

Histopatología de la enfermedad renal crónica de etiología desconocida en comunidades agrícolas salvadoreñas

Laura López-Marín, Yudit Chávez Muñoz, Xenia A. García Ortiz, Walter M. Flores Flores, Yesenia M. García Zamora, Raúl Herrera Valdés, Miguel Almaguer López, Carlos M. Orantes Navarro, Denis Calero Brizuela, Héctor D. Bayarre Vea, Juan Carlos Amaya Rodríguez, Salvador Magaña Mercado, Paul A. Espinoza Madrid y Lisbeth Serpas

RESUMEN

INTRODUCCIÓN Hace más de una década se ha reportado una enfermedad renal crónica de causa desconocida en las comunidades agrícolas salvadoreñas la cual no está asociada a diabetes mellitus, hipertensión arterial ni a ninguna de las enfermedades tradicionales que con más frecuencia la causan.

OBJETIVO Caracterizar histopatológicamente la enfermedad renal crónica de causa desconocida en pacientes de comunidades agrícolas salvadoreñas, describir la asociación del daño renal con cada estadio de la enfermedad y evaluar la asociación entre las alteraciones histopatológicas y las variables sociodemográficas.

MÉTODOS Se estudiaron 46 pacientes de ambos sexos con una edad ≥ 18 años. Después de haber sido evaluados desde el punto de vista clínico, analítico e imagenológico, se les realizó biopsia renal, las que se clasificaron teniendo en cuenta la fibrosis intersticial, la atrofia tubular, el infiltrado inflamatorio intersticial, la esclerosis, el aumento de tamaño glomerular, y las lesiones vasculares extraglomerulares, según la clasificación de Banff 97, que se emplea para el rechazo del injerto renal. Para ello se realizaron las coloraciones especiales: ácido peryódico de Schiff, tricrómica de Masson, plata metenamina y

se hicieron técnicas de inmunofluorescencia para evaluar el depósito de IgA, IgG, IgM, C3, C1q, fibrina, cadenas ligeras kappa y lambda

RESULTADOS El hallazgo fundamental fue la fibrosis intersticial y la atrofia tubular con o sin infiltrado inflamatorio de células mononucleares. Se observó además esclerosis global, aumento de tamaño glomerular, colapso del ovillo en algunos glomérulos, lesiones de los vasos sanguíneos extraglomerulares como la proliferación de la capa íntima y el engrosamiento y la vacuolización de la capa media. La fibrosis intersticial y la glomeruloesclerosis se asociaron con el sexo masculino. Los trabajadores de la caña de azúcar mostraron más fibrosis intersticial y atrofia tubular y menos glomerulomegalia que el resto de los grupos.

CONCLUSIÓN El patrón morfológico evidente encontrado en todas las biopsias fue el de una nefropatía tubulointersticial crónica con daño glomerular y vascular secundario, en diferentes estadios de evolución de la enfermedad renal crónica, independientemente de la edad, el sexo, el lugar de residencia y la ocupación.

PALABRAS CLAVE Enfermedad renal crónica, nefropatía tubulointersticial crónica, nefritis tubulointersticial, glomeruloesclerosis, histopatología, El Salvador

INTRODUCCIÓN

La enfermedad renal crónica (ERC) constituye un problema de salud pública en el mundo. Sus principales causas son la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, las glomerulopatías y la enfermedad renal poliquística.[1] También se han reportado nefropatías de mucha menor frecuencia y específicas de algunas regiones geográficas como la denominada nefropatía de los Balcanes y la causada por hierbas chinas.[2–5]

Desde hace más de una década, se ha reportado una enfermedad renal crónica de causa desconocida (ERCd) de elevada prevalencia y mortalidad que se ha manifestado en diversas zonas geográficas, principalmente en Asia (Sri Lanka y la India) y América Central (Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua y el Sur de México). Se presenta en comunidades rurales y afecta fundamentalmente a trabajadores agrícolas, especialmente hombres y con bajo nivel de ingreso económico.[6–11]

La elevada prevalencia e incidencia de la enfermedad renal crónica ha motivado realizar investigaciones epidemiológicas de base poblacional en comunidades de la región del Bajo Lempa en El Salvador para caracterizar la población afectada y los factores de riesgo potencialmente asociados con esta enfermedad.[9]

Solo hemos encontrado tres investigaciones en las que se estudia la ERCd desde el punto de vista histopatológico. En una, se evaluaron 57 pacientes de Sri Lanka y los autores identificaron un daño tubulointersticial como evento patológico fundamental con lesiones vasculares y glomerulares secundarias.[10] Otro estudio

de 8 pacientes de las comunidades agrícolas salvadoreñas fue efectuado en colaboración con investigadores del Instituto Karolinska de Suecia. Los hallazgos histopatológicos indicaron una enfermedad tubulointersticial con extensa glomeruloesclerosis.

Estos datos no excluyeron que el daño tubulointersticial contribuyera al daño glomerular, pero la relación encontrada entre la cronicidad del tubulointersticio y los cambios glomerulares sugirieron un daño primario del glomérulo.[11] En el tercer estudio realizado en Sri Lanka, predominaron las lesiones tubulointersticiales; no se observaron depósitos en inmunofluorescencia, lo que orienta a los investigadores a descartar la respuesta inmune como posible causa.[12]

Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de la ERCd en El Salvador y el costo que implica la terapia renal de remplazo, las características histopatológicas resultan de particular interés, pues las descripciones previas son escasas e incluyen pocos pacientes. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la histopatología de la ERCd en pacientes de comunidades agrícolas salvadoreñas, así como describir la evolución del daño renal asociado al estadio de la enfermedad e identificar la asociación entre las alteraciones histopatológicas y las variables sociodemográficas.

MÉTODOS

Se desarrolló una investigación de corte transversal entre marzo y abril de 2013 en pacientes ≥ 18 años de comunidades agrícolas salvadoreñas. Los casos fueron identificados a partir de estudios epidemiológicos poblacionales en once comunidades agrícolas

en cuatro regiones de El Salvador. Los criterios de inclusión fueron: estadios de ERC del 2 al 3b (tasa de filtración glomerular 89 mL/min/1.73 m² a 30 mL/min/1.73 m² de área de superficie corporal)[13] que cumplieran los criterios clínicos de la enfermedad. Los criterios de exclusión fueron: HT, diabetes mellitus, glomerulopatías, enfermedad renal poliquística y enfermedades obstructivas del riñón, VIH positivo o cualquier condición clínica o social que pudiese alterar su inclusión en el estudio. De 60 pacientes que cumplieran con los criterios conocidos de ERC, fueron excluidos 14, lo que llevó a una muestra de 46 pacientes.

Los pacientes fueron ingresados para el estudio clínico, que incluyó entrevistas médicas, toxicológicas e información epidemiológica, exámenes especializados por sistemas de órganos, pruebas de sangre y orina y estudios imagenológicos. El método completo del estudio ha sido descrito en otro artículo.[14]

Las biopsias renales se realizaron en los participantes a través de técnicas percutáneas bajo control ultrasonográfico empleando una pistola de biopsia automática (Dana 2.2 Histo, aguja 14, EE. UU.). Los especímenes de biopsia se fijaron en formol neutro tamponado; se empleó un procesador de tejido Sakura (Japón). Se hicieron cortes a 2–3 micras en un micrótomos Leica (Alemania) para la obtención de las muestras en parafina y un criostato Microm (Alemania) para los cortes de tejido fresco.

Las tinciones empleadas fueron hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff, trícromica de Masson y plata metenamina. Se realizaron técnicas de inmunofluorescencia para evaluar la presencia, la intensidad y el patrón de anticuerpos como IgA, IgG, IgM, C3, C1q y fibrina (Dako).

Se cuantificó el número total de glomérulos, los glomérulos escleróticos y el aumento del tamaño glomerular. Se empleó la clasificación de Banff para evaluar el grado de fibrosis intersticial, atrofia tubular, infiltrado inflamatorio intersticial, lesiones vasculares y cambios glomerulares.[15] Se determinaron igualmente la expansión mesangial y la proliferación de células mesangiales, endocapilares y extracapilares.

