

**NEFRITIS AUTOLOGA EXPERIMENTAL. ESTUDIO MORFOLOGICO  
Y DE PERMEABILIDAD CAPILAR EN LAS LESIONES  
GLOMERULARES DE RATAS**

**Dr. José A. Pinto**

*Instituto Anatomopatológico, Escuela de Medicina, Universidad Central, Apartado  
Postal: 50647, Sabana Grande, Caracas, Venezuela.*

**RESUMEN**

En ratas de la cepa Lewis con nefritis autóloga activa (nefritis de Heymann) se estudiaron en secuencia las lesiones ultraestructurales de la pared capilar glomerular. En 19 animales nefríticos inyectados *in vivo* por vía IV con ferritina aniónica o catiónica se exploraron las modificaciones de permeabilidad de la membrana basal glomerular (MBG) y las modificaciones de las cargas aniónicas negativas de la lámina rara externa. En animales sacrificados a las 8 semanas post-inmunización con leve proteinuria (8.70 mg/24 horas) se observaron aislados depósitos electrodensos en la lámina rara externa con pérdida focal de las cargas negativas en dichos sitios. En animales con proteinuria intensa (60 mg/24 horas) sacrificados entre las 10 y 12 semanas post-inmunización se observaron abundantísimos depósitos electrodensos sub-epiteliales en la MBG, abundante IgG en patrón granular a la inmunofluorescencia, neofromación "espicular" de membrana y rechazo de los diafragmas de filtración. Este grupo de animales mostró incremento de permeabilidad de la MBG a la ferritina aniónica alrededor de

**los depósitos y diferentes alteraciones (pérdida, distorsión, regeneración y reacomodo) de las cargas negativas fijadas de la lámina rara externa de la membrana basal glomerular. La incubación in vitro con ferritina catiónica de glomerulos expuestos en los animales inmunizados, mostró un marcaje adicional de la cubierta polianiónica podocitaria con total integridad de la misma y similar a la de los animales controles.**

## INTRODUCCION

La nefritis autóloga experimental o nefritis de Heymann (12) es un modelo de lesión renal crónica producida en ratas, cuyas características morfológicas e inmunopatológicas son muy similares a las que se observan en la glomerulonefritis membranosa idiopática del humano. Dicha lesión puede ser inducida activa o pasivamente por inyecciones de fracción tubular (Fx1A) (10) o por administración de anticuerpos heterólogos obtenidos con antígeno tubular purificado o con fracción tubular total (Fx1A) (22, 26).

Publicaciones recientes (revisado en 14, 1) han demostrado convincentemente que en la nefritis de Heymann los depósitos subepiteliales que se observan en los capilares glomerulares se forman in situ, como resultado de la interacción de anticuerpos libres y complemento con un antígeno normalmente presente en la membrana basal glomerular (MBG). Este antígeno coincide en su distribución y características con los glicosaminoglicanos sulfatados (principalmente sulfato de heparan) que se localizan a nivel de los grupos aniónicos normalmente presentes en la lámina rara externa de la membrana basal glomerular (15, 25). En humanos sin embargo, no ha sido posible demostrar la presencia de algún constituyente glomerular normal, que unido a un anticuerpo forme parte de los depósitos subepiteliales observados en los pacientes con glomerulonefritis membranosa, por lo que se piensa que los mismos se originan probablemente de la previa "concentración" o "implante" de antígenos no renales, posiblemente catiónicos, en el espacio subepitelial (lámina rara externa de la MBG), a lo cual sigue la unión con los respectivos anticuerpos (2).

La lesión glomerular fundamental de la nefritis autóloga de Heymann o de la glomerulonefritis membranosa del humano, se caracteriza morfológicamente por un engrosamiento importante de las paredes capilares glomerulares debido: a la localización subepitelial de complejos inmunes (31), a la neoformación de membrana basal y a la aparición de irregularidades, "espículas", que se observan tanto al microscopio de luz como al electró-

nico (7, 31, 32). Dicha lesión generalmente no muestra proliferación celular ni inflamación y se manifiesta clínicamente por una marcada proteinuria, que ha demostrado ser muy dependiente de la activación del complemento (1).

En el modelo de nefritis de Heymann algunos autores (27, 28) han observado un evidente incremento de la permeabilidad de la ferritina aniónica, especialmente alrededor de los depósitos subepiteliales, cuando la misma se utiliza como molécula marcadora de la MBG al microscopio electrónico. Tal hallazgo parece ser la consecuencia de la pérdida irregular y de la distorsión de las cargas negativas fijas (principalmente glicosaminoglucanos), (15, 25) de la lámina rara externa de la MBG, tal como ha sido demostrado por Kelly y Cavallo (20) mediante el marcaje con ferritina catiónica de la MBG, en ratones NZB/W con nefritis lúpica espontánea. Estos hallazgos sugieren que la pérdida de cargas aniónicas fijas de la MBG, podría ser un mecanismo común mediante el cual estímulos inmunológicos u otras formas de daño glomerular serían capaces de producir proteinuria (20) sin que necesariamente ocurra un incremento en el tamaño o en el número de "poros" de la MBG.

La presencia de cargas negativas fijas en el glomérulo se observa no solo en la membrana basal de los capilares sino también en la superficie de las células endoteliales y epiteliales formando una cubierta que se ha denominado cubierta polianiónica (9). La misma juega un papel muy importante en el mantenimiento de la configuración normal de los podocitos y del complejo poro-diafragma de filtración (9). En estudio de nefrosis experimental (8) se ha observado que debido a la disminución de la superficie celular, existe una menor reactividad de la capa polianiónica podocitaria al hierro coloidal, sin que por otra parte disminuyan efectivamente el número de cargas aniónicas de dicha cubierta. Algunos autores (13) sin embargo, han observado en la nefritis humana modificaciones en la tinción de esta capa polianiónica podocitaria, que aparentemente están en relación con la intensidad de la proteinuria, de la lesión glomerular y de la función renal.

En este estudio del modelo de nefritis autóloga de Heymann, en ratas inmunizadas activamente con fracción tubular mas adyuvante de Freund, se presenta una secuencia morfológica de lesiones de membrana basal glomerular cuyas características se analizan ultraestructuralmente. Las características de la alteración de la MBG observadas en este modelo no han sido hasta ahora exhaustivamente estudiadas con ferritina catiónica, por lo que al mismo tiempo utilizamos ferritinas aniónica y catiónica para explorar in vivo las alteraciones de permeabilidad de la membrana basal capilar glomerular y las alteraciones (disminución, distorsión, neoformación y re-

modelación) de las cargas negativas fijas de la lámina rara externa, en relación a la presencia de depósitos inmunes y a la aparición de proteinuria. La incubación in vitro de pequeños fragmentos de corteza renal en ferritina catiónica se utilizó para evaluar simultáneamente en estos animales la capa polianiónica de los podocitos y sus posibles modificaciones en relación a la aparición de proteinuria. La presencia de complejos inmunes (inmunoglobulina y complemento) se puso en evidencia por el procedimiento de inmunofluorescencia directa utilizando antisueros contra inmunoglobulina (IgG) y complemento (C<sub>3</sub>) de ratas.

