



GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

***Microscopía electrónica en la enfermedad
hepática metabólica***

***Electron microscopy in metabolic liver
disease***

Autor/a: MARÍA RODRÍGUEZ SUÁREZ

Director/es: EMILIO FÁBREGA GARCÍA
JOSE IGNACIO FORTEA ORMAECHEA

Santander, Junio 2025

INDICE

Siglas.....	2
Resumen	3
Abstract:	4
1. Introducción	5
2. Esteatosis Hepática Metabólica	6
2.1. Terminología.....	6
2.2. Factores de Riesgo.....	8
3. Histología convencional de la esteatosis hepática metabólica	8
4. Microscopía electrónica: fundamentos y técnica.....	10
4.1. Principios de la Microscopia Electrónica	10
4.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido	11
4.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM):	11
4.1.3. Comparación y aplicaciones:	11
5. Microscopía Electrónica en la Esteatosis Hepática	11
6. Limitaciones de la técnica y su interpretación.	15
7. Perspectivas Futuras.....	16
8. Conclusiones	17
9. Bibliografía	18

Siglas

- ALD: Enfermedad hepática alcohólica
- DM2: Diabetes mellitus tipo 2
- IMCs: Inclusiones cristalinas mitocondriales
- MAFLD: Hígado graso asociado a disfunción metabólica
- MASH: Esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica
- MASLD: enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica
- ME: Microscopia Electrónica
- MO: Microscopía óptica
- NAFL: Esteatosis hepática no alcohólica
- NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease
- NASH: Esteatohepatitis no alcohólica
- SAF: Steatosis, Activity, Fibrosis scale
- SEM: Microscopio electrónico de barrido
- TEM: Microscopía electronica de transmisión

Resumen:

La esteatosis hepática, particularmente la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD), constituye la principal causa de hepatopatía crónica a nivel mundial. Su progresión puede derivar en complicaciones graves como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. En los últimos años, la nomenclatura ha evolucionado desde NAFLD a MASLD, eliminando el estigma del término "grasa" y redefiniendo los criterios diagnósticos. A pesar de los avances en métodos diagnósticos no invasivos, la histología se mantiene como el patrón oro para el diagnóstico y la evaluación del grado de afectación hepática. En este contexto, la microscopía electrónica (ME) ha demostrado ser una herramienta valiosa en la investigación de la ultraestructura hepática. La microscopía electrónica de transmisión y la de barrido han permitido caracterizar los cambios ultraestructurales asociados con MASLD y su progresión a esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica. Estudios recientes han utilizado esta técnica para identificar megamitocondrias, inclusiones cristalinas mitocondriales, alteraciones en la autofagia y cambios en la morfología de los lipolisosomas, evidenciando el papel crucial de la disfunción mitocondrial en la patogénesis de la enfermedad. Aunque su uso clínico es limitado, la ME sigue siendo una herramienta esencial para comprender los mecanismos fisiopatológicos de MASLD y desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas en esta enfermedad.

Palabras clave: Enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD); Enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD); microscopía electrónica (ME);

Abstract:

Metabolic liver disease, particularly metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), is the leading cause of chronic liver disease worldwide. Its progression can lead to severe complications such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In recent years, the terminology has evolved from NAFLD to MASLD, removing the stigma associated with the term "fat" and redefining diagnostic criteria. Despite advances in non-invasive diagnostic methods, histology remains the gold standard for diagnosis and assessment of the degree of liver involvement. In this context, electron microscopy has proven to be a valuable tool in the study of liver ultrastructure. Transmission and scanning electron microscopy have enabled the characterization of ultrastructural changes associated with MASLD and its progression to metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. Recent studies have used this technique to identify megamitochondria, mitochondrial crystalline inclusions, autophagy alterations, and changes in the morphology of lipolysosomes, highlighting the crucial role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of the disease. Although its clinical use is limited, electron microscopy remains an essential tool for understanding the pathophysiological mechanisms of MASLD and developing new diagnostic and therapeutic strategies for this condition.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); Metabolic dysfunction–associated steatotic liver disease (MASLD); electron microscope (EM);