Variables del estudio Ver tabla 1

Análisis Toda la información se guardó en una base de datos de Excel y se procesó con la ayuda del paquete estadístico SPSS

Tabla 1: Variables del estudio

Variable	Definición
Sexo	Masculino, femenino
Edad	≥18 años / <60 años
ERC, estadios por TFG (mL/min/1.73 m ²) (Ecuación MDRD, KDIGO, 2012 [13])	1: ≥90 con marcadores de daño renal 2: 60–89 con marcadores de daño renal 3a: 45–59 3b: 30–44 4: 15–29 5: <15
Ocupación	Cañeros (C)
Información obtenida por cuestionario al paciente	Agricultores no cañeros (NC) No agricultores (NA)
Fibrosis intersticial (% de área cortical)[15]	Ausente: ≤5 Ligera a moderada: 6-50 Severa: >50
Glomeruloesclerosis (% de glomérulos)[15]	Ligera: <24.9% Grave: ≥25%
Glomerulomegalia (% de glomérulos aumentados de tamaño)[15]	<10 ≥10
Colapso del ovillo glomerular[15]	Presente/ausente
Atrofia tubular (% de área cortical)[13]	Ausente Ligera a moderada: <25 Severa: ≥25
Infiltrado inflamatorio mononuclear (% de tejido renal)[15]	Ausente o ligero: ≤25 Moderado: 26–50
Proliferación intimal[15]	Presente/ausente
Engrosamiento de la capa media de los vasos	Presente/ausente
Vacuolización de la capa media de los vasos	Presente/ausente
Vacuolización hidrópica	Presente/ausente
Hialinosis de la pared de los vasos[15]	0 No lesiones típicas 1 Depósitos hialinos en solo una arteriola 2 Depósitos hialinos en > 1 arteriola, que no interesan toda la circunferencia 3 Depósitos hialinos que interesan toda la circunferencia
Intensidad de depósitos de IgA, IgG, IgM, C3, C1q, fibrinógeno, cadenas ligeras kappa y lambda (según evaluación del patólogo)	Ausente Ligera Moderada Severa
Localización de los depósitos	Inespecífico Mesangial Subendotelial Subepitelial Intramembranoso

KDIGO: *Kidney Diseases: Improving Global Outcomes*
MDRD: *Modification of Diet in Renal Disease*

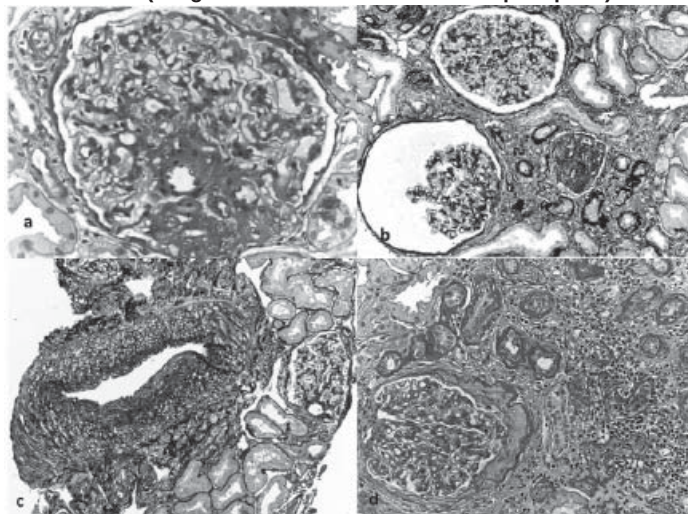
versión 15.0 para Windows. El test exacto de Fisher se empleó para identificar las posibles diferencias por sexo con un umbral de significación $\alpha = 0.05$.

Aspectos éticos El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Nacional de Investigación Clínica del Consejo Superior de Salud Pública de la República de El Salvador. Se consiguió previo consenso informado por escrito de los participantes.

RESULTADOS

Hallazgos por edad y sexo: Durante un periodo de dos meses, se realizó el estudio histopatológico a 46 biopsias renales: 36 hombres (78.3%) y 10 mujeres (21.7%). La edad media de los pacientes al momento de la biopsia fue de 45.4 años, con 30.6% <39 años. El paciente más joven, de 19 años de edad,

Figura 1 Histopatología de la nefropatía en comunidades agrícolas salvadoreñas (imágenes obtenidas con microscopio óptico)



- a. Lesión de esclerosis segmentaria focal perihilial en glomérulos aumentados de tamaño (PAS x 400)
- b. Área de cicatriz con fibrosis intersticial, atrofia tubular, esclerosis glomerular en trabajador cañero de 19 años (plata metenamina x 100)
- c. Proliferación intimal de arteria en trabajador cañero (plata metenamina x 100)
- d. a Atrofia tubular, infiltrado inflamatorio mononuclear y glomérulo con engrosamiento de la membrana basal de la cápsula de Bowman y colágeno en el espacio de Bowman en trabajador cañero en estadio 3b (PAS x 200)

PAS: Ácido peryódico de Schiff)

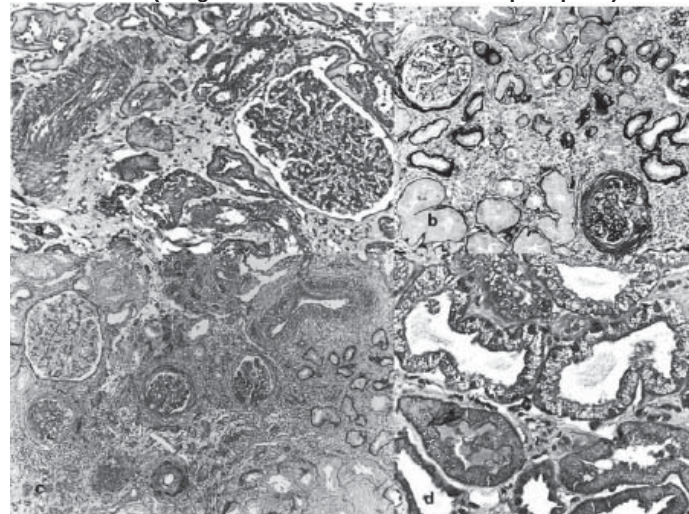
(Disponible a color online en www.medicc.org/mediccreview/lópez.html)

tenía una atrofia tubular severa, fibrosis intersticial y glomeruloesclerosis; su ERC fue diagnosticada tres años antes de la biopsia (Figura 1b). La fibrosis intersticial fue la lesión fundamental observada en las muestras (Figura 2a) y se asoció con el sexo masculino ($p = 0.025$): de los hombres, 38.9% (14/36) tuvo fibrosis intersticial de ligera a moderada y 33.3%, severa. En contraste, ninguna de las 10 mujeres estudiadas tuvieron fibrosis intersticial severa; 3 (30%) tuvieron fibrosis de ligera a moderada y 7 menos del 5% (Tabla 2).

La glomeruloesclerosis que afecta a $\geq 25\%$ del tejido estuvo presente en 58.7% de los pacientes y fue también más frecuente entre los hombres: 66.7% (24/36) versus 30% (3/10) en mujeres (Tabla 2). La glomerulomegalia (Figura 2c) de $\geq 10\%$ del total de los glomérulos en el espécimen de biopsia se observó en 22 pacientes (47.8%), de ellos, 47.2% (17/36) hombres y 30% (3/10) mujeres (Tabla 2). El colapso del ovillo glomerular se evidenció en biopsias de dos hombres y una mujer, todos en estadio 3 y ninguno era trabajador agricultor no cañero. El infiltrado inflamatorio ligero estuvo presente en 89.1% (41/46) de los casos. Sin embargo, la inflamación fue leve en todas las mujeres.

En 43.5% de los participantes hubo vacuolización hidrópica focal en todas las biopsias evaluadas (Figura 2d). La vacuolización de la capa media de los vasos sanguíneos se observó en 47.2% (17/36) de los hombres y en 30% (3/10) de las mujeres. Solo el 19.6% (9/46) tuvo proliferación intimal. El engrosamiento de la capa media estuvo presente en 61.1% (22/36) de los hombres y en 20% (2/10) de las mujeres (Tabla 2).

Figura 2 Histopatología de la nefropatía en comunidades agrícolas salvadoreñas (imágenes obtenidas con microscopio óptico)



- a. Fibrosis intersticial de ligera a moderada, glomérulos aumentados de tamaño en mujer con ERC en estadio 2 (tricrómica de Masson x 200)
- b. Área de cicatriz y fibrosis intersticial, glomérulos aumentados de tamaño, atrofia tubular, glomérulos con engrosamiento de la membrana basal de la cápsula de Bowman, espacio de Bowman ocupado por colágeno en mujer con ERC en estadio 3a (plata metenamina x 100)
- c. Área extensa de fibrosis intersticial, atrofia tubular e infiltrado inflamatorio intersticial en relación con glomérulo esclerosado en trabajador agricultor no cañero, glomérulo aumentado de tamaño (PAS x 200)
- d. Túbulo con vacuolización hidrópica (tricrómica de Masson x 400)

PAS: Ácido peryódico de Schiff)

(Disponible a color online en www.medicc.org/mediccreview/lópez.html)

Hallazgos por estadios de ERC Hubo 15 pacientes en estadio 2 de ERC y 31 en estadio 3, 11 de estos últimos en estadio 3a y 20 en estadio 3b (Tabla 3). La extensión de la fibrosis intersticial severa (Figura 1d) se incrementó en estadios más avanzados de la ERC, desde 13.3% de los pacientes en estadio 2 hasta 63.7% en estadio 3a y 100% en estadio 3b (Tabla 3). De forma similar, la glomeruloesclerosis severa se incrementó a medida que avanzaba el estadio de ERC, desde 26.7% en estadio 2 hasta 54.5% en estadio 3a y 85.0% en estadio 3b (Tabla 3). La glomeruloesclerosis segmentaria y focal perihilial se observó en solo un caso (Figura 1a).

La glomerulomegalia (en $\geq 10\%$ del total de glomérulos) fue hallada en 73.3% de pacientes en estadio 2, 36.4% en estadio 3a y 35% en pacientes en estadio 3b (Tabla 3).

Cuarenta y un pacientes (89.1%) tenían atrofia tubular, de los cuales en 76.1% (35/46) fue de ligera a moderada y en 13%, severa. Todos excepto un caso (30/31) se hallaron en estadio 3; en el estadio 3b la atrofia tubular era severa en 20% de los casos (Tabla 3) (Figura 2b). El infiltrado inflamatorio intersticial fue ligero en la mayoría de los pacientes. El infiltrado intersticial moderado fue más frecuente en pacientes en estadio 3b (20%) (Tabla 3).

