



SECCION ARTICULO ORIGINALES
REVISTA CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD
Año 5 Vol 1 No. 6 (Pags. 33 - 39)

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACIÓN DE
DISMORFISMO ERITROIDE EN PACIENTES CON
HEMATURIA Y EN INDIVIDUOS SANOS**
Martha Guerra de Muñoz¹. Martha Leonor Alvarez Zuluaga²

Recibido Junio 22 - 05 Enviado para evaluación Julio 2 - 05 Aceptado Agosto 27 - 05

RESUMEN

El diagnóstico de hematuria glomerular renal microscópica es uno de los mayores problemas en la nefrología, por lo que varios estudios en los sedimentos de orina se han realizado dirigidos a identificar eritrocitos de origen glomerular. Birch y Fairley fueron los primeros investigadores que han informado que eritrocitos que traspasan el glomérulo renal eran los dismórficos, en contraste con los eritrocitos normales de origen no glomerular. Este hallazgo ha demostrado ser útil para identificar los pacientes con hematuria glomerular.

Sin embargo, algunos estudios no han demostrado alta sensibilidad o especificidad de los eritrocitos urinarios dismórficos como un indicador de hematuria glomerular. En los años recientes, Tomita et al. y otros investigadores, han informado sobre células de G1 o eritrocitos urinarios con forma de buñuelo, configuración designada y protrusiones membranosas o ampollas como un marcador fiable para la hematuria glomerular.

PALABRAS CLAVES: Dismorfismo. Hematuria. Enfermedad glomerular.

¹ MSc. Microbiología. Profesor Asociado. Directora Especialización Bioquímica Clínica. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Bioquímica y Nutrición. E-mail mguerra@javeriana.edu.co.

² Especialista Bioquímica Clínica. Asesora Velezlab. E-mail malvarez@velezlab.com.co

ABSTRACT

Diagnosis of microscopic renal glomerular haematuria is one of the major problems in nephrology, and several studies have been conducted on urine sediments to identify erythrocytes of glomerular origin. Birch and Fairley were the first investigators who have reported that erythrocytes leaking from renal glomeruli were dysmorphic, in contrast to normal erythrocytes of non-glomerular origin. This finding proved to be of value in identifying patients with glomerular bleeding in some studies. However, other studies failed to demonstrate either a high sensitivity or specificity of urinary dysmorphic erythrocytes as an indicator for glomerular bleeding. In recent years, G1 cells or urinary erythrocytes with doughnut-like shape, target configuration and membranous protrusions or blebs have been reported by Tomita et al. and by other investigators as a reliable marker for glomerular haematuria.

KEY WORDS: Dysmorphic. Haematuria. Glomerular disease.

INTRODUCCIÓN

Uno de los inconvenientes de diagnóstico de mayor relevancia en la práctica clínica es la llamada "Hematuria Inespecífica" entendida como presencia de glóbulos rojos en orina, intactos (hematuria) o lisados (hemoglobinuria) en forma micro o macroscópica, por causas desconocidas; el hallazgo de eritrocitos en el sedimento urinario se ha convertido actualmente en uno de los estudios de mayor interés ya que se ha comprobado que su morfología y tamaño sugiere el origen renal o subrenal de la hematuria, por esto se afirma que los glóbulos rojos eumorfos indican hemorragia subrenal, mientras que los dismórficos demuestran el origen renal de la misma. ^(1, 2)

Reciben el calificativo de "dismórficos" aquellos eritrocitos que han experimentado alteración morfológica exhibiendo formas variadas con formación de vesículas, defectos de membrana en forma de agujeros, divertículos, granulaciones, formas completamente amorfas, configuración irregular, cantidad mínima de hemoglobina, distribución desigual de ésta y cambios notorios de tamaño. ⁽³⁾

Lograr buena identificación del tipo de eritrocitos hallados en el sedimento urinario es imprescindible, por lo tanto, es importante conocer los diferentes

métodos utilizados en la actualidad para este fin como son: observación del sedimento entre lámina y laminilla con la ayuda del microscopio óptico de luz, microscopio óptico de contraste de fase, coloración de Wright y muy recientemente, citometría de flujo. ^(4, 5, 6)

