoplásmica y descamación (tabla II). La vacuolización mitocondrial y pérdida de crestas es constante. También se inicia la presencia de partículas densas intramitocondriales. En el borde apical es frecuente observar la pérdida de microvellosidades. Conjuntamente también se evidencia un aplanamiento importante del LBL, con despegamiento intercelular y de la membrana basal tubular (figura 6). En relación con este punto se observan condensaciones miofilamentosas del citoesqueleto constituyendo placas densas. Es muy frecuente la reducción de la luz vascular en los capilares peritubulares con aspecto de lesión microangiopática al existir células endoteliales muy prominentes con amplio citoplasma que tiende a ocluir la luz vascular.

El estudio con MER únicamente muestra imágenes de intensa descamación y desestructuración de las superficies tubulares, similar a ejemplos anteriores. La tinción con DPNH demuestra una importante negativización muy comparable a casos precedentes.

Estudio a los cuatro días posreflujo

El análisis con MO demuestra en primer lugar, y como hecho más destacable, la dilatación de la luz tubular, sobre todo en zonas medulares, que se acompaña de un intenso aplanamiento del citoplasma celular (tabla I). Otro

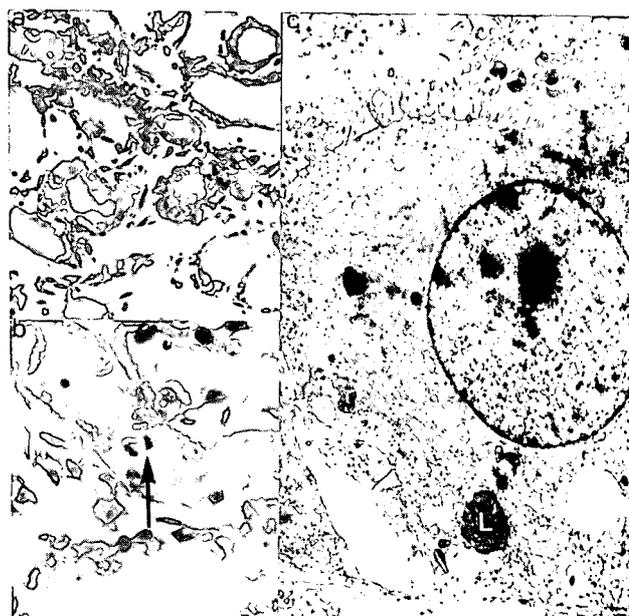


Fig. 6.—a) Cilindros, necrosis celular y presencia de mitosis (flecha). b) Célula del TP con pérdida de microvellosidades apicales y despegamiento intercelular (flecha) (a, $\times 160$; b, $\times 250$; c, $\times 7.650$). L= lisosoma.

hecho fácilmente objetivable consiste en la basofilia celular en túbulos localizados preferentemente en las zonas medulares. Esta basofilia se caracteriza por la presencia de túbulos con células con amplio citoplasma basófilo e irregularidad nuclear, con núcleos de mayor tamaño, prominente nucléolo y frecuentes mitosis (tabla I). También se observan, de forma ocasional túbulos rodeados de componente inflamatorio. A nivel intersticial persiste edema y existencia de células hematopoyéticas nucleadas.

Con MET persiste la pérdida de microvellosidades apicales en el TP, que, al igual que en los ejemplos anteriores, es variable. En relación con el LBL existen extensas zonas de aplanamiento y presencia de placas miofilamentosas (fig. 7). Las mitocondrias muestran pérdida de las crestas y «rarefacción» de su matriz. En los capilares peritubulares se siguen observando células endoteliales prominentes. Con MER se visualizan similares cambios a los casos previamente examinados, evidenciándose descamación y pérdida de microvellosidades. El estudio histológico con DPNH demuestra una notoria pérdida de afinidad tintorial con respecto a conejos control. Es evidente el importante aplanamiento o adelgazamiento citoplásmico.