Hubo proliferación intimal en 6.7% de los casos en estadio 2 de la enfermedad; sin embargo en estadio 3a y 3b se encontró en 36.4% y 20% respectivamente (Tabla 3).

El engrosamiento de la capa media de los vasos sanguíneos fue más evidente en pacientes en estadio 3b (80%); en el estadio 2

Tabla 2: Lesiones histopatológicas según sexo

Lesión	M n = 36	%	F n = 10	%	Valor p	Total n = 46	%
Fibrosis intersticial (proporción del área cortical)							
≤5	10	27.8	7	70.0	0.025*	17	37.0
6–50%	14	38.9	3	30.0		17	37.0
>50%	12	33.3	0	0.0		12	26.1
Esclerosis glomerular (proporción de glomérulos)							
<25%	12	33.3	7	70.0	0.067	19	41.3
≥25%	24	66.7	3	30.0		27	58.7
Porcentaje de glomérulos con glomerulomegalia (proporción de glomérulos)							
<10%	19	52.8	5	50.0	0.88	24	52.2
≥10%	17	47.2	5	50.0		22	47.8
Colapso glomerular	2	5.6	1	10.0	0.530	3	6.5
Atrofia tubular (proporción de área cortical)							
0	2	5.6	3	30.0	0.061*	5	10.9
<25%	28	77.8	7	70.0		35	76.1
≥25%	6	16.7	0	0.0		6	13.0
Infiltrado inflamatorio mononuclear (proporción de tejido renal)							
≤25%	31	86.1	10	100	0.57	41	89.1
26%–50%	5	13.9	0	0.0		5	10.9
Cambios vasculares							
Proliferación intimal	8	22.2	1	10.0	0.66	9	19.6
Engrosamiento de la capa media	22	61.1	2	20.0	0.032	24	52.2
Vacuolización de la capa media	17	47.2	3	30.0	0.476	20	43.5

* Categorías 1ra, 2da, 3ra combinadas

se observó solo en 20%. De forma similar la vacuolización de la capa media se observó en 70% (14/20) en pacientes en estadio 3b, versus 20% (3/15) en estadio 2 (Tabla 3).

Hallazgos por ocupación Los trabajadores de la caña de azúcar mostraron fibrosis intersticial más severa (38.9%) que los trabajadores agrícolas no cañeros (20.8%). De la misma forma, ellos mostraron más atrofia tubular severa (22.2%) que los trabajadores agrícolas no cañeros (8.3%) y mayor infiltrado inflamatorio intersticial (22.2% moderado versus 4.2%) (Tabla 4).

La glomerulomegalia que afecta a ≥10% del tejido se observó en los tres grupos ocupacionales, resultó más frecuente en trabajadores no agricultores (3/4, 75%) y fue menos frecuente en trabajadores de la caña de azúcar (8/18, 44.4%) (Tabla 4).

La proliferación intimal se observó solamente en trabajadores agricultores: 29.2% (7/24) en agricultores no cañeros y 11.1% (2/18) en trabajadores de la caña de azúcar (Figura 1c) (Tabla 4).

El engrosamiento de la capa media de los vasos sanguíneos extraglomerulares fue similar en pacientes cañeros y trabajadores que no cultivaban la caña de azúcar (55.6% y 58.3% respectivamente). En ninguna de las biopsias se observó hialinosis de la pared de los vasos sanguíneos extraglomerulares.

En un paciente se observó engrosamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares, con vacuolización difusa de la

membrana y en algunos sitios, proyección de la membrana basal que se corresponde con púas. Este caso mostró depósitos de IgG difuso y global de moderada intensidad. El diagnóstico fue de glomerulopatía membranosa en estadios iniciales con una nefritis tubulointersticial severa.

Otros: En ninguna de las biopsias se observó proliferación endocapilar, extracapilar, ni mesangial. Con la coloración tricrómica de Masson no se evidenció depósitos fucsínofilos en ninguno de los compartimientos glomerulares (subepiteliales, subendoteliales, ni membranosos), ni necrosis fibrinoide, ni infiltrado de leucocitos en el ovillo. Mediante las técnicas de inmunofluorescencia para detectar depósitos de inmunoglobulinas y complemento, se observaron depósitos inespecíficos de IgM (25 pacientes), C3 (18) y C1q (8) en los glomérulos. Dieciséis pacientes no tuvieron depósitos. Ninguna de las biopsias mostró depósitos de inmunoglobulinas en los túbulos ni en el intersticio.

DISCUSIÓN

La ERC de causas no tradicionales ha sido encontrada en las comunidades agrícolas de El Salvador, con un predominio de hombres agricultores, si bien se evidencia en mujeres y adolescentes. Hay varios factores que podrían contribuir al desarrollo de esta enfermedad y que se tuvieron en cuenta en el contexto del estudio clínico: extrema pobreza, contaminación medioambiental debido al abuso de agroquímicos, condiciones inadecuadas de trabajo con exposición a altas temperaturas y sustancias tóxicas, además del consumo excesivo de antiinflamatorios no esteroideos. En este artículo se analizaron los hallazgos histopatológicos en relación solo con la edad, el sexo, la ocupación y los estadios de la enfermedad. Las dos hipótesis más discutidas en relación con las causas de esta enfermedad son la nefrotoxicidad química y la isquemia tisular renal secundaria a la deshidratación y al estrés por calor bajo difíciles condiciones de trabajo, lo que es importante tener en cuenta a la hora de interpretar la histopatología.[14]

Al evaluar las biopsias y realizar una correlación clínico patológica se descartó el diagnóstico de una glomerulonefritis por la ausencia de un patrón específico y por la intensidad de los depósitos en los estudios con inmunofluorescencia.[13] Los hallazgos morfológicos encontrados tuvieron un patrón histopatológico de nefritis tubulointersticial pero en diferentes estadios de lesión en dependencia del sexo, del tipo de trabajo realizado y del estadio de enfermedad renal.

La fibrosis intersticial fue el hallazgo común en la mayoría de las biopsias y está asociado al estadio en que se encuentra la ERC. En el caso de algunas mujeres en estadio 2 y algunos pacientes no agricultores (en los cuales las condiciones de trabajo no son tan extremas) también había fibrosis intersticial pero en menor grado.

Wijkstrom estudió ocho pacientes salvadoreños a los que se les realizó biopsia renal en el Hospital Universitario Karolinska de Estocolmo. Esos pacientes mostraron atrofia tubular y fibrosis intersticial de ligera a moderada. También evidenciaron glomeruloesclerosis global que afectaba entre 29% y 78% de los pacientes. Por ello, los autores concluyeron que la fibrosis fue secundaria al daño glomerular.[11] Sin embargo estos pacientes (todos hombres) se hallaban en el momento de la biopsia en estadios avanzados de la enfermedad, situación en la que

Tabla 3: Lesiones histopatológicas por estadio de la ERC

Lesión	Estadio de ERC							
	2 n = 15	%	3a n = 11	%	3b n = 20	%	Total n = 46	%
Fibrosis intersticial (proporción de área cortical)								
≤5%	13	86.7	4	36.4	0	0	17	37.0
6–50%	2	13.3	5	45.5	10	50.0	17	37.0
>50%	0	0	2	18.2	10	50.0	12	26.1
Esclerosis glomerular (proporción de glomérulos)								
<25%	11	73.3	5	45.5	3	15.0	19	41.3
≥25%	4	26.7	6	54.5	17	85.0	27	58.7
Glomerulomegalia (proporción de glomérulos)								
<10%	4	26.7	7	63.6	13	65.0	24	52.2
≥10%	11	73.3	4	36.4	7	35.0	22	47.8
Colapso glomerular	0	0	1	9.1	2	10.0	3	6.5
Atrofia tubular (proporción de área cortical)								
0	4	26.7	0	0	1	5.0	5	10.9
<25%	9	60	11	100.0	15	75.0	35	76.1
≥25%	2	13.3	0	0.0	4	20.0	6	13.0
Infiltrado inflamatorio mononuclear (proporción de tejido renal)								
≤25%	14	93.3	11	100.0	16	80.0	41	89.1
26%–50%	1	6.7	0	0.0	4	20.0	5	10.9
Cambios vasculares								
Proliferación intimal	1	6.7	4	36.4	4	20.0	9	19.6
Engrosamiento de la capa media	3	20.0	5	45.5	16	80.0	24	52.2
Vacuolización de la capa media	3	20.0	3	27.3	14	70.0	20	43.5

ERC: Enfermedad Renal Crónica

hay usualmente un daño de todos los compartimientos del tejido renal.[1] Estos hallazgos histopatológicos eran de esperar y no pueden emplearse para establecer un orden relativo de aparición.

En nuestra investigación, el daño glomerular se presentó en la generalidad de los pacientes incluso en mujeres y en pacientes jóvenes, independientemente de la ocupación.[13] En pacientes en estadio 3 de la ERC, esta lesión se hace más evidente, lo que explica la disminución de la función renal.

En el paciente al cual se le diagnosticó una glomerulopatía membranosa incipiente, se observó igualmente una lesión tubulointersticial grave con áreas de atrofia tubular y fibrosis intersticial severa. Este daño no se observa en las glomerulopatías membranosas tempranas por lo que se trata de dos enfermedades que coexisten o posiblemente son secundarias a algún proceso (cáncer o medicamentos). Nosotros no podemos descartar ninguna posibilidad.[16,17]

La esclerosis segmentaria que se observó en uno de los pacientes fue interpretada como el comienzo de una glomeruloesclerosis global por los depósitos inespecíficos de C3 y de IgM en la inmunofluorescencia lo que sugiere esclerosis glomerular global que de un inicio es perihilial.[18] Además, no existía ningún hallazgo clínico o de laboratorio que sugiriera un daño glomerular inicial.