A través de la historia muchos autores se han interesado en estos tópicos. Se pretende entonces estandarizar el uroanálisis y buscar alternativas que permitan al clínico realizar un diagnóstico lo más aproximado posible a la realidad, con el objetivo de llenar el vacío existente en esta área y resolver cuál de todos estos métodos es el más apropiado para nuestro medio y para el paciente, teniendo en cuenta que en la actualidad prima el concepto de usar toda la tecnología posible pero lo menos invasiva, para llegar, ante todo, a diagnósticos más exactos, más cercanos a la realidad y menos traumáticos. ^(7, 8)

En 1975 aparece el primer reporte relacionado con el posible mecanismo de paso de los glóbulos rojos a través de la membrana basal glomerular realizado por Mourdian y Sherman, quienes basados en numerosos estudios de otros autores, describen defectos de membrana como responsable de varias condiciones asociadas con proteinuria, amiloidosis

y glomerulonefritis entre ellos los “huecos” o perforaciones en dicha membrana que pueden ser la causa de la hematuria.^(9, 10)

En 1983 Nagai y Noguchi, mediante sus hallazgos por microscopía electrónica, describen el posible mecanismo de la hematuria en la enfermedad glomerular así: la pared capilar glomerular esta compuesta de células endoteliales, membrana basal y podocitos. Fisiológicamente la membrana basal glomerular (MBG) esta compuesta por proteína y polisacárido; esto hace que esa pared la más espesa y elástica del organismo, probablemente por que sostiene una alta presión capilar (45 mmHg). Ajustándose a la circulación la MBG puede extenderse y retraerse; esta capa es sólo una de los componentes de la pared capilar glomerular y es completamente continua a la arteriola aferente de un extremo al otro.

Teóricamente, la hematuria es el resultado del paso de los glóbulos rojos a través de la MBG; algunas porciones lesionadas de dicha membrana, hacen posible el escape de las células rojas al espacio urinario. Los daños son “huecos” cuya formación no es común y ocurre en casos de hematuria como consecuencia de una glomerulonefritis posestreptococcica, glomerulonefritis rápidamente progresiva, glomerulonefritis lúpica, en el síndrome de Henoch - Schölein, y en glomeruloesclerosis maligna.^(11, 12, 13, 14)

Una vez ocurre el “hueco” llega el punto central en el cual el flujo sanguíneo tiene alta presión y causa turbulencia alrededor del hueco abierto. Aunque los glóbulos rojos son muy elásticos y deformables, si el hueco es bastante grande la célula roja puede cambiar un poco su configuración, pero aún así, no alcanza a pasar del todo a través del orificio; si éste es pequeño, la fuerza de deformación y la presión capilar pueden empujar al eritrocito contra el hueco abierto causando el proceso de deformación.

Este proceso inicialmente captura el glóbulo rojo en el hueco, pero el pulso de la circulación capilar combinado con la contractilidad de la membrana basal glomerular, estrecha la célula a través del hueco y finalmente hace que éste alcance el espacio urinario. En este

momento la fuerza de deformación es igual a la presión capilar que estrecha la membrana basal glomerular. Además de la fuerza de deformación, otros factores que influyen en el paso del glóbulo rojo son el tamaño del hueco, espesor de la MBG y el grado de deformación del glóbulo rojo.^(15, 16, 17, 18)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron pacientes con diagnóstico de hematuria (n=50) e individuos sanos (n=50) a los cuales se les realizó uroanálisis para observar los glóbulos rojos de acuerdo a su morfología (dismorfos y eumorfos) para diferenciar enfermedades glomerulares y no glomerulares por medio del estudio del sedimento urinario con los siguientes métodos: microscopía de luz, microscopía de contraste de fase, coloración de Wright y, citometría de flujo.

El procedimiento utilizado fue el propuesto por Fairley y Birch en 1982, quienes aconsejan realizar el uroanálisis usando orina recién emitida y procesar en mínimo de tiempo un volumen constante (10 mL), centrifugarla a 1500 rpm, durante 3 minutos decantar el sobrenadante, agitar bien, colocar 50 µL (0,05 mL) ente lámina y laminilla y examinar al microscopio. Se efectuó un recuento de 100 células (duplicado) y se informó en porcentajes.