Estudio a los ocho días posreflujo

Con MO no se observan grandes alteraciones (tabla I). Los fenómenos de descamación, dilatación tubular y presencia de cilindros, características de los casos con reflujo

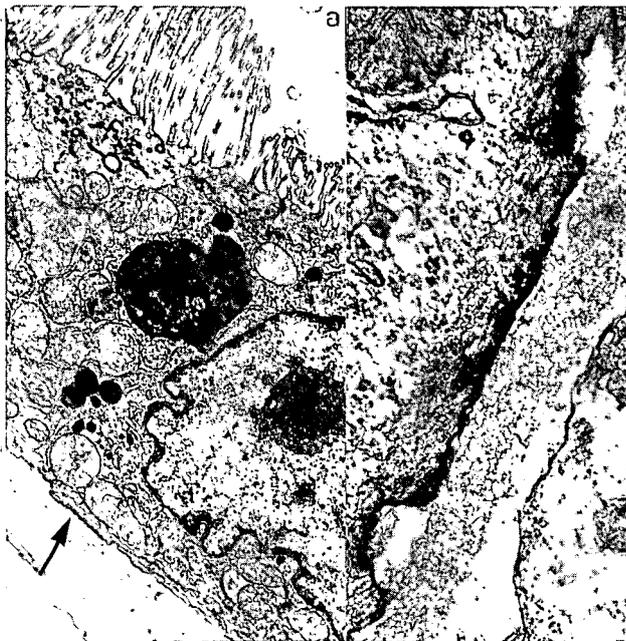


Fig. 7.—a) Células del TP con aplanamiento del LBL (flecha). b) Detalle de la zona basal aplanada y condensación del citoesqueleto configurando la placa densa. (MB = membrana basal) (a, $\times 2.651$; b, $\times 48.200$).

a los cuatro días, prácticamente han desaparecido. No existen claros signos de necrosis celular. Únicamente existe mayor grado de vacuolización-edema celular en las zonas medulares. Lo más destacable es la presencia de microcalcificaciones. A nivel nuclear únicamente son reseñables aisladas mitosis.

El estudio con ME demuestra, en general, una estructura celular conservada. Los túbulos examinados mantienen sus microvellosidades apicales. Las mitocondrias conservan su estructura si bien las crestas mitocondriales no son tan nítidas como en casos control. El LBL está preservado, no evidenciándose placas densas. Asimismo, los capilares peritubulares no demuestran cambios estructurales dignos de mención (tabla II). Esta tendencia a la normalización también es fácilmente demostrable en los estudios con MER así como en las tinciones con DPNH, confirmando una normalización histoquímica.

Estudio a los quince días posreflujo

Con MO, el único hecho destacable es la presencia de aisladas mitosis en células de túbulos y ocasionales microcalcificaciones (tabla I). Esta recuperación morfológica también se demuestra con MET, no evidenciándose datos destacables tanto en relación con el borde apical, estado mitocondrial y LBL. Con DPNH no existen alteraciones respecto a los casos control.

Discusión

Previamente a cualquier discusión que tenga como objetivo definir las características histopatológicas de la necrosis tubular aguda (NTA) en un modelo experimental, debemos recordar que ha sido una constante histórica la búsqueda de un modelo experimental animal adecuado que reproduzca la IRA humana desde el punto de vista histológico y fisiopatológico, existiendo innumerables variantes que dependen clásicamente del método experimental seleccionado. En este contexto hemos reproducido un modelo isquémico, previamente descrito por Badenoch²⁰ y Solez²¹, cuya variante fundamental estriba en el papel «amortiguador» que la uninefrectomía desarrolla sobre el efecto isquémico²⁵.

Nuestros resultados con MO son muy superponibles a los referidos por otros autores^{7,21}, y podríamos resumir en relación al grado de alteración y tiempo de reflujo en cuatro fases: fase inicial, observada a las dos horas; fase de necrosis, que abarcaría entre veinticuatro horas y el cuarto día posreflujo; fase de inicio regenerativo y fase de recuperación, a partir del séptimo-octavo día.