Tabla 4: Lesiones histopatológicas según ocupación

Lesión	Ocupación							
	C n = 18	%	NC n = 24	%	NA n = 4	%	Total n = 46	%
Fibrosis intersticial (proporción de área cortical)								
≤5%	4	22.2	9	37.5	4	100.0	17	37.0
6–50%	7	38.9	10	41.7	0	0.0	17	37.0
>50%	7	38.9	5	20.8	0	0.0	12	26.1
Esclerosis glomerular (proporción de glomérulos)								
<25%	8	44.4	8	33.3	3	75.0	19	41.3
≥25%	10	55.6	16	66.7	1	25.0	27	58.7
Glomerulomegalia (proporción de glomérulos)								
<10%	10	55.6	13	54.2	1	25.0	24	52.2
≥10%	8	44.4	11	45.8	3	75.0	22	47.8
Colapso glomerular	0	0	3	12.5	0	0.0	3	6.5
Atrofia tubular (proporción de área cortical)								
0	1	5.6	2	8.3	2	50.0	5	10.9
<25%	13	72.2	20	83.3	2	50.0	35	76.1
≥25%	4	22.2	2	8.3	0	0.0	6	13.0
Infiltrado inflamatorio mononuclear (proporción del tejido renal)								
≤25%	14	77.8	23	95.8	4	100	41	89.1
26%–50%	4	22.2	1	4.2	0	0.0	5	10.9
Cambios vasculares								
Proliferación intimal	2	11.1	7	29.2	0	0.0	9	19.6
Engrosamiento de la capa media	10	55.6	14	58.3	0	0.0	24	52.2
Vacuolización de la capa media	10	55.6	10	41.7	0	0.0	20	43.5

C: trabajadores de la caña de azúcar NC: trabajadores agricultores no cañeros
NA: no agricultores

La glomerulomegalia observada en el estudio es debida a una glomeruloesclerosis con pérdida de nefronas.[19,20] La hipertrofia glomerular compensatoria es un mecanismo de adaptación y el volumen glomerular incrementado lleva al desarrollo de la glomeruloesclerosis y la hipertensión.[21,22]

El infiltrado inflamatorio mononuclear se observó en áreas de atrofia y glomeruloesclerosis. La pielonefritis crónica tiene una apariencia histopatológica similar pero fue descartada por la ausencia de antecedentes clínicos y de hallazgos de laboratorio e imagenológicos compatibles con ese diagnóstico.[23]

En Sri Lanka se describieron hallazgos muy parecidos al de nuestra investigación a partir de biopsias de 57 pacientes con ERC. La glomeruloesclerosis fue la lesión más frecuente. Aunque el infiltrado intersticial inflamatorio estuvo ausente en 40% de los casos, solo hubo cuatro sin fibrosis intersticial, lo que sugiere que el daño tubulointersticial es el evento patológico principal en la ERCd con lesiones de esclerosis glomerular secundaria.[10] Otros investigadores de Sri Lanka han propuesto factores medioambientales tóxicos al encontrar altas concentraciones de arsénico en orina de pacientes con ERC[24] y elevadas concentraciones de cadmio en las aguas de pozos excavados para agua potable[25] lo que sugiere estos metales pesados como fuente de contaminación medioambiental.

El plomo es uno de los metales pesados mejor conocidos como causa de un daño similar. Cramer estudió biopsias renales de un grupo de pacientes expuestos a plomo y encontró un daño tubular y fibrosis intersticial sin daño glomerular ni vascular.[26] Mientras que algunos de nuestros hallazgos coinciden con los hallados en la exposición prolongada a metales pesados, no observamos cuerpos de inclusión nuclear o ninguno de otros signos de envenenamiento agudo por plomo.

Esta investigación es la primera en América en la que se estudia una mayor cantidad de pacientes en diferentes estadios de la ERC desde el punto de vista histopatológico. Tiene como limitación el no haberse complementado el estudio desde el punto de vista ultraestructural, lo que podría aportar más detalles a la descripción de las lesiones.

CONCLUSIONES

La fibrosis intersticial, la lesión más importante observada en este estudio, acompañada de daño glomerular (en la mayoría de las biopsias) y atrofia tubular de tipo clásico, llevó al diagnóstico histopatológico de nefritis tubulointersticial crónica. Su severidad aumentó en los estadios más avanzados de la ERC. Se necesitarán otras investigaciones para definir el motivo básico o fundamental y las causas contribuyentes en esta ERC de etiología no precisada, bien sea ocasionada por factores tóxicos medioambientales o laborales, por la isquemia crónica inducida por deshidratación, así como el papel potencial de la ingestión de medicamentos o infusiones herbales, todas compatibles con las imágenes histopatológicas que observamos y con el contexto social y epidemiológico. Nuestros hallazgos son consistentes con una etiología multifactorial de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Am J Kidney Dis. 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.
2. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U, et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jul 17;104(29):12129-34.
3. Bamias G, Boletis J. Balkan nephropathy: evolution of our knowledge. Am J Kidney Dis. 2008 Sep;52(3):606-16.
4. de Jonge H, Vanrenterghem Y. Aristolochic acid: the common culprit of Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2008 Jan;23(1):39-41.
5. Grollman AP, Jelaković B. Role of environmental toxins in endemic (Balkan) nephropathy. October 2006, Zagreb, Croatia. J Am Soc Nephrol. 2007 Nov;18(11):2817-23.
6. Chandrajith R, Nanayakkara S, Itai K, Aturaliya TN, Dissanayake CB, Abeysekera T, et al. Chronic kidney diseases of uncertain etiology (CKDu) in Sri Lanka: geographic distribution and environmental implications. Environ Geochem Health. 2011 Jun;33(3):267-78.
7. Torres C, Aragón A, González M, López I, Jakobsson K, Elinder CG, et al. Decreased kidney function of unknown cause in Nicaragua: a community-based survey. Am J Kidney Dis. 2010 Mar;55(3):485-96.
8. O'Donnell JK, Tobey M, Weiner DE, Stevens LA, Johnson S, Stringham P, et al. Prevalence of and risk factors for chronic kidney disease in rural Nicaragua. Nephrol Dial Transplant. 2011 Sep;26(9):2798-805.
9. Orantes CM, Herrera R, Almaguer M, Brizuela EG, Hernández CE, Bayarre H, et al. Chronic kidney disease and associated risk factors in the Bajo Lempa region of El Salvador: Nefrolempa study, 2009. MEDICC Rev. 2011 Oct;13(4):14-22.
10. Nanayakkara S, Komiya T, Ratnatunga N, Senevirathna ST, Harada KH, Hitomi T, et al. Tubulointerstitial damage as the major pathological lesion in endemic chronic kidney disease among farmers in North Central Province of Sri Lanka. Environ Health Prev Med. 2012 May;17(3):213-21.
11. Wijkström J, Leiva R, Elinder CG, Leyva S, Trujillo Z, Trujillo L, et al. Clinical and pathological characterization of Mesoamerican nephropathy: a new kidney disease in Central America. Am J Kidney Dis. 2013 Nov;62(5):908-18.
12. Athuraliya NT, Abeisekera TD, Amerasinghe PH, Kumarasiri R, Bandara P, Karunaratne U, et al. Uncertain etiologies of proteinuric-chronic kidney disease in rural Sri Lanka. Kidney Int. 2011 Dec;80(11):1212-21.
13. Definition and classification of CKD. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Int Suppl. 2013 Jan;3(1 Suppl):S5-14.
14. Herrera R, Orantes CM, Almaguer M, Alfonso P, Bayarre HD, Leiva IM, et al. Clinical characteristics of chronic kidney disease of nontraditional causes in Salvadoran farming communities. MEDICC Rev. 2014 Apr;16(2):39-48.
15. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int. 1999 Feb;55(2):713-23.
16. Vivette D, D'Agatti, Jennette JC, Silva FG. Non neoplastic of kidney diseases. Atlas of non tumour pathology. Washington, D.C: The American Registry of Pathology; 2005. Chapter 7. p. 163.
17. Nachman PH, Jennette JC, Falk RJ. Primary Glomerular Disease. In: Taal MW, Chertow GM, Marsden PA, Skorecki K, Yu ASL, Brenner BM, editors. Brenner and Rector's The Kidney. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 1154-61.
18. Taal MW. Risk Factors and Chronic Kidney Disease. In: Taal MW, Chertow GM, Marsden PA, Skorecki K, Yu ASL, editors. Brenner & Rector's The Kidney. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2012. p. 1111-7.
19. Hoy WE, Hughson MD, Bertram JF, Douglas-Denton R, Amann K. Nephron number, hypertension, renal disease and renal failure. J Am Soc Nephrol. 2005 Sep;16(9):2557-64.
20. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. N Engl J Med. 2003 Jan 9;348(2):101-8.
21. Hoy WE, Hughson MD, Singh GR, Douglas-Denton R, Bertram JF. Reduced nephron number and glomerulomegaly in Australian Aborigines: a group at high risk for renal disease and hypertension. Kidney Int. 2006 Jul;70(1):104-10.
22. Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. Kidney Int. 1996 Jun;49(6):1774-7.
23. Robins SL, Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patología estructural y funcional. Buenos Aires: Editorial Interamericana; 2006. Chapter 14. p. 529.
24. Jayasumana MACS, Paranagama PA, Amerasinghe MD, Wijewardane KMRC, Dahanayake KS, Fonseka SI, et al. Possible link of chronic arsenic toxicity with chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka. J Nat Sci Res. 2013;3(1):64-73.
25. Wanigasuriya KP, Peiris-John RJ, Wickremasinghe R. Chronic kidney disease of unknown aetiology in Sri Lanka: is cadmium a likely cause? BMC Nephrol. 2011 Jul 5;12:32.
26. Cramér K, Goyer RA, Jagenburg R, Wilson MH. Renal ultrastructural, renal function, and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure. Br J Ind Med. 1974 Apr;31(2):113-27.