La detección de sangre en la orina se realizó utilizando tiras reactivas (química seca), cuyo fundamento se basa en la liberación de oxígeno por el peróxido mediante la actividad de tipo peroxidasa del hem de la hemoglobina libre, los eritrocitos lisados o la mioglobina. Con el fin de ayudar en el diagnóstico, se observó el plasma y la orina del paciente. Un aspecto punteado de la tira indica presencia de hematíes intactos, plasma y sobrenadante de la orina hemolizado, posiblemente hemólisis y un plasma claro y sedimento sin hematíes mioglobinuria.

Con el fin de prevenir la lisis de los hematíes se utilizaron orinas con densidad urinaria normal y ácida. La muestra se procesó inmediatamente para evitar la proliferación bacteriana

La valoración por citometría de flujo es un método de conteo de células a través de un canal de flujo, basado en medidas densitométricas y volumétricas de las mismas. El autoanalizador ha sido usado para proveer valores más objetivos de la morfología de los eritrocitos urinarios. Con esta metodología la muestra a analizar debe estar en suspensión con un apropiado fluorocromo y pasado individualmente a través de un rayo de luz. Las pulsaciones de fluorescencia son calculadas y almacenadas en forma de histogramas, donde cada eje está constituido por número de pulsaciones emitidas (eje de las Y) y la intensidad de fluorescencia relativa (eje de las X). La observación simultánea de cilindros eritrocitarios y de eritrocitos eumorfos o dismorfos, sugiere la presencia de origen renal y permite profundizar en la citología exfoliativa renal, como también, la presencia de cilindros granulados o abundantes hialinos, leucocitos o epitelio renal, cilindros epiteliales o grasos, céreos y proteinuria.

Para realizar algunos análisis por citometría de flujo es necesario preparar la suspensión celular y si esto no se realiza en las condiciones de concentración e incubación adecuadas, los resultados pueden variar; además los protocolos realizados son diferentes según el laboratorio, por tanto los requerimientos para esta preparación son diversos y específicos.^(19, 20, 21)

RESULTADOS

Las muestras de orina de los pacientes con hematuria mostraron al examen físico aspecto transparente, color amarillo y al químico, densidad urinaria normal, pH ácido, proteinuria y hematuria masiva; en contraste, los sujetos sanos exhibieron el uroanálisis normal.

Al realizar la valoración de los sedimentos de los pacientes diagnosticados con hematuria mediante microscopía de luz en fresco y posteriormente coloreados con Wright y con microscopio de contraste de fase, se observaron glóbulos rojos dismórficos y distorsionados (acantocitos o células G1), con salidas citoplásmicas de aspecto piriforme, formación de vesículas, defectos de la membrana en forma de agujeros, divertículos, granulaciones, formas completamente amorfas,

configuración irregular, mínima cantidad de hemoglobina, distribución desigual de ésta, y cambios de tamaño notorios. Además, se observó leucocituria, cilindruria o bacteriuria. En el grupo control, se encontró hematíes intactos en tamaño y en morfología.

Las curvas de distribución volumétrica obtenidas mediante autoanalizador automático mostraron que los hematíes de origen glomerular son más pequeños y con curvas de distribución irregular y asimétrica, mientras que los hematíes de los sujetos sanos presentaron tamaño y distribución semejantes a los hematíes de la sangre venosa. El estudio del cociente volumen corpuscular medio de los hematíes urinarios/volumen corpuscular medio de los hematíes sanguíneos, fue menor que 1,0 en los pacientes con hematurias de origen glomerular y mayor a 1,0 en los saludables.

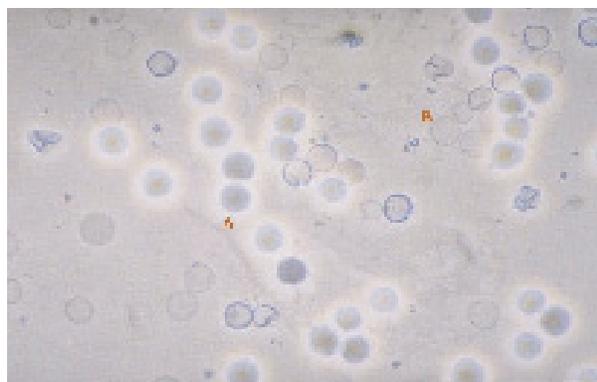


FIGURA 1. Hematíes eumorfos (A: contenido en hemoglobina parcialmente conservada; B: eritrocitos fantasmas).