Es la fase de necrosis, y concretamente a las cuarenta y ocho horas posreflujo, en donde observamos un cuadro histológico florido y caracterizado por presencia de cilindros, descamación celular y necrosis de túbulos. Este período también pone de manifiesto una alteración ul-

traestructural constante, aunque no característica, de la isquemia, y que consiste en pérdida de microvellosidades apicales, alteración mitocondrial y aplanamiento del LBL con presencia de placas densas miofilamentosas. La tinción con DPNH se correlaciona con estos hallazgos al demostrar una importante negativización, si bien no distingue niveles de alteración al teñir túbulos proximales y túbulos distales.

Otra característica histológica que confirma la producción de necrosis tubular es la presencia de fenómenos regenerativos epiteliales observada al cuarto día, y que se manifiesta por la basofilia tubular, mitosis e hiperchromatismo nuclear. La dilatación tubular sustituye la presencia de cilindros. Lógicamente, la fase de recuperación consiste en la tendencia a la normalización histológica, a excepción de la existencia de aisladas calcificaciones.

A la hora de realizar una valoración de las características histológicas en cualquier modelo experimental de NTA debemos tener en cuenta la heterogeneidad morfológica de la nefrona, constituida por diversos segmentos^{26,27}, así como las diferentes susceptibilidades ante la isquemia, dependiendo de la zona cortical o medular^{28,29}. La respuesta heterogénea de la nefrona ante un insulto isquémico ya fue descrita por Oliver^{3,30}, demostrando que, junto con nefronas conservadas, existían segmentos tubulares destruidos.

Otro hecho que puede interferir en la valoración histológica y causante de la heterogeneidad lesional es el fenómeno del «no reflujo», descrito como una incompleta restauración del flujo sanguíneo intrarrenal, posiblemente debido a vasospasmos localizados¹⁶ y/o edema de las células endoteliales de los capilares peritubulares³¹, como ha sido constatado en algunos de nuestros casos.

Sin embargo, y a pesar de esta heterogeneidad lesional y de la limitación del estudio histológico con MO, existen datos objetivos que pueden cuantificarse a la hora de entablar una correlación clinicopatológica, y que incluso han servido de base explicativa de diferentes mecanismos fisiopatológicos. La presencia de cilindros ha sido un hallazgo clásico y reiterativo en cualquier tipo de NTA, tanto experimental³² como humana^{7,33}. La relación directa entre cilindros, aumento de la presión intratubular y disminución del filtrado glomerular, defendido por algunos autores³⁴⁻³⁶, ha sido la principal defensa del mecanismo obstructivo como básico en la fisiopatología de la IRA^{37,38}. Solez y cols.⁷, en un modelo experimental con glicerol, demuestran que los cilindros y la necrosis celular tubular constituyen dos parámetros histológicos muy relacionados con los niveles de creatinina sérica. Otros autores³⁹ también confirman una relación directa entre el grado de necrosis, la oclusión de túbulos y los niveles de disfunción renal.

Si la presencia de cilindros, dilatación de túbulos y pérdida del reborde en cepillo están muy relacionados entre sí y sustentan la teoría obstructiva como mecanismo fisiopatológico clave, la existencia de necrosis unicelular, con destrucción de la membrana basal tubular o tubulorrexis,

ya descrita por Oliver³⁰, constituye el sustrato explicativo de la teoría del *leakage* o pérdida pasiva del flujo intratubular hacia el intersticio^{8,40-42}.