LOS AUTORES

Laura López-Marín (autora para correspondencia: laura.lopez@infomed.sld.cu), médicos especialista anatomía patológica, máster en aterosclerosis, profesora auxiliar, Instituto Nacional de Nefrología, La Habana, Cuba.

Yudit Chávez Muñoz, técnica en citohistopatología, Instituto Nacional de Nefrología, La Habana, Cuba.

Xenia A. García Ortiz, especialista en anatomía patológica, Hospital Nacional San Juan de Dios, San Miguel, El Salvador.

Walter M. Flores Flores, especialista en anatomía patológica, Hospital Nacional San Juan de Dios, San Miguel, El Salvador.

Yesenia M. García Zamora, técnica en citohistopatología, Hospital Nacional San Juan de Dios, San Miguel, El Salvador.

Raúl Herrera Valdés, nefrólogo, doctor en ciencias médicas, profesor consultante, investigador titular, Instituto Nacional de Nefrología, La Habana, Cuba.

Miguel Almaguer López, nefrólogo, profesor consultante, investigador auxiliar, Instituto Nacional de Nefrología, La Habana, Cuba.

Carlos M. Orantes Navarro, nefrólogo, coordinador de investigaciones de Salud Renal, Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, San Salvador, El Salvador

Artículo Original

Denis Calero Brizuela, médico de familia, Instituto Nacional de Nefrología, La Habana, Cuba.

Héctor D. Bayarre Vea, médico especialista en bioestadística, profesor titular, Escuela Nacional de Salud Pública, La Habana, Cuba.

Juan Carlos Amaya Rodríguez, nefrólogo, Hospital Nacional San Juan de Dios, San Miguel, El Salvador.

Salvador Magaña Mercado, nefrólogo, Hospital Nacional San Juan de Dios, San Miguel, El Salvador, El Salvador.

Paul A. Espinoza Madrid, especialista en anatomía patológica, Hospital Nacional Rosales, San Salvador, El Salvador.

Lisbeth Serpas, especialista en anatomía patológica, Hospital Nacional Rosales, San Salvador, El Salvador.

Recibido: 30 de octubre, 2013

Aprobado: 28 de marzo, 2014

Declaración de conflicto de intereses: ninguno

Citación sugerida: López-Marín L, Chávez Y, García XA, Flores W, García YM, Herrera R, et al. Histopatología de la enfermedad renal crónica de etiología desconocida en comunidades agrícolas salvadoreñas. Traducido de MEDICC Rev. 2014 Apr;16(2):49-54. Disponible en: <http://www.medicc.org/mediccreview/index.php?lang=es&id=354>

Histopathology of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Salvadoran Agricultural Communities

Laura López-Marín MD MS, Yudit Chávez, Xenia A. García MD, Walter M. Flores MD, Yesenia M. García, Raúl Herrera MD PhD DrSc, Miguel Almaguer MD, Carlos M. Orantes MD, Denis Calero MD, Héctor D. Bayarre MD PhD, Juan Carlos Amaya MD, Salvador Magaña MD, Paul A. Espinoza MD, Lisbeth Serpas MD

ABSTRACT

INTRODUCTION For at least a decade, a chronic kidney disease unassociated with diabetes mellitus, hypertension or any of the more common traditional causes, has been reported in Salvadoran agricultural communities.

OBJECTIVE Characterize histopathology of chronic kidney disease of unknown etiology in patients from Salvadoran agricultural communities, describe renal damage associated with each disease stage, and assess associations between histopathological alterations and sociodemographic variables.

METHODS The study involved 46 patients of both sexes, aged ≥ 18 years. After clinical, laboratory and imaging examinations, kidney biopsies were performed and renal tissue assessed for interstitial fibrosis, tubular atrophy, interstitial inflammatory infiltration, sclerosis, increase in glomerular size and extraglomerular vascular lesions (according to the Banff 97 classification used for kidney transplant rejection). Special staining was done: Schiff periodic acid, Masson trichrome and methenamine silver. Immunofluorescence techniques

were used to evaluate IgA, IgG, IgM, complement C1q and C3, fibrin, and kappa and lambda light chain deposits.

RESULTS The main findings were interstitial fibrosis and tubular atrophy with or without inflammatory monocyte infiltration. In addition, generalized sclerosis, increased glomerular size, collapse of some glomerular tufts, and lesions of extraglomerular blood vessels (such as intimal proliferation and thickening and vacuolization of the tunica media) were observed. Interstitial fibrosis and glomerulosclerosis were associated with male sex. Sugarcane workers showed more interstitial fibrosis and tubular atrophy and less glomerulomegaly than other occupational groups.

CONCLUSION The morphological pattern in all biopsies was one of chronic tubulointerstitial nephropathy with secondary glomerular and vascular damage, in different stages of evolution of chronic kidney disease, independent of age, sex or occupation.

KEYWORDS Chronic kidney disease, chronic tubulointerstitial nephropathy, tubulointerstitial nephritis, glomerulosclerosis, histopathology, El Salvador

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) constitutes a global public health problem of epidemic proportions. Its main causes are diabetes mellitus, high blood pressure, glomerulopathies and polycystic kidney disease.[1] Much less common nephropathies with known causes specific to some geographic regions have been reported, such as endemic Balkan nephropathy and that caused by Chinese herbs.[2–5]

For over a decade, elevated prevalence and mortality have been reported from a chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu) in several geographic zones, mainly in Asia (Sri Lanka and India) and Central America (Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua and southern Mexico). It is found in rural communities and primarily affects farmworkers, especially men and those in low-income brackets.[6–11]

CKDu's high prevalence and incidence in El Salvador has spurred population-based epidemiological research in communities of the Bajo Lempa region to characterize the population affected and risk factors potentially associated with the disease.[9]

We found only three studies to date examining CKDu from a histopathological perspective. In one, 57 patients from Sri Lanka were assessed and authors identified tubulointerstitial damage as the main pathological event, with secondary vascular and glomerular lesions.[10] Another study of eight patients from Salvadoran agricultural communities was carried out in collaboration with researchers from Sweden's Karolinska Institute. Pathological findings indicated tubulointerstitial disease with extensive glomerulosclerosis. Possible contribution of tubulointerstitial damage to

glomerular damage was not ruled out, but they inferred from the relation between the chronic nature of the tubulointerstitial damage and glomerular changes that the latter constituted the primary event.[11] In a third study in Sri Lanka, tubulointerstitial lesions predominated, with no deposits seen on immunofluorescence, leading researchers to discard immune response as a possible cause.[12]

Given CKDu's high prevalence in El Salvador and the attendant costs of renal replacement therapy, its histopathological characteristics are of particular interest, especially since previous descriptions are scarce and include few patients. Our objective was to characterize the histopathology of CKDu in patients from Salvadoran agricultural communities, describe the evolution of renal damage associated with each disease stage, and assess associations between histopathological alterations and sociodemographic variables.

METHODS

A descriptive cross-sectional study was conducted from March through April 2013, among persons aged ≥ 18 years in Salvadoran agricultural communities. CKD cases were identified from population-based epidemiological studies in 11 agricultural communities in 4 regions of El Salvador. Inclusion criteria: CKD stages 2 to 3b (glomerular filtration rate $89 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ to $30 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ body surface area)[13] who met clinical criteria for CKD. Exclusion criteria: HT, diabetes mellitus, glomerulopathies, polycystic kidney disease and obstructive kidney disease, HIV positivity, any social or clinical condition preventing participation. Of 60 patients who met CKD criteria, 14 were excluded, leaving a study sample of 46 patients.

All underwent clinical study, including interviews covering medical, toxicological and epidemiological information; specialized examination by organ system; blood and urine tests and imaging studies. Complete methods for the entire study are described elsewhere.[14]

Renal biopsies were performed on all participants by percutaneous technique under ultrasonographic control using an automatic biopsy gun (Dana 2.2 Histo, 14-gauge, USA). Biopsy specimens were fixed in neutral buffered formalin; a Sakura tissue processor (Japan) was used. A Leica microtome (Germany) was used to take sections of 2–3 µm for paraffin samples and a Microm cryostat (Germany) for fresh tissue sections.

Stains used were hematoxylin-eosin, periodicacidSchiff, Masson's trichrome and methenamine silver. Immunofluorescence techniques (VWR thermo scientific, USA) were employed to assess presence, intensity and pattern of immune deposits: IgA, IgG, IgM, complement C1q and C3, and fibrin.

Total number of glomeruli and sclerosed glomeruli, and glomerular size increase were quantified. The Banff classification was used to assess degree of interstitial fibrosis, tubular atrophy, interstitial inflammatory infiltration, vascular lesions and glomerular changes.[15] Mesangial expansion and proliferation of mesangial, endocapillary and extra-capillary cells were determined.