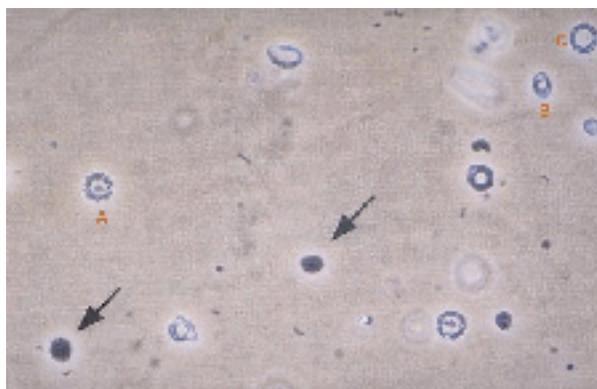


FIGURA 2. Hematíes dismórficos (A: acantocitos: células G1; B: hematíes con pérdida de hemoglobina; C : anucleocitos) y hematíes eumorfos (flecha negra).

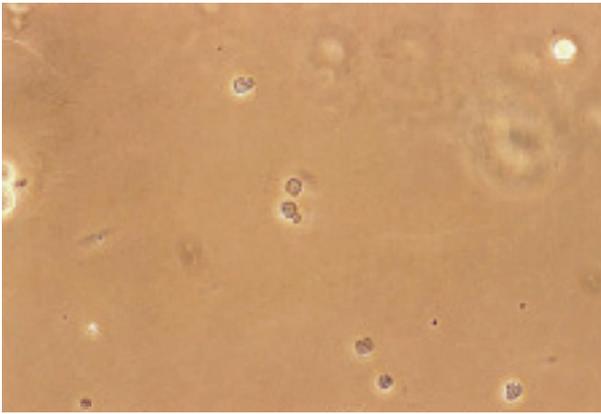


FIGURA 3. Acanthocitos: células G1.

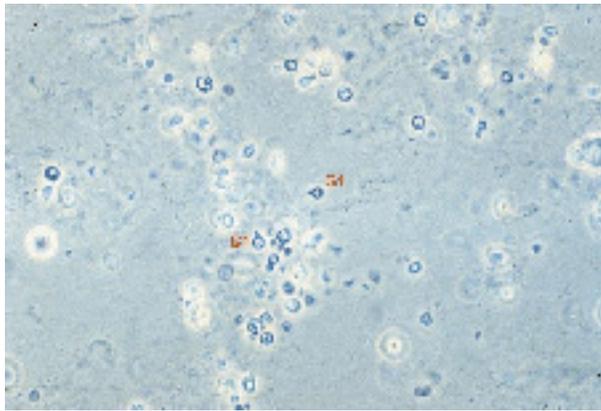


FIGURA 4. Hematuria glomerular. Diferentes formas de células G1.

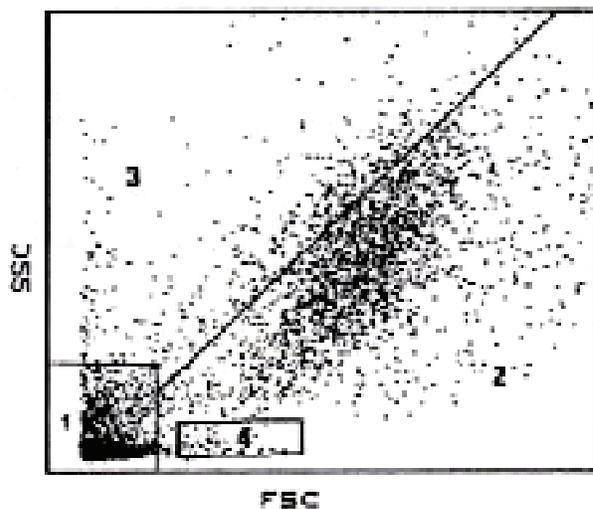


FIGURA 5. Histograma de citometría de flujo.

DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como objetivo fundamental valorar la morfología de los glóbulos rojos en pacientes con hematuria y en individuos sanos mediante análisis comparativo de los procedimientos de identificación de dismorfismo eritroide, ya que el diagnóstico de hematuria glomerular renal microscópica es una de las mayores dificultades en nefrología, razón por la cual se han realizado varios estudios en sedimentos de orina dirigidos a identificar eritrocitos de origen glomerular.