## MATERIAL Y METODOS

### **Animales:**

Se utilizaron en todo el experimento ratas de la cepa Lewis Charles River Breeding Laboratories, Inc, Wilmington, Mass) con un peso inicial entre 75 y 100 gramos, mantenidas con dieta común standard de laboratorio y agua ad libitum.

### **Preparación del antígeno e inducción de la nefritis de Heymann:**

Se preparó antígeno tubular (Fx1A) en forma similar al procedimiento descrito por Edgington y cols. (6) utilizando corteza renal de ratas Sprague-Dawley normales (Pel-Freez, Rogers, AR) comprimidas a través de un cedazo de acero inoxidable de 150 "mesh". 19 ratas Lewis recibieron una sola inmunización con fracción Fx1A liofilizada y emulsificada previamente en adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Cada animal era inyectado en las patas posteriores con 4 mg de antígeno (Fx1A) suspendido en 0.2 cc. de adyuvante. 9 animales no inmunizados sirvieron como controles normales.

### **Estimación de proteinuria:**

Tanto las ratas inmunizadas como los controles se colocaron en cajas metabólicas individuales con libre acceso a agua y alimento para recolección de orina de 24 horas. La proteína urinaria se determinó por el método de Lowry y cols. (24) usando albúmina de suero bovino de concentración conocida como patrón. La proteinuria era estimada en mg/24 horas. La proteinuria basal se determinó en todos los animales antes de la inmunización y recolecciones sucesivas de orina de 24 horas se efectuaron aproximadamente cada tres semanas después de la inmunización.

## **Procedimiento Experimental:**

Se examinaron los riñones de animales inmunizados y de controles en diferentes momentos después de la inmunización y luego de haber aparecido proteinuria anormal. Todas las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con Pentobarbital sódico (Nembutal, Abott Laboratories, Chicago Ill), a una dosis de 5 mg/100 gramos de rata. La cavidad abdominal era luego abierta y una aguja calibre 30 unida a un fino catéter de polietileno (Clay Adams. Perssipay, New Jersey) se introducía en la vena cava inferior. 5 animales inmunizados y 4 controles recibieron una inyección sistémica con ferritina nativa (Ferritina de bazo de caballo, libre de cadmio, Sigma Chemical, Co., St. Louis, Miss); (1 mg/gr de rata), mientras que 14 animales inmunizados y 5 controles recibieron inyección sistémica con ferritina catiónica (0,4 mg/gr de rata) preparada de acuerdo al método de Danon y cols (5). Las inyecciones se administraron con una bomba de infusión (Harvard Apparatus Co., Wills, Mass), con un flujo constante de 0,1 cc/min. Después de terminada la inyección se permitió a las ferritinas circular durante 5 minutos adicionales. Ambos riñones eran extraídos con el animal aún vivo y luego éste era sacrificado por sangramiento agudo.

## **ESTUDIOS MORFOLOGICOS**

### **Inmunofluorescencia:**

Fragmentos de riñón para inmunofluorescencia previamente embebidos en gelatina (Tissue Tek-OCT) (Miles Laboratories, Naperville Ill), se congelaron rápidamente en isopentano a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Secciones de 4-6  $\mu$  de espesor de este material obtenidas en criostato, se trataron con antiseros fluoresceinados anti-rata (IgG, C<sub>3</sub> y Albúmina), (Cappel Laboratories, Cochranville, PA) y fueron examinados en un microscopio de epifluorescencia.

### **Microscopía Electrónica:**

Pequeños fragmentos de corteza renal (1 mm<sup>3</sup> aproximadamente) fueron procesados para microscopía electrónica. Dichos fragmentos eran fijados por inmersión en fijador de Karnovsky ( $\frac{1}{2}$  concentración) (22), (2% de paraformaldehido; 2,5% glutaraldehido; 0.1 M. buffer cacodilato 0.1 M), (pH. 7.3), deshidratados, infiltrados e incluidos finalmente en Epon. Secciones ultrafinas de glomérulos se recogieron en rejillas de cobre y fueron contrastadas con nitrato de uranilo + citrato de plomo para su observación ultramicroscópico. Fragmentos adicionales de corteza de cada animal eran incubados en ferritina catiónica de acuerdo al siguiente esquema:

1. La corteza renal se fragmentó muy finamente formando un "pellet" y se fijó en medio de Karnovsky ( $\frac{1}{2}$  concentración) por 30 minutos. 2. El material fué lavado durante 5 minutos (2 veces) con buffer fosfato salino 0.01 M, pH. 7.4. 3. Los grupos aldehidos libres en el material eran neutralizados con solución de glicina 0.1 M en buffer fosfato (2 cambios 5 minutos cada uno). 4. El material se incubó con ferritina catiónica (concentración 0.6 mg/ml) por 3 minutos y se lavó luego con 0.1 M buffer fosfato durante 5 minutos (2 veces). 5. Finalmente el material se post-fijó en tetróxido de osmio al 2% ( $3\frac{1}{2}$  horas aproximadamente) y se completó el procesamiento para microscopía electrónica tal como se describe más arriba. Todo el material procesado para ultraestructura fue finalmente observado en un Microscopio Electrónico (Phillips 201), operado a 70 Kv.

## RESULTADOS

### Proteinuria e inmunofluorescencia:

Una semana antes del comienzo del experimento se efectuó en todos los animales utilizados, 28 en total, determinaciones de proteinuria basal de 24 horas que revelaron un valor promedio normal de  $5.23 \pm 3.25$  (DE) mg/24 horas y el cual se tomó como valor control. A la 8a. semana se encontró en 7 animales inmunizados incremento anormal leve y significativo ( $p = 0.01$ ) de la proteinuria con un valor promedio de  $8.70 + 2.99$  (DE) mg/24 horas. Entre la 10 y 12 semanas después de la inmunización se constató en 12 animales inmunizados la presencia de proteinuria anormal importante, con valores límites que oscilaron entre 18.7 mg/24 horas y más de 180 mg/24 horas. En animales sacrificados en este lapso se encontró en los riñones a la inmunofluorescencia un patrón granular característico en paredes capilares glomerulares especialmente IgG (3+), (Fig. 5) y muy escasa cantidad de C<sub>3</sub>. Albúmina se observó característicamente presente en forma de gotas fluorescentes en el epitelio tubular proximal.