Todas estas características histológicas, demostradas en nuestro estudio y comentadas en la literatura, se ven enriquecidas y explicadas en el plano ultraestructural. La demostración de una alteración a nivel subcelular, como «indicador» de la lesión isquémica, tiene una importante repercusión fisiopatológica. Desde el punto de vista ultraestructural, las células del TP tienen unas características peculiares íntimamente relacionadas con su activa función y que consisten fundamentalmente en: microvellosidades apicales o «reborde en cepillo», profundas y ramificadas interdigitaciones laterales y basales que constituyen el LBL y, por último, gran riqueza mitocondrial necesaria para mantener niveles de ATP, homeostasis de la membrana celular y regulación del calcio intracelular, eslabones imprescindibles en la cadena metabólica de la célula tubular^{14,40,41,43-46}.

La alteración y pérdida de las microvellosidades apicales del TP, ya descrita con MO⁷, es una de las características más precoces y constantes en la NTA. Glaumann y cols.¹⁶ demuestran distorsión de los microvillios a los cinco minutos de isquemia. Reimer y cols.⁴⁷ observan similares alteraciones, que consideran lesión reversible. En base al estudio ultraestructural, Donohoe y cols.⁴¹ consideran que la obstrucción tubular era secundaria a la intensa descamación de las microvellosidades apicales. Venkatachalam y cols.⁴⁸ describen como lesión muy inicial e irreversible una «interiorización» de las microvellosidades apicales, que tendía a normalizarse a las seis horas después de restaurado el flujo renal. Coincidiendo con Jones¹⁷ y Olsen^{12,40}, no hemos demostrado esta inversión de microvellosidades en los períodos iniciales y posiblemente sea un fenómeno muy inicial o bien inconstante.

El LBL tanto de la célula tubular proximal como distal es un punto esencial en el transporte activo ATPasa dependiente del Na⁺ y de K⁺^{43,49}. Parece estar demostrado que la isquemia altera el metabolismo celular ATPasa, iniciándose una pérdida de la regulación electrolítica intracelular^{14,25,41,50,51}. En nuestro estudio hemos observado una lesión del LBL a partir de las veinticuatro horas, y que se hace evidente a las cuarenta y ocho horas. Olsen, en 1967¹⁰, ya había sugerido una modificación de la porción basal celular. Jones, en 1982¹⁷, en base a estudios de ultraestructura, demuestra una pérdida de las interdigitaciones basales laterales del TP en la NTA humana. Davis y cols.⁵² encuentran una relación entre el grado de distorsión del LBL, el descenso de la filtración glomerular y la pérdida de la reabsorción del Na por el TP. La presencia de cuerpos densos miofilamentosos próximos a la membrana basal, también descritas previamente por otros autores^{17,18}, es interpretadas como retracción del citoesqueleto celular y correspondería a bandas de actina^{19,53}.

El TP necesita gran cantidad de energía para los procesos de fosforilización oxidativa y, consecuentemente, gran riqueza mitocondrial, cuya actividad es imprescindible en

el metabolismo energético intracelular^{14,44}. Por consiguiente, cualquier déficit mitocondrial repercutirá en el funcionalismo de dicha célula. En nuestros resultados podemos constatar una lesión mitocondrial constante sobre todo entre veinticuatro y cuarenta y ocho horas posreflujo. Trump y cols.¹⁴ describen siete niveles evolutivos de lesión mitocondrial relacionados con el efecto isquémico en la célula miocárdica. La pérdida de crestas mitocondriales, así como la ruptura de la membrana, caracterizarían a la lesión irreversible que conllevaría a la muerte celular¹⁴. En la misma línea de trabajo deben considerarse los estudios de Glaumann y cols.^{15,16}, que describen patología mitocondrial irreversible a partir de sesenta minutos de isquemia renal. En nuestra experiencia, todos los estadios de lesión mitocondrial previamente descritos han sido confirmados; sin embargo, debemos puntualizar que en los modelos experimentales isquémicos con reperfusión tras la isquemia, las alteraciones mitocondriales son menos conocidas que en modelos previos en los que el estudio ultraestructural se realizó inmediatamente tras el período isquémico. Otro punto de interés en la discusión es la dificultad de cuantificar objetivamente el grado de lesión mitocondrial. Esta dificultad se basa primero en la exigencia de una perfusión-fijación perfecta para delimitar el daño mitocondrial autolítico del daño mitocondrial isquémico; en segundo lugar, la existencia en una misma área de diferentes grados de lesión mitocondrial. La relación correcta entre los niveles de disfunción renal y la lesión mitocondrial exige, por consiguiente, métodos objetivos cuantimétricos.