Los eritrocitos pueden experimentar alteraciones morfológicas permanentes e irreversibles, lo cual se conoce con el nombre de dismorfismo y aparecen en el sedimento de pacientes con afecciones renales glomerulares como lo describen Fairley y Birch. En la actualidad a estas células se les denomina acanthocitos o células G1.

Los hematíes dismórficos experimentan las más variadas deformaciones en el riñón, tales como formación de vesículas, defecto y ruptura de la membrana en uno o varios puntos que permiten la salida del contenido celular, el cual queda incluido en una especie de burbuja; en ocasiones auténticos agujeros celulares que dan lugar a restos de membranas arrugadas, divertículos, trozos de hematíes que recuerdan los poiquilocitos, células en rodete como dianocitos, hematíes planos con bordes festoneados, hasta formas totalmente amorfas (gránulos), aunque, los más frecuentes son los que tienen forma de "donut". El cambio continuo de pH y de la osmolalidad en el aparato tubular, es considerado responsable de las modificaciones en la forma de la membrana eritrocitaria que, eventualmente, ya ha sufrido lesiones previas en el glomérulo por enzimas leucocitarias, probablemente de tipo inmunológico, de frecuente implicación en patología glomerular. Una característica constante y fundamental en relación con la morfología es la pérdida del brillo propio de la integridad de la célula y la conservación parcial de su contenido citoplasmático de hemoglobina.

Las células de G1 urinarias fueron descritas primero por Tomita et al. en 1992. Sin embargo, se habían

observado previamente eritrocitos con morfología similar en muestras de orina de pacientes con glomerulonefritis por Addis en 1948 y por Kohler et al. en 1991. Los últimos investigadores habían nombrado dichos acantocitos y habían encontrado que una proporción acantocitos/eritrocitos totales igual o mayor que 5% eran evidencia de lesión glomerular. Este hallazgo era soportado por el trabajo de Kitamoto et al que ha demostrado que una proporción células G1/ eritrocitos totales mayor a 5% constituyen evidencia de hematuria glomerular. En otro estudio, muchos eritrocitos dismórficos con cambios morfológicos similares a las células de G1 se habían descrito y/o se habían ilustrado, y se nombraron colectivamente a estos y otros eritrocitos distorsionados como dismorfismo eritrocitario. A pesar de numerosos estudios realizados, en los últimos 25 años el criterio morfológico de estas células no se había definido y el porcentaje requerido de estas células para hacer diagnóstico seguro de hematuria glomerular no había sido uniforme. Las células de G1, por otro lado, son fácilmente identificables. Ninguna de estas células se ha descubierto en los sedimentos de orina de individuos saludables y pacientes con urolitiasis, lesiones tubulares renales y neoplasias uroteliales sin enfermedad glomerular renal asociada.^(22, 23)

Al comparar la metodología empleada, se observó correlación directa en los resultados, lo que permite deducir que la implementación de cualquiera de ellas es válida, dependiendo de los recursos con que se cuente. Sin embargo, es vital su estandarización y entrenamiento adecuado del profesional que lo realice. A su vez, los resultados obtenidos en este estudio mostraron similitud con los hallados por otros autores en diversas latitudes.

CONCLUSIONES

- El análisis de una muestra de orina recién emitida utilizando microscopía óptica de luz y/o de contraste de fase permitió clasificar el origen de la hematuria (glomerular y no glomerular) por observación de la morfología eritrocitaria.