## HALLAZGOS DE ULTRAESTRUCTURA

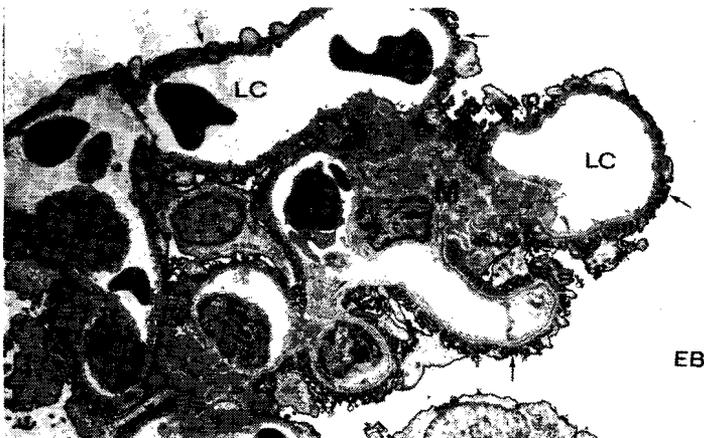
### Animales con proteinuria leve:

En animales con proteinuria anormal leve y valor promedio de **8.70 mg/24 horas**, sacrificados en la 8a. semana post-inmunización e inyectados *in vivo* por vía IV con ferritina catiónica, se encontraron muy aislados depósitos electrodensos en la lámina rara externa de la membrana basal glomerular (MBG), (Figs. 3, 4), en íntimo contacto con los "pies" de po-

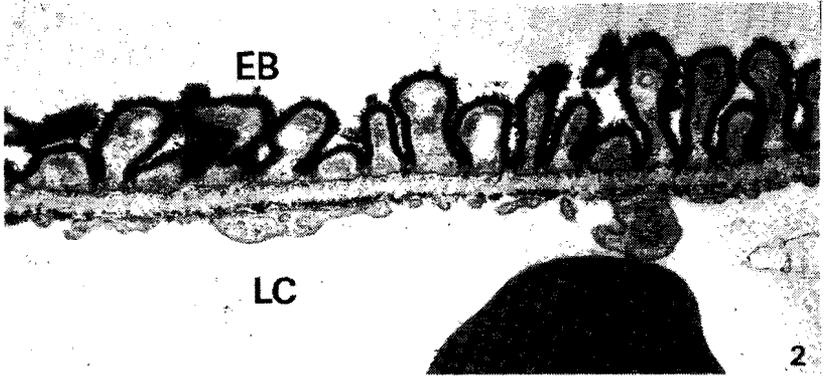
docitos o con el complejo diafragma-poro de filtración. En las áreas de membrana con depósitos se observó pérdida local circunscrita de las cargas negativas fijas de la lámina rara externa (Figs. 3, 4), mientras que en las áreas de membrana sin depósitos se observó regularidad y espaciamiento normal de las cargas negativas así como tal integridad del resto de la membrana, la cual era de aspecto normal. No se logró demostrar tampoco "pérdida" o fusión de las prolongaciones podocitarias y las mismas se observaron íntegras y perfectamente interdigitadas.

En glomérulos de estos animales y en controles previamente inyectados *in vivo* con ferritina catiónica para poner en evidencia las cargas negativas de la MBG, se realizó igualmente incubación *in vitro* de los mismos con ferritina catiónica. En las muestras donde se logró durante el procesamiento ruptura más o menos extensa de la cápsula de Bowmann (según metodología descrita arriba), fue factible demostrar pese a la pobre penetración, un marcaje de la capa polianiónica de los "podocitos" con ferritina catiónica, resultando que en un mismo glomérulo a la ultraestructura, se observaron ambos marcajes en dos localizaciones: en la membrana basal glomerular y en la cubierta polianiónica de células epiteliales.

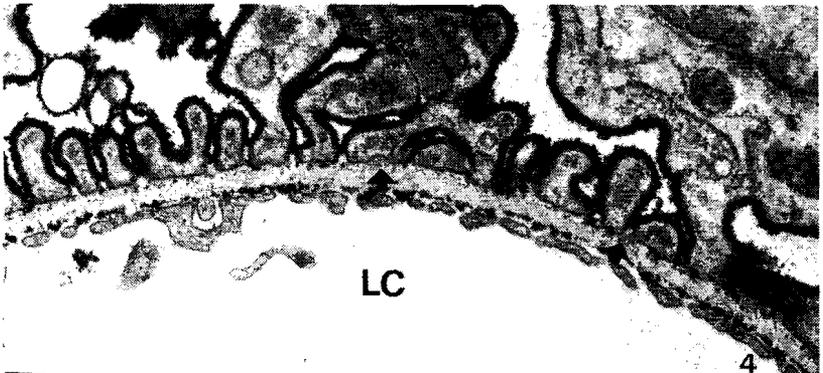
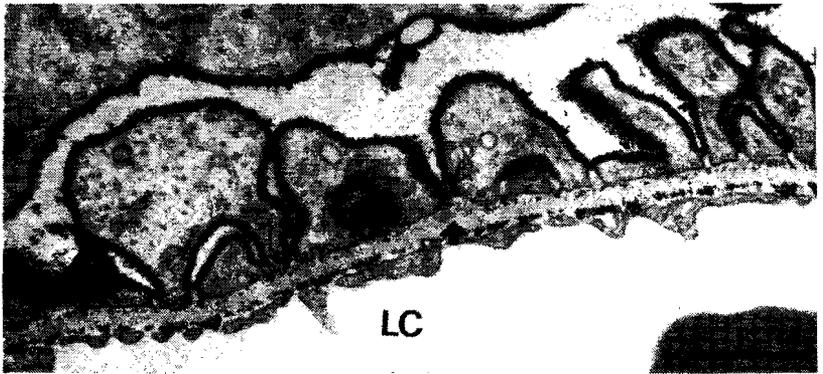
La capa polianiónica podocitaria en controles y animales inmunizados mostró similares características y una estructura multiparticulada (Figs. 1, 2, 3, 4). Como se observa en las Figs. 1, 2, 3, 4; las cubiertas polianiónicas de los "pies" de podocitos se adosan a nivel del poro y diafragmas de filtración glomerulares.