El segmento S3 del TP se caracteriza por su alta actividad enzimática NADP-dependiente⁵⁴, en gran parte debido al abundante retículo endoplásmico rugoso y a la riqueza mitocondrial^{52,55}. Nosotros demostramos, en los estudios de control, la positividad con esta técnica y la utilidad en diferenciar el túbulo proximal-distal del túbulo colector que es negativo. En los ejemplos en los que la necrosis tubular era florida existía una negativización importante; sin embargo, su aplicación práctica es dudosa, ya que sería necesario la utilización de pruebas histoquímicas más sensibles y en las que los resultados fuesen susceptibles de ser cuantificados. En cualquier caso es evidente que el estudio del efecto de la isquemia renal exige la coordinación de tres líneas de trabajo: la morfología, tanto en su vertiente óptica como ultraestructural; la histoquímica y la fisiopatológica, si queremos avanzar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos tan complicados de la IRA.

Bibliografía

- Dunn JS, Gillespie M y Niven JSF: Renal lesions in two cases of crush syndrome. *Lancet*, 2:549-552, 1941.
- Bywaters EGL y Beall D: Crush injuries with impairment of renal functions. *Br Med J*, 1:427-432, 1941.
- Oliver J: Correlations of structure and functions and mechanisms of recovery in acute tubular necrosis. *Am J Med*, 15:535, 1953.
- Solez K, Kramer EC y Hemptinstall RH: The pathology of acute renal failure: Leukocyte accumulation in the vasa recta. *Am J Pathol*, 74:31A-32A, 1974.
- Olsen S: Renal histopathology in various forms of acute anuria in man. *Kidney Int*, 10:S2-S8, 1976.
- Bohle A, Jahnecke J, Meyer D y Shubert GE: Morphology of acute renal failure: Comparative data from biopsy and autopsy. *Kidney Int*, 10:S9, 1976.
- Solez K, Morel-Maroger L y Sraer JD: The morphology of «Acute Tubular Necrosis» in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glicerol model. *Medicine*, 58:362-376, 1979.
- Solez K: The pathology and pathogenesis of human «Acute Tubular Necrosis». En Solez K, Whelton A (eds.). *Acute Renal Failure: correlations between morphology and function*. Marcel Dekker, New York, Basilea, pp. 17-42, 1984.
- Dalgaard OZ y Pedersen KJ: Ultrastructure of the kidney in shock. *Proceeding of the 1st International Congress on Nephrology*. Basel, 165-176, 1961.
- Olsen S: Ultrastructure of the renal tubules in acute renal insufficiency. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 71:203-218, 1967.
- Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF y Levinsky NG: Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: Differences among the S1, S2 and S3 segments. *Kidney Int*, 14:31-49, 1978.