- Si se comparan los resultados obtenidos por microscopía y coloración, se concluye que la primera es la metodología ideal por disponibilidad, sencillez y bajo costo.
- La valoración del dismorfismo exige estandarización y entrenamiento del profesional que lo realice.
- La citometría de flujo es un método costoso y no proporciona datos adicionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Birch, D.F. Fairley, K.F. Urinary erythrocyte Morphology in the Diagnosis of Glomerular Hematuria. Clin nephrology. Vol 20. No 2. Pag 78 - 84. 1983.
2. Birch, D.F. Fairley, K.F. Haematuria: Simple method for Identifying Glomerular Bleeding. Kidney International. Vol 21. Pag 105 - 108. 1982.
3. Birch, DF, Fairley KF. Hematuria: glomerular or non-glomerular. Lancet 1979; 2(8147):845-846
4. Bartlett. C. Raymond. Reagent Strip for Sediment Abnormalities Identified by Automated Microscopy in Urine from patients Suspected to Have Urinary Trac Disease. Arch Pathol Lab Med. Vol 118. Pag 1096 - 1101. Nov 1994.
5. Bartlett, C. Raymond. Usefulness of Microscopic Examination in Urinalysis. Am Journal Clin Pathol. Vol 82. No 6. Pag 713 - 716. Dic 1984.
6. Brody, L, Kark. Robert M. Identification of Elements of Urinary Sediment With Phase - Contrast Microscopy. JAMA. Nov 18. Vol 206. No 8. Pag 1777 - 1781. 1968.
7. Deindoerfer, R. R. Ringold,. "The Yellow IRIS" Urianalysis Workstation The Fisrt Commercial Aplicattion of "Automated Inteligent Microscopy". Clinical Chemistry. Vol 31. No 9. Pag 1491- 1498. 1985.
8. Fassett.R.G., Et Al. Scanning Electron Microscopy of Glomerular and non Glomerular red Blood Cells. Cin Nephrology.

- Vol 20. No 1. Pag 11- 16. 1983.
9. Ye, RG, Mao, XL. Mechanism of urinary erythrocyte deformity in glomerular diseases. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1994; 33:77-79
 10. Kitamoto Y, Yide C, Tomita M, Sato T. The mechanism of glomerular dysmorphic red cell formation in the kidney. *Tohoku J Exp Med* 1992; 167:93-105.
 11. Benson, S. George and BREWER, D. Eileen, Hematuria: Algorithms for Diagnosis. *JAMA*. Aug 28. Vol 246. No 9: 993 - 995. 1981.
 12. Birch, D.F. Fairley, K.F., Haematuria: Glomerular or non - Glomerular?. *The Lancet*. October 20. Pag 845 - 846. 1979.
 13. Fracchia, A. John. et al. Evaluation of Asymptomatic Microhematuria. *Urology*. Vol 4 No 46. April. 1995.
 14. Greene, F. O'shaughnessy. J. Edward. Jr., Study of Five Hundred Patients with Asymptomatic Microhematuria. *JAMA*. June 16. Vol 161. No 7. Pag 610 - 613. 1952.
 15. Funfstuck, R. Schuster FX, Stein G, Beintker M, Schramek P, Jana U. The significance of erythrocyte morphology in glomerular and non-glomerular hematuria. *Z Urol Nephrol* 1989; 82:85-91.
 16. Pollockm, C. Liu PL, Gyory AZ, Grigg R, Gallery ED, Caterson R, Ibels L, Mahoney J, Waugh D. Dysmorphism of urinary red blood cells-value in diagnosis. *Kidney Int* 1989; 36: 1045-1049.
 17. Lettgen, B, Wohlmuth A. Validity of G1-cells in the differentiation between glomerular and non-glomerular haematuria in children. *Pediatr Nephrol* 1995; 9:435-437.
 18. Dinda, AK, Saxena S, Guleria S, Tiwari SC, Dash SC, Srivata RN, Singh C. Diagnosis of glomerular haematuria: role of dysmorphic red cell, G1 cell and bright-field microscopy. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57:203-208.
 19. From the Renal Unit, Medical Department , Haukeland Hospital , Bergen Norway. Flow Cytometry of Urinary Source of Haematuria. *Scand Urology Nephrol* . Vol 29. Pag 33 - 37. 1995.
 20. GOMEZ, J, And DELPIN, S. Flow Citometric Analysis of Urina Sediment After Kidney Transplantation. *Transplantation Proceedings*, Vol 23 No 2 .Pag 1764 - 1765. Abril 1991.
 21. LEE. P.H. and LEE. C.S. Analysis of Urine Cytology by Citometry in Renal Transplantation. *Transplantation proceedings*. Vol 24. No 4. Pag 1543 - 1544 Aug 1992.
 22. Tomita M, Kitamoto Y, Nakayama M, Sato T. A new morphological classification of urinary erythrocytes for differential diagnosis of glomerular hematuria. *Clin Nephrol* 1992; 37:84-89.
 23. Addis T. *Glomerular nephritis*. New York: The Mac Millan Co, 1948: 42.