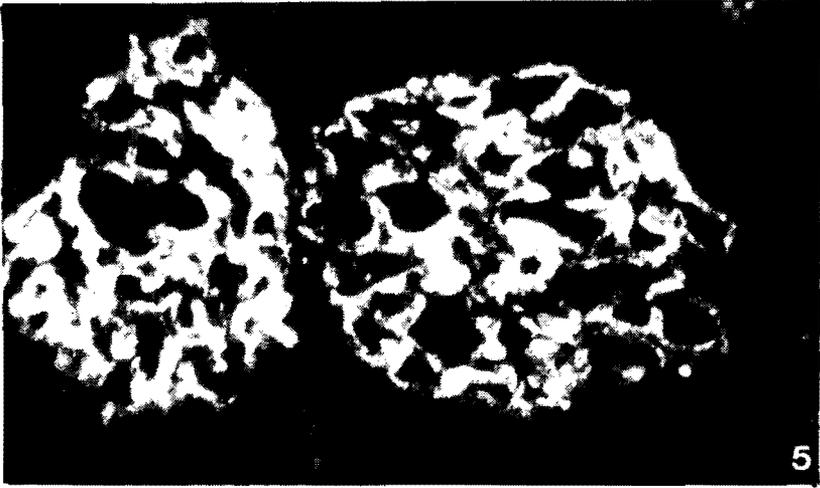
**Fig. 1.—** Glomérulo normal (Rata control). Obsérvese la superficie de los podocitos y sus prolongaciones con su cubierta polianiónica (flechas). Incubación con ferritina catiónica *in vitro*. Uranilo + Plomo. x 3.600. M = Mesangio. LC = Luz Capilar. EB = Espacio de Bowman.



**Fig. 2.**— Area de pared capilar normal (Rata control). Obsérvese el doble marcaje de las cargas negativas fijas de la MBG (en láminas raras) y en la superficie de los podocitos con ferritina catiónica. Uranilo + Plomo. x 10.000. LC = Luz capilar. EB = Espacio de Bowman.



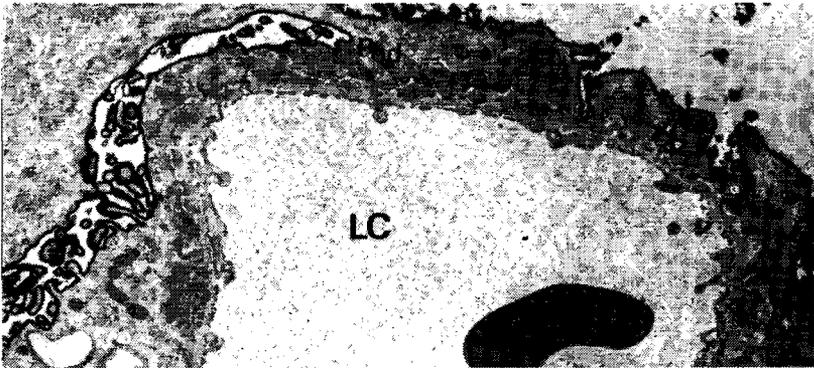
**Figs. 3 y 4.**— Rata a la 8a. semana post-inmunización. Segmento de pared capilar. Obsérvese los pequeños depósitos tempranos (flechas) en la lámina rara externa de la MBG con pérdida de cargas negativas locales. Estructura podocitaria normal con cubierta polianiónica. Doble marcaje con ferritina catiónica. Uranilo + Plomo. x 10.000. LC = Luz capilar.



**Fig. 5.—** Rata a la 12 semana post-inmunización. Inmunofluorescencia. IgG. Patrón granular regular (3+) en pared de capilares glomerulares x 200.

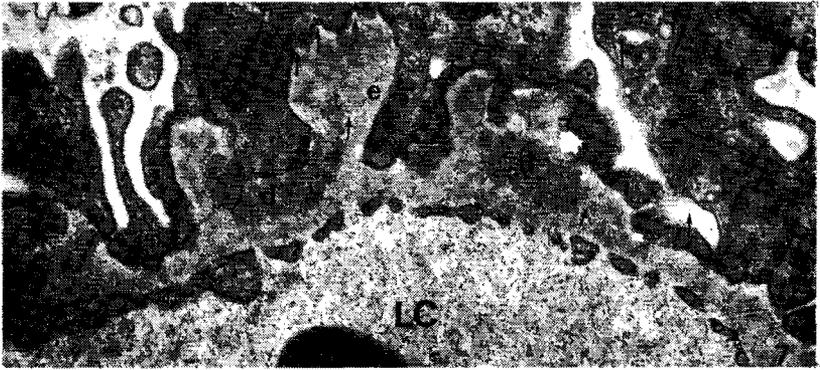
**Animales con proteinuria anormal importante:**

Animales inmunizados con proteinuria anormal importante se sacrificaron entre las semanas 10 a 12 post-inmunización. En todos ellos se observaron lesiones ultraestructurales importantes difusas de la membrana basal de los capilares glomerulares. La misma se observó engrosada y con presencia de abundantísimos depósitos electron-densos de tamaño variable localizados en la lámina rara externa (Figs. 6, 7, 8, 10) provocando marcada irregularidad de su vertiente subepitelial. Alrededor de los depósitos

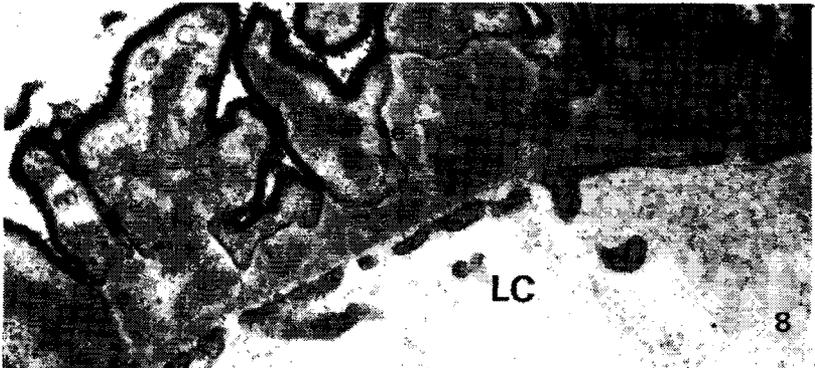


**Fig. 6.—** Rata a la 12 semana post-inmunización con proteinuria masiva. Glomérulo con presencia de múltiples depósitos electrodenso en vertiente subepitelial de MBG. Fusión extensa de prolongaciones podocitarias. Urano + plomo. x 6.000. LC = Luz capilar. Pod. = Podocitos.

en la mayoría de las asas se observó neoformación exuberante de membrana basal ("espículas"). Los podocitos mostraron extensa y casi total fusión de sus prolongaciones con desaparición de poros de filtración y re-



**Fig. 7.**— Rata con proteinuria masiva. Segmento de pared capilar glomerular con numerosos depósitos subepiteliales y "espículas" de neomembrana alrededor de los mismos. Inyección IV de ferritina aniónica. Incremento normal de partículas (flechas): alrededor de los depósitos, lámina rara externa y presencia en citoplasma de células epiteliales y espacio urinario. LC = Luz capilar. d = depósito. e = espícula.



**Fig. 8.**— Capa polianiónica podocitaria marcada con ferritina catiónica de aspecto normal, dibuja el contorno celular. Uranilo + Plomo. x 20.000. LC = Luz capilar. d = depósito. e = espícula.