- Olsen TS, Hausem HE y Olsen HS: Tubular ultrastructure in acute renal failure: alterations of cellular surfaces (brush-border and basolateral infolding). *Virchows Arch (Pathol Anat)*, 406:91-104, 1985.
- Trump BF, Laiho KV, Mergner WJ y Arstila AV: Studies on the subcellular pathophysiology of acute lethal cell injury. *Beitr Path*, 152:243-271, 1974.
- Trump BF, Mergner WJ, Kahng MW y Saladino AJ: Studies on the subcellular pathophysiology of ischemia. *Circulation*, 53 (Suppl.):1-17/1-96, 1976.
- Glaumann B, Glaumann H, Berezsky IK y Trump BF: Studies on the pathogenesis of ischemic cell injury. II. Morphological changes of the pars convoluta (P1 and P2) of the proximal tubule of the rat kidney made ischaemic «in vivo». *Virchows Arch B Cell Path*, 19:281-302, 1975.
- Glaumann B y Trump BF: Studies on the pathogenesis of ischaemic cell injury. III. Morphological changes of the proximal pars recta tubules (P3) of the rat kidney made ischaemic «in vivo». *Virchows Arch Cell Path*, 19:303-323, 1975.
- Jones D: Ultrastructure of human acute renal failure. *Lab Invest*, 46:254-264, 1982.
- Jones D: Scanning and transmission electron microscopy of tubular changes in acute renal failure. En Solez K y Whelton A (eds.). *Acute renal failure: correlation between morphology and function*. Marcel Decker. New York, pp. 71-95, 1984.
- Jones D y Elliott WC: Gentamicin induced loss of basolateral surface area of rat proximal convoluted tubules. *Lab Invest*, 57:412-420, 1987.
- Badenoch AW y Darmady EM: The effects of temporary occlusion of the renal artery in rabbits and its relationship to traumatic uraemia. *J Pathol Bacteriol*, 59:79-94, 1947.
- Solez K, D'Agostini RJ, Stawowy L, Freedman MT, Scott WW, Siegelman SS y Heptinstall RH: Beneficial effect of propranolol in a histologically appropriate model of postischemic acute renal failure. *Am J Pathol*, 88:163-185, 1977.
- Hayat MA: *Introduction to biological Scanning Electron Microscopy*. University Park Press. Baltimore, pp. 54-65, 1978.
- Hayat MA: *Drying. Introduction to biological Scanning Electron Microscopy*. University Park Press. Baltimore, pp. 131-137, 1978.
- Dubowitz V: Histological and histochemical stains and reactions. Muscle production in bovine vascular endothelial cells. *Biochem Acta*, 792:304-309, 1984.
- Fried TA, Hishida A, Barnes JL y Stein JH: Ischemic acute renal failure in the rat: protective effect of uninephrectomy. *Am J Physiol*, 247:F568-F574, 1984.
- Bankir L, Bouby N y Trinh TT: Heterogeneity of the nephron anatomy. *Kidney Int*, 31 (Suppl. 20):S25-S39, 1987.
- Zimmerhackl BL, Robertson ChR y Jamison RL: The medullary microcirculation. *Kidney Int*, 31:641-647, 1987.
- Shanley PF, Brezis M, Spokes K, Silva P, Epstein FH y Rosen S: Hi-