1. Introducción

La esteatosis hepática, particularmente la enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica (MASLD, por sus siglas en inglés), representa un problema clínico relevante debido a su elevada prevalencia, que alcanza aproximadamente el 25% de la población mundial.(1) MASLD está estrechamente asociada con el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), afectando hasta el 60-70% de las personas con esta última. Esta condición puede evolucionar hacia formas más graves de enfermedad hepática, como la esteatohepatitis, la cirrosis o el carcinoma hepatocelular, lo que contribuye de forma significativa al aumento de la morbilidad.(2)

Aunque las complicaciones hepáticas son relevantes, la morbilidad cardiovascular constituye la principal causa de muerte en pacientes con MASLD. Este fenómeno se explica, en parte, por el hecho de que el hígado desempeña un papel central en el lipometabolismo y el glicometabolismo. Las alteraciones en estos procesos favorecen la resistencia a la insulina, perpetuando un ciclo de disfunción metabólica que no solo agrava la enfermedad hepática, sino que también incrementa el riesgo de eventos cardiovasculares. Así, se establece una relación bidireccional entre la salud hepática y la cardiovascular.

Dada la alta prevalencia de MASLD y su estrecha relación con enfermedades de alto impacto clínico como la DM2, diversos expertos proponen estrategias de cribado sistemático de fibrosis avanzada en pacientes con factores de riesgo cardiometabólico. Sin embargo, los métodos disponibles actualmente presentan limitaciones tanto en especificidad como en aplicabilidad clínica.

En este contexto, y ante el creciente interés por comprender los mecanismos fisiopatológicos de MASLD, la investigación en este campo se ha intensificado en los últimos años. La microscopía electrónica (ME) ha emergido como una herramienta valiosa en la investigación hepática, gracias a su capacidad para revelar alteraciones ultraestructurales con resolución nanométrica, que de otro modo no son detectables mediante técnicas convencionales. Aunque su aplicación clínica es aún limitada, su utilidad en escenarios específicos, como las enfermedades hepáticas metabólicas, es notable.(3)

Así, la microscopía electrónica de barrido con corte en bloque serial y la microscopía electrónica de transmisión (TEM) permiten reconstrucciones tridimensionales del tejido hepático, aportando información integral sobre la microarquitectura hepática y las interacciones entre orgánulos.(4)

En este sentido, el presente Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo revisar la utilidad de la ME en el estudio de la MASLD, poniendo especial énfasis en sus aplicaciones en investigación y su posible valor clínico.

2. Esteatosis Hepática Metabólica

2.1. Terminología

La terminología empleada para describir la esteatosis hepática metabólica ha evolucionado significativamente en las últimas décadas. Inicialmente, Jürgen Ludwig en 1980 acuñó el término esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), y posteriormente, en 1986 se introdujo la denominación enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD, por sus siglas en inglés), con el fin de describir el espectro histológico que abarca desde la esteatosis simple (NAFL, por sus siglas en inglés,) hasta la esteatohepatitis (NASH, por sus siglas en inglés), en ausencia de consumo de alcohol.

En los últimos años, ha habido un cambio hacia una terminología que refleje mejor la fisiopatología subyacente de la enfermedad y supere las limitaciones del término NAFLD, considerado confuso y estigmatizante por su definición negativa (“no alcohólica”). En 2020, se propuso el término enfermedad hepática grasa asociada a disfunción metabólica (MAFLD, por sus siglas en inglés,) con el objetivo de enfatizar su vínculo con alteraciones metabólicas. Este cambio permitió incluir a pacientes con esteatosis hepática que presentan consumo de alcohol u otras comorbilidades, siempre que cumplieran los criterios diagnósticos establecidos: presencia de esteatosis hepática acompañada de sobrepeso u obesidad, o al menos dos criterios de disfunción metabólica.