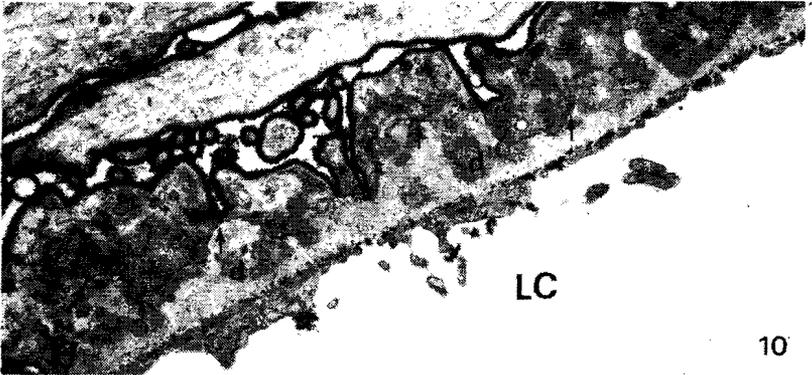
chazo de los diafragmas interpodocitarios (Figs. 7, 8, 9, 10). La membrana citoplasmática de los podocitos mostró transformación vellosa parcial y el citoplasma incremento de su electrón densidad (Figs. 7, 9, 10). En este grupo de animales algunos se inyectaron in vivo por vía IV con ferritina

aniónica (1 mg/gr) y otros se inyectaron con ferritina catiónica (0,4 mg/gr). En los animales inyectados con ferritina aniónica (Figs. 7, 8) se observó una distribución de las partículas en un "frente" a todo lo largo de la lámina densa de la MBG en las áreas sin depósitos, similar a lo observado en los animales controles, mientras que en las áreas con depósitos se observó la presencia de numerosas partículas alrededor de éstos y en el seno de la lámina rara externa, muy cercanos a las prolongaciones podocitarias (Fig. 7), las cuales mostraron cierto incremento de su actividad pinocítica, con formación de vesículas "cubiertas" y de cuerpos multivesiculares en su citoplasma, con presencia de partículas de ferritina en su interior.



LC

9



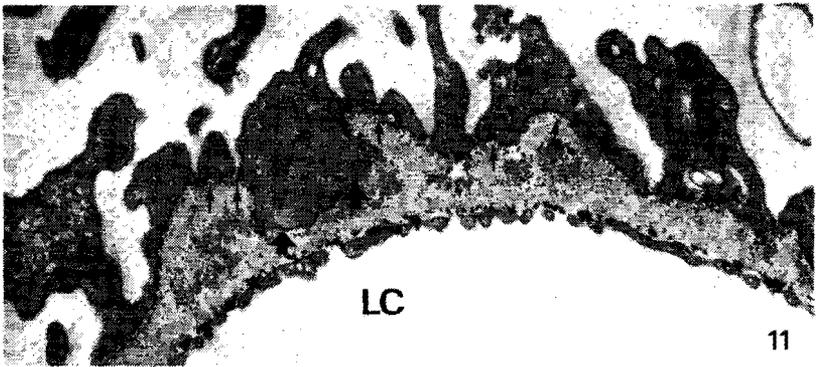
LC

10

**Figs. 9 y 10.— Rata con proteinuria masiva. Membrana basal glomerular con numerosos depósitos electrodensos subepiteliales. Doble marcaje con ferritina catiónica. Obsérvese la desaparición de las cargas negativas fijas en las zonas de depósitos. Aparición de las cargas negativas alineadas (flechas), irregularmente agrupadas (flechas) por debajo del citoplasma podocitario. Capa polianiónica podocitaria normal. Uranilo + plomo. x 15.000. LC = Luz capilar. p = podocitos.**

En los animales inyectados por vía IV con ferritina catiónica se observaron diferentes alteraciones de las cargas negativas fijas de la lámina rara externa de la MBG que pueden resumirse como sigue:

a) Disminución o ausencia evidente de cargas negativas en las áreas de localización de los depósitos (Figs. 9, 10). b) Agrupamiento irregular de partículas de ferritina en el borde de los depósitos (Figs. 9, 10, 11). c) En las áreas de membrana neoformada alrededor de los depósitos se observó ordenamiento de las cargas negativas fijas en grupos no regulares que en cierta forma remedan la disposición de la membrana normal (Figs. 9, 10). d) En los sitios donde los depósitos pierden el contacto con el citoplasma de las prolongaciones podocitarias, se observó aparente "regeneración" de la lámina rara externa y a su nivel presencia de grupos aniónicos fijos dispuestos en hilera ó agrupados más o menos en forma espaciada que semejan la disposición habitual en la membrana normal (Fig. 10). e) En animales donde la proteinuria fué menos intensa se observaron áreas de membrana basal con menos depósitos, algunos parcialmente removidos (Fig. 11) y otros incorporados progresivamente a la MBG. En la Fig. 11 se observa que la membrana neoformada de aspecto "espícular" muestra características similares a la membrana basal normal del capilar adyacente y las cargas negativas muestran una evidente regularidad en su organización tal como en la membrana normal. En un área de la Fig. 11 se observa un "puente" de membrana neoformada, rodeando un depósito.



**Fig. 11.**— Rata con proteinuria moderada. Membrana basal glomerular muestra defecto central (flechas) en zona de depósitos parcialmente removidos o incorporados y membrana regenerada espícular alrededor, con integridad de sus capas (láminas rara externa y densa). Inyección de ferritina catiónica muestra regularidad casi total de cargas negativas en "espículas" (flechas). Areas de membrana normal adyacente sin depósitos. Uranilo + Plomo. x 15.000. LC = Luz capilar.

Tanto en los animales inyectados con ferritina aniónica como los inyectados con ferritina catiónica se observó que ambos tipos de partículas permearon los depósitos y se encontraron en el seno de las mismas distribuidas en forma irregular. En ambos grupos de animales se incubó material de corteza renal in vitro con ferritina catiónica y se comprobó (Figs. 8, 9, 10) que en los sitios donde la ferritina penetró marcando la capa polianiónica podocitaria se observó una estructura multiparticulada continua de características semejantes a los animales controles (Figs. 1, 2) sin que se evidenciaran cambios en su espesor y en su intensidad.