Study variables See Table 1.

Analysis All information was stored in Excel and processed with SPSS version 15.0 for Windows. The Fisher exact test was used to identify possible differences by sex, with significance threshold set at $\alpha = 0.05$.

Ethical aspects The study protocol was approved by El Salvador's National Committee for Clinical Research of the Higher Council of Public Health. Written informed consent was obtained from all participants.

RESULTS

Findings by age and sex During a two-month period, histopathological study was performed on 46 biopsies: 36 men (78.3%) and 10 women (21.7%). Mean patient age at time of biopsy was 45.4 years, with 30.6% aged <39 years. The youngest patient, aged 19 years, had severe tubular atrophy, interstitial fibrosis and glomerulosclerosis; his CKD had been diagnosed three years prior to biopsy (Figure 1b).

Table 1: Study variables

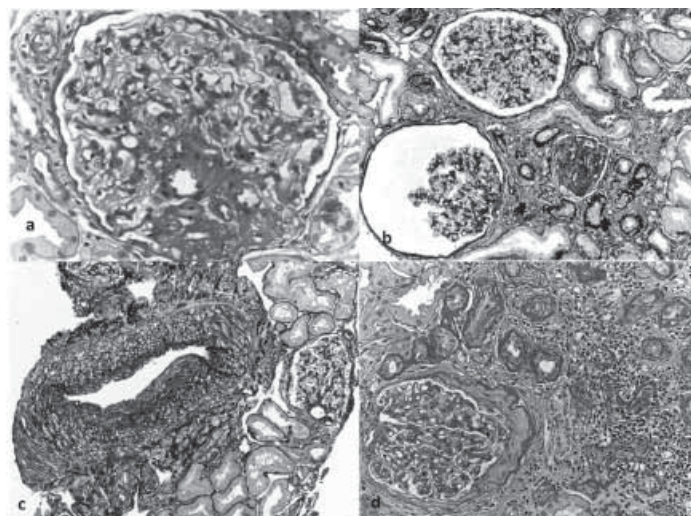
Variable	Definition
Sex	Male, female
Age	≥18 years <60 years
CKD stages per eGFR (mL/min/1.73 m ² , MDRD equation), KDIGO, 2012)[13]	1: ≥90 with markers of renal damage 2: 60–89 with markers of renal damage 3a: 45–59 3b: 30–44 4: 15–29 5: <15
Occupation (Information obtained from patient questionnaire)	Sugarcane cultivation Agricultural, non-sugarcane Non-agricultural
Interstitial fibrosis (% of cortical area)[15]	Absent: ≤5 Mild to moderate: 6–50 Severe: >50
Glomerulosclerosis (% of glomeruli)[15]	Mild: <24.9 Severe: ≥25
Glomerulomegaly (% of glomeruli enlarged)[15]	<10 ≥10
Glomerular tuft collapse[15]	Present/absent
Tubular atrophy (% of cortical area)[13]	Absent Mild to moderate: <25 Severe: ≥25
Mononuclear inflammatory infiltration (% of renal tissue)[15]	Absent or mild: ≤25 Moderate: 26–50
Intimal proliferation[15]	Present/absent
Tunica media thickening	Present/absent
Tunica media vacuolation	Present/absent
Hydropic vacuolation	Present/absent
Hyalinosis of vessel walls[15]	0 No typical lesions 1 hyaline deposits in only one arteriole 2 hyaline deposits in >1 arteriole, no circumferential involvement 3 hyaline deposits with circumferential involvement
Intensity of the IgA, IgG, IgM, C3, C1q, fibrinogen, kappa and lambda light chains (by pathologist's assessment)	Absent Mild Moderate Severe
Location of deposits	Nonspecific Mesangial Subendothelial Subepithelial Intramembranous

KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes
MDRD: Modification of Diet in Renal Disease

Interstitial fibrosis was the main lesion observed in the sample (Figure 2a), and was associated with male sex ($p = 0.025$): 38.9% (14/36) of men had mild to moderate interstitial fibrosis, and 33.3% severe. In contrast, none of the 10 women studied had severe interstitial fibrosis; 3 (30%) had mild to moderate fibrosis; and 7 had <5% (Table 2).

Glomerulosclerosis affecting ≥25% of tissue was present in 58.7% of patients, and was also more frequent among men: 66.7% (24/36) versus 30% (3/10) in women (Table 2). Glomerulomegaly (Figure 2c) of ≥10% of total glomeruli in the biopsy specimen was observed in 22 patients (47.8%), 47.2% (17/36) of men and 30% (3/10) of women (Table 2). Glomerular tuft collapse was found in biopsies from 2 men and 1 woman—all were in CKD stage 3 and none were non-sugarcane agricultural workers.

Figure 1: Histopathology of nephropathy in Salvadoran agricultural communities (optical microscopy images)



- a. Perihilar focal segmental sclerosis lesion in enlarged glomerulus (PAS x 400)
 b. Area of scarring with interstitial fibrosis, tubular atrophy, glomerulo sclerosis in 19 year-old sugarcane worker (silver methenamine x 100)
 c. Artery intimal proliferation in a sugarcane worker (silver methenamine x 100)
 d. Tubular atrophy, mononuclear inflammatory infiltration and glomerulus with basement membrane thickening of Bowman capsule and collagen in the Bowman space in a sugarcane worker in CKD stage 3b (PAS x 200)

PAS: periodic acid Schiff

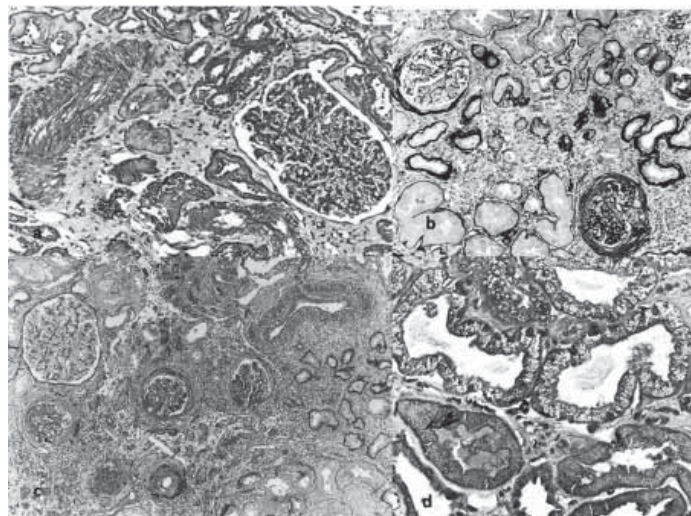
(available in color online at www.medicc.org/mediccreview/lópez.html)

Table 2: Histopathological lesions by sex

Lesion	M n = 36	%	F n = 10	%	p Value	Total n = 46	%
Interstitial fibrosis (proportion of cortical area)							
≤ 5	10	27.8	7	70.0	0.025*	17	37.0
6–50%	14	38.9	3	30.0		17	37.0
>50%	12	33.3	0	0.0		12	26.1
Glomerulosclerosis (proportion of glomeruli)							
<25%	12	33.3	7	70.0	0.067	19	41.3
≥25%	24	66.7	3	30.0		27	58.7
Glomerulomegaly (proportion of glomeruli)							
<10%	19	52.8	5	50.0	0.88	24	52.2
≥10%	17	47.2	5	50.0		22	47.8
Glomerular tuft collapse	2	5.6	1	10.0	0.530	3	6.5
Tubular atrophy(proportion of cortical area)							
0	2	5.6	3	30.0	0.061*	5	10.9
<25%	28	77.8	7	70.0		35	76.1
≥25%	6	16.7	0	0.0		6	13.0
Mononuclear inflammatory infiltration (proportion of renal tissue)							
≤25%	31	86.1	10	100	0.57	41	89.1
26%–50%	5	13.9	0	0.0		5	10.9
Vascular changes							
Intimal proliferation	8	22.2	1	10.0	0.66	9	19.6
Tunica media thickening	22	61.1	2	20.0	0.032	24	52.2
Tunica media vacuolation	17	47.2	3	30.0	0.476	20	43.5

*1st vs. 2nd and 3rd categories combined

Figure 2: Histopathology of nephropathy in Salvadoran agricultural communities (optical microscopy images)



- a. Mild to moderate interstitial fibrosis, enlarged glomerulus in a woman in CKD stage 2 (Masson trichrome x 200)
 b. Area of scarring and interstitial fibrosis, tubular atrophy, glomerulus with thickened basement membrane of Bowman capsule and Bowman space occupied by collagen in woman in CKD stage 3a (silver methenamine x 100)
 c. Extensive area of interstitial fibrosis, tubular atrophy and mononuclear inflammatory infiltration in relation to sclerosed glomeruli in non-sugarcane agricultural worker; enlarged glomerulus (PAS x 200)
 d. Tubules with hydropic vacuolation (trichrome Masson x 400)

PAS: periodic acid Schiff

(available in color online at www.medicc.org/mediccreview/lópez.html)

Mild inflammatory infiltration was present in 89.1% (41/46) of cases. However, no woman had more than mild inflammatory infiltration.

In 43.5% of participants, there was hydropic vacuolation, focal in all instances (Figure 2d). Tunica media vacuolation in blood vessels was observed in 47.2% (17/36) of men and 30% (3/10) of women. Only 19.6% (9/46) had intimal proliferation. Tunica media thickening was present in 61.1% (22/36) of men and 20% (2/10) of women (Table 2).