- poxic injury in the proximal tubule of the isolated perfused rat kidney. *Kidney Int*, 29:1021-1032, 1986.
29. Conger JD, Robinette JB y Kelleher SP: Nephron heterogeneity in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 26:422-429, 1984.
 30. Oliver J, Mac Dowell M y Tracy A: The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury. Renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode. *J Clin Invest*, 30:1307-1351, 1951.
 31. Frega NS, Di Bona DR, Guertler B y Leaf A: Ischemic renal injury. *Kidney Int*, 10:S17-S25, 1976.
 32. Stein HJH y Fried TA: Experimental models of nephrotoxic acute renal failure. *Transpl Proceed*, 17:72-80, 1985.
 33. Solez K: Acute Renal Failure («Acute Tubular Necrosis», Infarction and Cortical Necrosis). En Heptinstall RM. *Pathology of the kidney*, 3.^a ed. Little Brown Co. Boston, Toronto, pp. 1070-1133, 1983.
 34. Popovtzer MM, Michael VF y Ogden DA: Acute Renal Failure. *Int J Art Org*, 8:505-510, 1985.
 35. Arendshorst WJ, Finn WF y Gottschalk CW: Pathogenesis of acute renal failure following renal ischemia in the rat. *Circulation Pres*, 37:558-568, 1975.
 36. Tanner GA y Steinhausen M: Tubular obstruction and ischemic induced acute renal failure in the rat. *Am J Physiol*, 230:1173-1181, 1976.
 37. Parekh N, Esslinger HU y Steinhausen M: Glomerular filtration and tubular reabsorption during anuria in postischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 25:33-41, 1984.
 38. Arendshorst WJ, Finn WF y Gottschalk CW: Nephron stop-flow pressure response to obstruction for 24 hours in the rat kidney. *J Clin Invest*, 53:1497-1500, 1974.
 39. Richards CJ y Di Bona GF: Acute renal failure: structural functional correlation. *Proc Soc Exp Biol Med*, 146:880-884, 1974.
 40. Olsen TS, Hausem HE y Olsen HS: Tubular ultrastructure in acute renal failure: alterations of cellular surfaces (brush-border and basolateral infolding). *Virchows Arch (Pathol Anat)*, 406:91-104, 1985.
 41. Donohoe JF, Venkatachalam MA, Bernard DB y Levinsky N: Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-functional correlations. *Kidney Int*, 13:208-222, 1978.
 42. Myers BD y Moran SM: Hemodynamically mediated acute renal failure. *N Engl J Med*, 314:97-105, 1986.
 43. Ernst SA: Transport ATPase cytochemistry: ultrastructural localization of potassium dependent and potassium independent phosphatase activity in rat kidney cortex. *J Cell Biol*, 66:586-608, 1975.
 44. Humes HD: Role of calcium in pathogenesis of acute renal failure. *Am Physiol Soc*, 250:F579-F589, 1986.
 45. Wilson PD y Schrier RW: Nephron segment and calcium as determinants of anoxic cell death in renal cultures. *Kidney Int*, 29:1172-1179, 1986.
 46. Schrier RW, Arnold PE, Van Putten VI y Burke ThJ: Cellular calcium in ischemic acute renal failure: role of calcium entry blockers. *Kidney Int*, 32:313-321, 1987.
 47. Reimer KA, Ganote ChE y Jennings RB: Alterations in renal cortex following ischemic injury III. Ultrastructure of proximal tubules after ischemia or autolysis. *Lab Invest*, 26:347-363, 1972.
 48. Venkatachalam MA, Jones DB, Rennke H, Sandstrom D y Patel Y: Mechanism of proximal tubule brush-border loss and regeneration following mild renal ischemia. *Lab Invest*, 45:355-365, 1981.
 49. Gluck S, Hirsch S y Brown D: Immunocytochemical localization of H⁺ ATPase in rat kidney. *Am Soc Nephrol* (abstract), p. 10A, 1986.
 50. Zager RA: Partial aortic ligation: A hypoperfusion model of ischemic acute renal failure and a comparison with renal artery occlusion. *J Lab Clin Med*, 110:396-405, 1987.
 51. Bastin J, Cambon N, Thompson M, Lowry OH y Burch HB: Change in energy reserves in different segments of the nephron during brief ischemia. *Kidney Int*, 31:1239-1247, 1987.
 52. Davis JM, Emslie KR, Sweet RS, Walker LL, Naughton RJ, Skinner SL y Tange JD: Early functional and morphological changes in renal tubular necrosis due to p-aminophenol. *Kidney Int*, 24:740-747, 1983.
 53. Olsen TS, Olsen HS y Hansen HE: Hypertrophy of actin bundles in tubular cells in acute renal failure. *Ultrastruct Pathol*, 7:241, 1984.
 54. Jacobsen NO y Jorgensen F: Further enzyme histochemical observations on the segmentation of the proximal tubules in kidney of the male rat. *Histochemie*, 34:11-32, 1973.
 55. Orsoni J, Rohr HP y Gloor F: Morphometric characterization of the different segments of the renal tubular apparatus in the rat. *Path Europ*, 4:345-360, 1969.