## DISCUSION

La membrana basal glomerular es una matriz extracelular interpuesta entre los procesos podocitarios y una lámina delgada de endotelio fenestrado. Su función está principalmente influenciada por su compleja composición bioquímica<sup>(16)</sup>, la cual ha sido caracterizada en años recientes y complementada además con técnicas adicionales electroforéticas, morfológicas e inmunohistoquímicas<sup>(16)</sup>. Se acepta en la actualidad en general, como integrantes de su estructura los colágenos tipos IV y V, proteoglicanos variados, laminina y entactina. El colágeno tipo IV está fundamentalmente concentrado en la lámina densa de la MBG y muy posiblemente juega un papel muy importante en los mecanismos de tamizaje selectivo de partículas a través de la unidad de filtración en relación a sus tamaños. Adicionalmente se ha encontrado que los proteoglicanos de heparan sulfato son también componentes integrales de la MBG<sup>(15, 17)</sup>, que se distribuyen en todo el espesor de la misma, pero predominantemente se concentran en las láminas rara interna y externa<sup>(9, 18)</sup>, en las cuales se reconocen como el asiento de las cargas negativas fijas, demostrables mediante el uso de diferentes moléculas catiónicas (lisosima, rojo rutenio, ferritina catiónica, etc.),<sup>(9)</sup>. En condiciones de isosmolaridad estas cargas aniónicas le confieren una fuerte electronegatividad a la MBG y contribuyen significativamente a las propiedades selectivas para cargas de la unidad filtrante, además de que por su localización estratégica a lo largo de la MBG, ayudan a mantener la hidratación de la superficie de la membrana basal<sup>(16)</sup>, previniendo por lo tanto la adsorción de proteínas plasmáticas cargadas negativamente (albúmina por ejemplo) y permitiendo al mismo tiempo el paso continuo de solutos a través de la pared capilar<sup>(16)</sup>.

En el modelo autólogo de nefritis de Heymann tal como lo inducimos en este estudio, el antígeno responsable para la formación in situ de complejos inmunes de localización subepitelial en la MBG, se considera que es un constituyente intrínseco de la misma, que reacciona cruzadamente con antígenos del borde en cepillo del túbulo proximal<sup>(14, 1, 3)</sup>. La distribu-

ción del antígeno coincide con la localización de las cargas negativas aniónicas fijas de la lámina rara externa producidas por los glicosaminoglicanos sulfatados (15, 25) y como es lógico, el anticuerpo en este caso, se une el antígeno a nivel local (subepitelial), para formar los depósitos subepiteliales, lo cual se hará de una manera mucho más rápida si se trata de un anticuerpo catiónico (3). Al mismo tiempo la activación de complemento que se asocia a los complejos es factor indispensable para la aparición de proteinuria (1, 2) y es característicamente independiente de la actividad de los neutrófilos (1, 2). La intervención de complemento en este modelo según recientes observaciones (11) depende fundamentalmente de la activación de los componentes terminales: C5, C6, C7, C8, como mediadores importantes de la lesión glomerular. No obstante es interesante notar la ausencia de inflamación en este modelo, hecho que reflejaría según algunos autores (2) la interposición de estructuras más proximales de la pared capilar entre los neutrófilos u otros mediadores inflamatorios de la circulación, y el lugar de formación de los depósitos y de activación del complemento en el lado subepitelial de dicha pared. La acción del complemento resultaría en este caso de su acción citolítica debido a la formación del complejo de ataque de membrana (CAM) sobre la capa de fosfolípidos de las membranas celulares. Como la MBG no tiene capa de fosfolípidos su acción se localizaría probablemente en la membrana de las células epiteliales o en los diafragmas de filtración interpodocitarios (4).

La formación in situ de depósitos subepiteliales en la nefritis autóloga experimental de Heymann puede comenzar aproximadamente desde la 4a. semana post-inmunización (4), con aparición de leve proteinuria. En nuestros animales sacrificados a la 8a. semana y con proteinuria de 8.70 mg/24 horas encontramos pequeños y aislados depósitos electrodensos localizados en la lámina rara externa generalmente en contacto con los diafragmas de filtración (29). Estos mostraban ligero rechazamiento, aún cuando se conservaba la total integridad de la MBG y la disposición interdigitada de las prolongaciones podocitarias (4). Un hecho interesante a destacar es que la formación de estos depósitos iniciales provoca en cada sitio de la lámina rara externa donde se localizan, una pérdida focal de los grupos aniónicos fijos (Figs. 3, 4), con integridad del resto de estos grupos en las zonas de la lámina rara externa adyacentes no comprometidos. El fenómeno local de desaparición o enmascaramiento de grupos aniónicos altera el componente de cargas eléctricas y por ende las propiedades restrictivas de filtro y explica claramente el incremento de permeabilidad y la proteinuria (20).

La evidencia temprana de la desaparición de las cargas negativas fijas en los sitios de depósitos en la nefritis de Heymann no había sido hasta ahora mostrada utilizando el marcaje de la MBG con ferritina catiónica,

aún cuando en una publicación reciente Schneeberger y colaboradores (30) en el mismo modelo han evidenciado, utilizando hierro coloidal, similares alteraciones focales de la lámina externa en las fases iniciales de la nefritis.

La aparición de proteinuria masiva apareció en nuestros animales entre las 10 y 12 semanas post-inmunización. En estos animales se encontraron lesiones ultraestructurales intensas de la pared capilar a distintos niveles. Un hecho resaltante fué la localización masiva y confluyente de inmunocomplejos en la vertiente subepitelial de la MBG, tal como han sido demostrado en los hallazgos de inmunofluorescencia (Fig. 5). Este hecho produce el desplazamiento de los diafragmas de filtración hacia el espacio urinario (29), los cuales sufren al mismo tiempo torsión, plegamiento y replicamiento especialmente cuando existen complejos inmunes de gran tamaño (29). Al mismo tiempo se observó extensa "fusión" de las prolongaciones podocitarias y desaparición de los poros de filtración con formación de nuevas uniones oclusivas entre células epiteliales, como ha sido también demostrado por otros autores (29, 21). Las alteraciones de los diafragmas de filtración parecen ser secundarios a la disminución de la superficie podocitaria (29), aunque las mismas podrían igualmente producir un incremento de flujo hidrodinámico y el rápido pasaje de moléculas de proteína por los poros residuales (21). Una alteración adicional descrita (29) que no observamos, fué el despegamiento focal de los procesos podocitarios de su anclaje de la MBG, que constituyen también áreas de masiva filtración de proteínas.

La modificación de la permeabilidad de la MBG en nuestro grupo de animales con proteinuria severa se exploró utilizando ferritina aniónica, en igual forma a lo realizado por Schneeberger y colaboradores (27, 30) en el mismo modelo de nefritis de Heymann. En todos los animales se observó (Figs. 7, 8) un incremento de permeabilidad de la MBG a las partículas de ferritina, alrededor de los sitios de localización de los depósitos, con aparición de partículas de ferritina en la lámina rara externa, en el citoplasma de los podocitos (libres o en vesículas pinocíticas) y en el espacio urinario. Esta alteración de la permeabilidad de la membrana a la ferritina aniónica parece ser solo observable cuando la localización de los complejos inmunes en la MBG es suficiente como para producir una proteinuria mayor de 10 mg/24 horas (30). Esta observación sugiere que la proteinuria en estos animales es consecuencia de una perturbación en la estructura dependiente seguramente de cambios en las propiedades selectivas de tamaño y cargas de la MBG (30).