Findings by CKD stage There were 15 patients in CKD stage 2 and 31 in stage 3, 11 of the latter in stage 3a and 20 in stage 3b (Table 3). Extent of severe interstitial fibrosis (Figure 1d) increased with advancing CKD stage, from 13.3% of the patients in stage 2 to 63.7% in stage 3a and 100% in stage 3b (Table 3). Similarly, the extent of severe glomerulosclerosis increased over advancing stages, from 26.7% in stage 2 to 54.5% in stage 3a and 85.0% in stage 3b (Table 3). Perihilar focal segmental glomerulosclerosis was observed in only one participant (Figure 1a).

Glomerulomegaly (in ≥10% of total glomeruli) was found in 73.3% of stage-2 patients, 36.4% of stage-3a and 35% of stage-3b patients (Table 3).

Forty-one patients (89.1%) had tubular atrophy, which was mild to moderate in 76.1% (35/46) of patients and severe in 13%. All but one (30/31) stage 3 patient had this lesion; in stage 3b, tubular atrophy was severe in 20% (Table 3). (Figure 2b)

Table 3: Histopathological lesions by CKD stage

Lesion	CKD stage							
	2 n = 15	%	3a n = 11	%	3b n = 20	%	Total n = 46	%
Interstitial fibrosis (proportion of cortical area)								
≤5%	13	86.7	4	36.4	0	0	17	37.0
6–50%	2	13.3	5	45.5	10	50.0	17	37.0
>50%	0	0	2	18.2	10	50.0	12	26.1
Glomerulosclerosis (proportion of glomeruli)								
<25%	11	73.3	5	45.5	3	15.0	19	41.3
≥25%	4	26.7	6	54.5	17	85.0	27	58.7
Glomerulomegaly (proportion of glomeruli)								
<10%	4	26.7	7	63.6	13	65.0	24	52.2
≥10%	11	73.3	4	36.4	7	35.0	22	47.8
Glomerular tuft collapse								
	0	0	1	9.1	2	10.0	3	6.5
Tubular atrophy (proportion of cortical area)								
0	4	26.7	0	0	1	5.0	5	10.9
<25%	9	60	11	100.0	15	75.0	35	76.1
≥25%	2	13.3	0	0.0	4	20.0	6	13.0
Mononuclear inflammatory infiltration (proportion of renal tissue)								
≤25%	14	93.3	11	100.0	16	80.0	41	89.1
26%–50%	1	6.7	0	0.0	4	20.0	5	10.9
Vascular changes								
Intimal proliferation	1	6.7	4	36.4	4	20.0	9	19.6
Tunica media thickening	3	20.0	5	45.5	16	80.0	24	52.2
Tunica media vacuolation	3	20.0	3	27.3	14	70.0	20	43.5

CKD: chronic kidney disease

Mononuclear inflammatory infiltration was mild in most patients. Moderate infiltration was most frequent in stage-3b patients, 20% (Table 3).

There was intimal proliferation in 6.7% of participants in stage 2 of the disease; however in stages 3a and 3b it was found in 36.4% and 20% respectively (Table 3).

Thickening of the tunica media in blood vessels was more evident in stage-3b patients (80%); in stage 2, it was observed in only 20%. Similarly, vacuolation of the tunica media was observed in 70% (14/20) of stage-3b patients, versus 20% (3/15) in stage 2 (Table 3).

Findings by occupation Sugarcane workers showed more severe interstitial fibrosis (38.9%) than non-sugarcane agricultural workers (20.8%).

Likewise, they showed more severe tubular atrophy (22.2%) than non-sugarcane agricultural workers (8.3%), and greater mononuclear inflammatory infiltration (22.2% moderate vs. 4.2%) (Table 4).

Glomerulomegaly ≥10% was observed in all three occupational groups, most frequently in those not working in agriculture (3/4, 75%) and least frequently in sugarcane workers (8/18, 44.4%) (Table 4).

Intimal proliferation was only observed in agricultural workers: 29.2% (7/24) of non-sugarcane agricultural workers and 11.1% (2/18) of sugarcane workers (Figure 1c) (Table 4).

Table 4: Histopathological lesions by occupation

Lesion	Occupation							
	C n = 18	%	NC n = 24	%	NA n = 4	%	Total n = 46	%
Interstitial fibrosis (proportion of cortical area)								
≤5%	4	22.2	9	37.5	4	100.0	17	37.0
6–50%	7	38.9	10	41.7	0	0	17	37.0
>50%	7	38.9	5	20.8	0	0.0	12	26.1
Glomerulosclerosis (proportion of glomeruli)								
<25%	8	44.4	8	33.3	3	75.0	19	41.3
≥25%	10	55.6	16	66.7	1	25.0	27	58.7
Glomerulomegaly (proportion of glomeruli)								
<10%	10	55.6	13	54.2	1	25.0	24	52.2
≥10%	8	44.4	11	45.8	3	75.0	22	47.8
Glomerular tuft collapse								
	0	0	3	12.5	0	0.0	3	6.5
Tubular atrophy (proportion of cortical area)								
0	1	5.6	2	8.3	2	50.0	5	10.9
<25%	13	72.2	20	83.3	2	50.0	35	76.1
≥25%	4	22.2	2	8.3	0	0.0	6	13.0
Mononuclear inflammatory infiltration (proportion of renal tissue)								
≤25%	14	77.8	23	95.8	4	100.0	41	89.1
26%–50%	4	22.2	1	4.2	0	0.0	5	10.9
Vascular changes								
Intimal proliferation	2	11.1	7	29.2	0	0.0	9	19.6
Tunica media thickening	10	55.6	14	58.3	0	0.0	24	52.2
Tunica media vacuolation	10	55.6	10	41.7	0	0.0	20	43.5

C: sugarcane worker NC: non-sugarcane agricultural worker NA: non-agricultural

Thickening of the tunica media of extraglomerular blood vessels was similar in sugarcane workers and non-sugarcane agricultural workers (55.6% and 58.3%, respectively). None of the biopsies showed hyalinosis in the walls of extraglomerular blood vessels.

In one patient there was thickening of the basement membrane in glomerular capillaries, with diffuse vacuolation and protrusion of basement membrane material in spikes at some sites. This person had generalized, diffuse IgG deposits of moderate intensity. The diagnosis was early membranous glomerulopathy with severe tubulointerstitial nephritis.

Other None of the biopsies showed endocapillary, extracapillary or mesangial proliferation. Masson's trichrome stain did not show fuchsinophilic deposits in any of the glomerular compartments (subepithelial, subendothelial or membranous), nor did it show fibrinoid necrosis or leukocyte infiltration in the tuft. Immunofluorescence techniques to detect immunoglobulins and complement found nonspecific deposits of IgM (25 patients), C3 (18) and C1q (8) in the glomeruli; 16 patients had no deposits. None of the biopsies showed immunoglobulin deposits in the tubules or interstitium.

DISCUSSION

CKDu was found in Salvadoran agricultural communities, predominantly in male agricultural workers, but also in women and adolescents. Thus, various factors that could contribute to developing the disease were taken into account in the clinical study: extreme poverty, environmental contamination due to misuse of agrochemicals, unsafe working conditions with exposure to high temperatures and toxic substances, in addition to excessive use

of NSAIDs. In this paper, we analyzed histopathological findings in relation only to age, sex, occupation and disease stage. The two most discussed hypotheses concerning the cause of this new disease are chemical nephrotoxicity, and renal tissue ischemia secondary to dehydration and heat stress under harsh working conditions, so it is important to bear these in mind in interpreting the histopathology.[14]

Biopsy findings ruled out a diagnosis of glomerulonephritis due to incompatibility with the pattern and intensity of deposits seen in immunofluorescence studies.[13] Morphology was consistent with tubulointerstitial nephritis, but in different degrees depending on sex, occupation and CKD stage. Interstitial fibrosis was common to most biopsies and was associated with CKD stage. Some women in CKD stage 2 and some men who did not work in agriculture (that is, were not subject to such extreme working conditions) also had interstitial fibrosis, but to a lesser degree.

Wijkstrom studied eight Salvadoran patients, whose kidney biopsies examined at the Karolinska University Hospital showed mild to moderate tubular atrophy and interstitial fibrosis. They also showed generalized glomerulosclerosis in 29%–78% of patients. From this, the authors concluded that the fibrosis was secondary to the glomerular damage.[11] However, since the patients studied (all male) were in advanced stages of CKD, in which there is usually damage to all kidney tissue compartments,[1] these histopathological findings were only to be expected and cannot be used to establish relative order of appearance.

In our research, glomerular damage was found in most patients: even in women and younger patients, independent of occupation.[13] In patients in CKD stage 3, it becomes more evident, explaining the decreased kidney function.

The severe tubulointerstitial damage with areas of tubular atrophy and severe fibrosis observed in the patient diagnosed with incipient membranous glomerulopathy are not seen in early membranous glomerulopathies; therefore, either there are two coexisting diseases or the damage was secondary to some other process (such as cancer or medication). We cannot discount either possibility.[16,17]

Segmental sclerosis observed in one patient was interpreted as the onset of generalized glomerulosclerosis, because of the appearance of nonspecific IgM and C3 deposits on immunofluorescence that suggested generalized sclerosis beginning as a perihilar lesion.[18] Furthermore, there were no clinical or laboratory findings suggesting an initial glomerular insult.