En este grupo de animales la exploración de las cargas negativas fijadas de la lámina rara externa de la MBG con ferritina catiónica mostró marcas y variables alteraciones. Un hecho muy evidente fué la disminución o

enmascaramiento (20, 30) de los grupos aniónicos en las áreas de depósitos, con agrupamiento irregular de las partículas de ferritina catiónica alrededor de los depósitos, contrastando así con la indemnidad y regularidad de los grupos aniónicos en las zonas de membrana sin depósitos de los mismos animales o de los animales controles. La neoformación "espicular" de la MBG alrededor de los depósitos mostró una ordenación irregular o distorsión en la disposición de las partículas de ferritina catiónica, aun cuando en distintas áreas pudo identificarse cierto esbozo de organización, especialmente en las áreas donde los depósitos habrían sido parcialmente incorporados en la MBG. En tales sitios observamos una aparente "regeneración" de la lámina rara externa (Figs. 9, 10) por debajo de los podocitos con una distribución de nuevas cargas o de cargas residuales mostrando cierto asomo de regularidad. En algunos animales donde la proteinuria no fué muy intensa y la MBG mostró menos depósitos, se observaron áreas de neomembrana "espicular" alrededor o por encima de los depósitos en vías de incorporación o ya parcialmente resueltos, con una evidente organización de sus capas (Fig. 11) (lámina rara externa y lámina densa) y una restitución casi completa de sus cargas negativas fijas. Todas estas modificaciones de la MBG desencadenadas por la formación de complejos a nivel subepitelial producen aparentemente cambios solo a nivel local de la lámina rara externa, sin aparente compromiso de la lámina densa y rara interna. Sin embargo, los complejos inmunes tienen ellos mismos la capacidad de estimular un incremento en síntesis de nueva membrana ("espículas") por las células podocitarias (31) que contribuye a la "cicatrización" de la membrana con depósito y que en condiciones normales contribuye eficientemente en gran parte a la renovación de la misma (31). Esta actividad de la célula epitelial para regenerar eficientemente nueva membrana alrededor de los depósitos supone necesariamente una total integridad funcional y metabólica de la misma. Esta afirmación parece confirmarse en nuestro material ya que nuestros hallazgos demuestran que en los animales con severa proteinuria y abundantes depósitos subepiteliales en la MBG, la misma mostró signos evidentes de regeneración, con restitución progresiva de sus capas y de sus cargas aniónicas fijas (Figs. 9, 10, 11). En este sentido es interesante destacar que la célula epitelial glomerular sintetiza en cultivos fundamentalmente proteoglicanos, especialmente heparan sulfato (9), que como es sabido determina en gran parte las cargas negativas fijas de la MBG (9), las que a su vez coinciden normalmente con los sitios de localización en la membrana del antígeno que da origen en este modelo a la producción de nefritis (15, 25). Muy recientes hallazgos (23) han demostrado de manera evidente que este antígeno de la nefritis de Heymann es una glicoproteína normal (gp. 330) del borde en cepillo del túbulo proximal, que se localiza en el lado luminal del mismo (23), pero que también es sintetizada por la célula epitelial glomerular primariamente (demostrado con anticuerpos monoclonales e inmunocito-

química) (22) y concentrada normalmente en vesículas cubiertas en la superficie de su membrana, en la base de los procesos podocitarios, donde se uniría eventualmente al anticuerpo. Este hallazgo podría explicar en cierta forma la observación de que en glomerulonefritis membranosa humana pueden superponerse estadios de lesión de membrana basal (32) y que si bien es cierto que no ha logrado determinarse en estos enfermos un antígeno intrínseco en la MBG, la hipótesis de un antígeno "plantado" o "concentrado", en la membrana, favorecería a lo largo de la historia evolutiva del proceso, con períodos de mejoría y agravamiento, la formación de nuevas generaciones de depósitos en áreas de membrana lesionadas previamente y consecutivamente reparadas (32).

Una última observación en nuestro material fué la que es factible a pesar de su pobre penetración, marcar *in vitro* con ferritina catiónica las cargas aniónicas libres en toda la superficie de los podocitos, sin que pudiera demostrarse diferencias entre animales proteinúricos y controles. Estos hallazgos sugieren tal como lo han observado otros autores (8) que en los animales nefróticos lo que disminuye es la superficie celular de los podocitos pero no el número de sus cargas aniónicas.

En conclusión el estudio del modelo de nefritis activa de Heymann en ratas, plantea a la luz de los diferentes hallazgos discutidos los posibles mecanismos patogenéticos de la lesión de la MBG, en base al conocimiento de la localización de un antígeno "fijo" en la lámina rara externa de la misma con formación de anticuerpos y unión de los mismos al antígeno *in situ* localmente, con activación del complemento de sus componentes terminales, sin inflamación y con aparición de proteinuria. Los complejos así formados provocan alteraciones iniciales de las cargas eléctricas de la MBG a nivel subepitelial (desaparición o enmascaramiento), con posterior evidencia de regeneración de las mismas en forma progresiva, a medida que se resuelven o se incorporan los depósitos a la MBG, y paralela a la regeneración del resto de los constituyentes de la membrana.

#### Agradecimientos

Trabajo financiado parcialmente a través del proyecto SI-908 del Conicit (Venezuela) y realizado en licencia de sabático en el laboratorio de Immunopatología Renal de la Universidad de Texas en Galveston (USA), que dirige el Dr. Tito Cavallo, a quien agradezco su gentil colaboración y apoyo. Igualmente agradezco la eficiente asistencia secretarial de la Sra. Italia de Guaderrama.