The glomerulopathy observed in the study is due to glomerulosclerosis with nephron loss.[19,20] Compensatory glomerular

hypertrophy is an adaptive mechanism and enlarged glomerular volume leads to development of glomerulosclerosis and high blood pressure.[21,22]

Mononuclear inflammatory infiltration was observed in areas of atrophy and glomerulosclerosis. Chronic pyelonephritis has a similar pathological appearance, but was ruled out due to absence of any clinical, laboratory or imaging history compatible with that diagnosis.[23]

Findings very similar to ours were described for biopsies of 57 CKDu patients in Sri Lanka. Glomerulosclerosis was the most frequent lesion. Although interstitial inflammatory infiltration was absent in 40% of cases, there were only 4 without interstitial fibrosis, suggesting that tubulointerstitial damage is the main pathological event in the CKDu, with glomerulosclerosis occurring secondarily.[10] Other researchers in Sri Lanka have investigated toxic environmental factors as the possible cause of Sri Lankan endemic nephropathy. They found high concentrations of arsenic in urine of CKD patients[24] and high concentrations of cadmium in well water where the patients lived,[25] suggesting these heavy metals as a source of environmental contamination.

Lead is one heavy metal long known to cause damage similar to what we observed. Cramér studied kidney biopsies from patients exposed to lead and found tubular damage and interstitial fibrosis without damage to glomeruli and vasculature.[26] While some of our findings were consistent with longterm exposure to heavy metals, we did not observe nuclear inclusion bodies or any other sign of acute lead poisoning.

This research is the first in the Americas to study the histopathology of a large number of patients in different stages of CKDu. One limitation is lack of ultrastructural study with electron microscopy, which could provide more details to the general description of lesions.

CONCLUSIONS

The most important and striking lesion in the cases studied, interstitial fibrosis, accompanied by glomerular damage (in most biopsies) and classic tubular atrophy, led to the histopathological diagnosis of chronic tubulointerstitial nephritis, since it increased directly with CKD stage. More research is needed to define the fundamental and contributing causes of CKDu, whether toxic environmental or other occupational exposures, chronic ischemia from dehydration, or nephrotoxic medications, all of which are compatible with the histopathological picture we observed and the social and epidemiologic context of the epidemic. Our findings are also consistent with a multifactorial etiology for this disease. 

REFERENCES

1. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1–266.
2. Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, Miller F, Wu L, Moll U, et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 17;104(29):12129–34.
3. Bamias G, Boletis J. Balkan nephropathy: evolution of our knowledge. *Am J Kidney Dis.* 2008 Sep;52(3):606–16.
4. de Jonge H, Vanrenterghem Y. Aristolochic acid: the common culprit of Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Jan;23(1):39–41.
5. Grollman AP, Jelaković B. Role of environmental toxins in endemic (Balkan) nephropathy. October 2006, Zagreb, Croatia. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Nov;18(11):2817–23.
6. Chandrajith R, Nanayakkara S, Itai K, Aturaliya TN, Dissanayake CB, Abeysekera T, et al. Chronic kidney diseases of uncertain etiology (CKDu) in Sri Lanka: geographic distribution and environmental implications. *Environ Geochem Health.* 2011 Jun;33(3):267–78.
7. Torres C, Aragón A, González M, López I, Jakobsson K, Elinder CG, et al. Decreased kidney function of unknown cause in Nicaragua: a community-based survey. *Am J Kidney Dis.* 2010 Mar;55(3):485–96.
8. O'Donnell JK, Tobey M, Weiner DE, Stevens LA, Johnson S, Stringham P, et al. Prevalence of and risk factors for chronic kidney disease in

- rural Nicaragua. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Sep;26(9):2798–805.
9. Orantes CM, Herrera R, Almaguer M, Brizuela EG, Hernández CE, Bayarre H, et al. Chronic kidney disease and associated risk factors in the Bajo Lempa region of El Salvador: Nefrolempa study, 2009. *MEDICC Rev*. 2011 Oct;13(4):14–22.
 10. Nanayakkara S, Komiya T, Ratnatunga N, Senewirathna ST, Harada KH, Hitomi T, et al. Tubulointerstitial damage as the major pathological lesion in endemic chronic kidney disease among farmers in North Central Province of Sri Lanka. *Environ Health Prev Med*. 2012 May;17(3):213–21.
 11. Wijkström J, Leiva R, Elinder CG, Leyva S, Trujillo Z, Trujillo L, et al. Clinical and pathological characterization of Mesoamerican nephropathy: a new kidney disease in Central America. *Am J Kidney Dis*. 2013 Nov;62(5):908–18.
 12. Athuraliya NT, Abeisekera TD, Amerasinghe PH, Kumarasiri R, Bandara P, Karunaratne U, et al. Uncertain etiologies of proteinuric-chronic kidney disease in rural Sri Lanka. *Kidney Int*. 2011 Dec;80(11):1212–21.
 13. Definition and classification of CKD. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl*. 2013 Jan;3(1 Suppl):S5–14.
 14. Herrera R, Orantes CM, Almaguer M, Alfonso P, Bayarre HD, Leiva IM, et al. Clinical characteristics of chronic kidney disease of nontraditional causes in Salvadoran farming communities. *MEDICC Rev*. 2014 Apr;16(2):39–48.
 15. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*. 1999 Feb;55(2):713–23.
 16. Vivette D, D'Agatti, Jennette JC, Silva FG. Non neoplastic of kidney diseases. *Atlas of non tumour pathology*. Washington, D.C: The American Registry of Pathology; 2005. Chapter 7. p. 163.
 17. Nachman PH, Jennette JC, Falk RJ. Primary Glomerular Disease. In: Taal MW, Chertow GM, Marsden PA, Skorecki K, Yu ASL, Brenner BM, editors. *Brenner and Rector's The Kidney*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 1154–61.
 18. Taal MW. Risk Factors and Chronic Kidney Disease. In: Taal MW, Chertow GM, Marsden PA, Skorecki K, Yu ASL, editors. *Brenner & Rector's The Kidney*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2012. p. 1111–7.
 19. Hoy WE, Hughson MD, Bertram JF, Douglas-Denton R, Amann K. Nephron number, hypertension, renal disease and renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Sep;16(9):2557–64.
 20. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med*. 2003 Jan 9;348(2):101–8.
 21. Hoy WE, Hughson MD, Singh GR, Douglas-Denton R, Bertram JF. Reduced nephron number and glomerulomegaly in Australian Aborigines: a group at high risk for renal disease and hypertension. *Kidney Int*. 2006 Jul;70(1):104–10.
 22. Brenner BM, Lawler EV, Mackenzie HS. The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int*. 1996 Jun;49(6):1774–7.
 23. Robins SL, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patología estructural y funcional*. Buenos Aires: Editorial Interamericana; 2006. Chapter 14. p. 529. Spanish.
 24. Jayasumana MACS, Paranagama PA, Amarasinghe MD, Wijewardane KMRC, Dahanayake KS, Fonseka SI, et al. Possible link of chronic arsenic toxicity with chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka. *J Nat Sci Res*. 2013;3(1):64–73.
 25. Wanigasuriya KP, Peiris-John RJ, Wickremasinghe R. Chronic kidney disease of unknown aetiology in Sri Lanka: is cadmium a likely cause? *BMC Nephrol*. 2011 Jul 5;12:32.
 26. Cramér K, Goyer RA, Jagenburg R, Wilson MH. Renal ultrastructural, renal function, and parameters of lead toxicity in workers with different periods of lead exposure. *Br J Ind Med*. 1974 Apr;31(2):113–27.

THE AUTHORS

Laura López-Marín (Corresponding author: laura.lopez@infomed.sld.cu), anatomical pathologist with a master's degree in atherosclerosis. Associate professor, Nephrology Institute, Havana, Cuba.

Yudit Chávez Muñoz, cytopathology technician, Nephrology Institute, Havana, Cuba.

Xenia A. García Ortiz, anatomical pathologist, San Juan de Dios National Hospital, San Miguel, El Salvador.

Walter M. Flores Flores, anatomical pathologist, San Juan de Dios National Hospital, San Miguel, El Salvador.

Yesenia M. García Zamora, cytopathology technician, San Juan de Dios National Hospital, San Miguel, El Salvador.

Raúl Herrera Valdés, nephrologist. Full professor and distinguished researcher, Nephrology Institute, Havana, Cuba.

Miguel Almaguer López, nephrologist. Associate professor and distinguished researcher, Nephrology Institute, Havana, Cuba.

Carlos M. Orantes Navarro, nephrologist. Renal health research coordinator, National Health Institute, Ministry of Health, San Salvador, El Salvador.

Denis Calero Brizuela, family physician, Nephrology Institute, Havana, Cuba.

Héctor D. Bayarre Vea, physician specializing in biostatistics. Full professor, National School of Public Health, Havana, Cuba.

Juan Carlos Amaya Rodríguez, nephrologist, San Juan de Dios National Hospital, San Miguel, El Salvador.

Salvador Magaña Mercado, nephrologist, San Juan de Dios National Hospital, San Miguel, El Salvador.

Paul A. Espinoza Madrid, anatomical pathologist, Rosales National Hospital, San Salvador, El Salvador.

Lisbeth Serpas, anatomical pathologist, Rosales National Hospital, San Salvador, El Salvador.

Submitted: October 30, 2013

Approved for publication: March 28, 2014

Disclosures: None