#### ABSTRACT

**Experimental autologous nephritis. Morphology and capilar permeability in glomerular lessions in rats.** *Pinto J. (Instituto Anatomopatológico, Uni-*

versidad Central de Venezuela, Apartado Postal 50647, Caracas, Venezuela). *Invest Clín* 26(3): 149-169, 1985.— A time sequence of glomerular capillary wall ultrastructural lesions was studied in Lewis rats with autologous Heymann's nephritis. Nineteen nephritic animals were intravenously infused (IV) either with anionic or cationic ferritin to explore the glomerular basement membrane (GBM) permeability changes and the alterations of the lamina rara externa fixed negative charges. In animals after 8 weeks of immunization and slight proteinuria (8.70 mg/24 hs.), few electrondense subepithelial deposits and focal loss of the lamina rara externa negative charges were only observed. In heavy proteinuric animals (60 mg/24 hs.) killed between 10 and 12 weeks after immunization, we found numerous electrondense subepithelial deposits, IgG granular deposition in fluorescent preparations, spike formation and displacement of slit diaphragms. This group of animals showed increased permeability of the GBM for anionic ferritin particles surrounding the deposits, and variable modifications (loss, distortion, regeneration and rearrangement) of the lamina rara externa negative charges. *In vitro* incubation with cationic ferritin of exposed glomeruli showed, and intact multiparticulated podocytic polyanionic surface coat as it was observed in control animals.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— COUSER W.C., SALANT D.J., ADLER S., MADAIO M.P.: Studies of experimental membranous nephropathy. *Transplantation Proceed.* 14: 474-481, 1982.
- 2— COUSER W.G., SALANT D.J., MADAIO M.P., ADLER S., CROGGEL G.C.: Factors influencing glomerular and tubulosinterstitial patterns of injury in SLE. *Am J Kidney Dis* 2 (suppl 1): 126-134, 1982.
- 3— COUSER W.G., SALANT D.J.: In situ immune complex formation and glomerular injury. Editorial review. *Kidney Int* 17: 1-13, 1980.
- 4— COUSER W.G., STILMANT M.M., DARBY C.: Autologous immune complex nephropathy I. Sequential study of immune complex deposition, ultrastructural changes, proteinuria, and alterations in glomerular sialo proteins. *Lab Invest* 34: 23-30, 1976.
- 5— DANON D., GOLDSTEIN L., MARIKOVSKY Y., SKUTELSKY E.: Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. *J Ultrastruct Res* 38: 500-510, 1972.
- 6— EDGINGTON T.S., GLASSOK R.J., WATSON J.I., DIXON F.J.: Characterization and isolation of specific renal tubular epithelial antigens. *J Immunol* 99: 1199-1210, 1967.

- 7- EHRENREICH T., CHURG J.: Pathology of membranous nephropathy. En "Pathology Annual". Vol. 3. p. 145. Edit. S.C. Sommers) Appleton Century Crofts. New York 1968.
- 8- FARAGGIANA T., GRISHMAN E.: The podocyte cell coat in experimental nephrosis. J Ultrastruc Res 74: 296-301, 1981.
- 9- FARQUHAR M.G.: The Glomerular Basement Membrane. A Selective Macromolecular Filter. En "Cell Biology of Extracellular Matrix" p. 335. (Edit. E. Hay). Plenum Publishing Corporation. New York. 1983.
- 10- GLASSOCK R.J., EDGINGTON T.S., WATSON J.I., DIXON F.J.: Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen II. The pathogenetic mechanism. J Exp Med 127: 573-588, 1968.
- 11- GROGDEL G.C., ADLER S., RENKE H.G., COUSER W.G., SALANT D.J.: Role of the terminal complement pathway in experimental membranous nephropathy in the rabbit. J Clin Invest 72: 1948-1957, 1983.
- 12- HEYMANN W., HACKEL D.B., HARWOOD S., WILSON S.G.F., HUNTER J.L.: Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvant and kidney suspensions. Proc Soc Exp Biol Med 100: 660-666, 1959.
- 13- HIRSCH H.Z., AINSWORTH S.K., SPICER S.S., KURTZ E.H., BRISSIE R.M.: Ultrastructural assesment by colloidal iron of the distribution and localization of anionic sites in human glomerulonephritis. Am J Pathol 102: 99-107, 1981.
- 14- HOEDEMAKER Ph. J., FLEUREN G.J., WEENING J.J.: In situ formation of glomerular immune aggregates. Transplantation Proceed 14: 469-471, 1982.
- 15- KANWAR Y.S., FARQUHAR M.G.: Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. Proc Natl Acad Sci (USA). 76: 1303-1307, 1979.
- 16- KANWAR Y.S.: Biology of disease. Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. Lab Invest 51: 7-21, 1984.
- 17- KANWAR Y.S., FARQUHAR M.G.: Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from glomerular basement membranes. Proc Natl Acad Sci (USA) 76: 4493-4497, 1979.
- 18- KANWAR Y.S., FARQUHAR M.G.: Anionic sites in the glomerular basement membrane: in vivo and in vitro localization tothelamina rarae by cationic probes. J Cell Biol 81: 137-153, 1979.

- 19- KARNOVSKY M.J.: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137 A. 1965.
- 20- KELLY V.E., CAVALLO T.: Glomerular permeability. Focal loss of anionic sites in glomeruli of proteinuric mice with lupus nephritis. *Lab Invest*, 42: 59-64, 1980.
- 21- KELLY V.E., CAVALLO T.: Glomerular permeability. Ultrastructural studies in New Zealand black/white mice using polyanionic ferritin as a molecular probe. *Lab Invest* 37: 265-275, 1977.
- 22- KERJASCHKI D., FARQUHAR M.G.: Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP 330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med* 157: 667-686, 1983.
- 23- KERJASCHKI D., FARQUHAR M.: The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 79: 5557-5561, 1982.
- 24- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 25- ROSENZWEIG L.J., KANWAR Y.S.: Removal of sulfated (Heparan sulfate) or nonsulfated (Hyaluronic acid) glycosaminoglycans results in increased permeability of the glomerular basement membrane to 125 I-Bovine serum albumin. *Lab Invest* 47: 177-184, 1982.
- 26- SALANT D.J., DARBY C., COUSER W.G.: Experimental membranous glomerulonephritis in rats. Quantitative studies of glomerular immune deposit formation in isolated glomeruli and whole animals. *J Clin Invest.* 66: 77-81, 1980.
- 27- SCHNEEBERGER E.E., LEBER P.D., KARNOVSKY M.J., MCCLUSKEY R.J.: Altered functional properties of the renal glomerulus in autologous immune complex nephritis. An ultrastructural tracer study. *J Exp Med* 139: 1283-1302, 1974.
- 28- SCHNEEBERGER E.E., O'BRIEN M.A., GRUPE W.E.: Altered glomerular permeability in Munich Wistar rats with autologous immune complex nephritis. *Lab Invest* 40: 227-235, 1979.
- 29- SCHNEEBERGER E.E., GRUPE W.E.: The ultrastructure of the glomerular slit diaphragm in autologous immune complex nephritis. *Lab Invest* 34: 298-305, 1976.

- 30- SCHNEEBERGER E.E., STAVRAKIS G., McCARTHY K.: Alterations in glomerular anionic sites in autologous immune complex nephritis. *Lab Invest* 49: 445-452, 1983.
  - 31- TORNROTH T., SKRIFVARS B.: The development and resolution of glomerular basement membrane changes associated with subepithelial immune deposits. *Am J Pathol* 79: 219-236, 1975.
  - 32- TORNROTH T.: Membranous Glomerulonephritis. En "Pathology of Glomerular Disease" p. 125. (Edit. S. Rosen) Churchill Livingstone. New York. 1983.
-