En el último consenso internacional, publicado en diciembre de 2023(5), el término enfermedad hepática esteatótica (SLD, por sus siglas en inglés) fue elegido como término general para abarcar las diversas etiologías de la esteatosis (*Figura 1*). El nombre elegido para reemplazar NAFLD fue enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD, por sus siglas en inglés). Este nuevo término fue diseñado para reflejar una comprensión más precisa de la fisiopatología de la enfermedad y su asociación con la disfunción metabólica, al tiempo que evita el estigma asociado al término “grasa” incluido en MAFLD. Asimismo, se eliminó la medición directa de la resistencia a la insulina de los criterios diagnósticos por su complejidad y variabilidad entre laboratorios. El diagnóstico de MASLD se restringe a pacientes con esteatosis hepática y al menos uno de cinco criterios cardiometabólicos: IMC >25 kg/m², glucosa en ayunas >100mg/dL, TA >130/85, triglicéridos >150mg/dL o HDL <40 mg/dL, excluyendo otras causas de esteatosis.(5)

El uso de un único factor de riesgo cardiometabólico como criterio diagnóstico para MASLD ha generado controversia sobre su precisión en términos de sensibilidad y especificidad. Huang H. *et al* sugirieron que este umbral podría ser demasiado permisivo, lo que llevaría a incluir a personas con un pronóstico favorable que no necesitarían una vigilancia intensiva. Para abordar esta problemática, propusieron una nueva categoría llamada MASLD-2, que exige la presencia de al menos dos de los cinco factores de riesgo cardiometabólico, además de la confirmación de esteatosis hepática, para establecer el diagnóstico. Este enfoque pretende estratificar a los pacientes de manera más precisa según su riesgo y necesidades clínicas, aunque será necesario validarlo a través de futuras investigaciones.(6)(7)

En esta misma línea, se ha subrayado la importancia de evaluar con cautela a pacientes con pocos factores metabólicos, ya que el daño hepático podría deberse principalmente al consumo de alcohol, cuyo impacto suele infravalorarse en la práctica clínica. (8)

Las personas con MASLD y esteatohepatitis serán designadas como esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH, por sus siglas en inglés), que sustituye al anterior NASH. Además, se seleccionó una nueva categoría fuera del MASLD, denominada enfermedad hepática relacionada/asociada con el metabolismo y el alcohol (MetALD, por sus siglas en inglés), para describir a quienes presentan MASLD y un consumo perjudicial de alcohol (140–350 g/semana para mujeres y 210–420 g/semana para hombres). Estudios recientes han señalado que la combinación de disfunción metabólica y consumo de alcohol podría tener un efecto sinérgico, acelerando la progresión del daño hepático y justificando una categoría diagnóstica diferenciada. (8)

Otras causas de SLD deben considerarse por separado, como ya se hace en la práctica clínica, dado que presentan fisiopatologías y etiologías específicas. Entre ellas se incluyen las relacionadas con fármacos, enfermedades monogénicas como la enfermedad de Wilson, o causas misceláneas como la desnutrición, entre otras. Esto es particularmente relevante en la población pediátrica, en quienes los defectos metabólicos genéticos raros pueden causar esteatosis y deben ser considerados. Los casos sin parámetros metabólicos ni una causa identificable se clasifican como enfermedad hepática esteatósica criptogénica, aunque es probable que puedan ser reclasificados en el futuro a medida que se profundice en la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad.

Aunque la nueva nomenclatura representa un cambio conceptual importante, no altera los criterios histológicos que definen la actividad o la gravedad de la enfermedad, como los utilizados para diagnosticar esteatohepatitis o estadificar la fibrosis. Se prevé, no obstante, que el uso creciente de herramientas no invasivas permitirá refinar la evaluación de la actividad y la progresión de la enfermedad, lo que podría facilitar en el futuro una clasificación más precisa y clínicamente útil. En conjunto, la nueva terminología y los criterios diagnósticos cuentan con un amplio respaldo internacional, evitan el estigma asociado a la anterior denominación y podrían mejorar la concienciación, la detección y el manejo clínico de los pacientes con SLD.

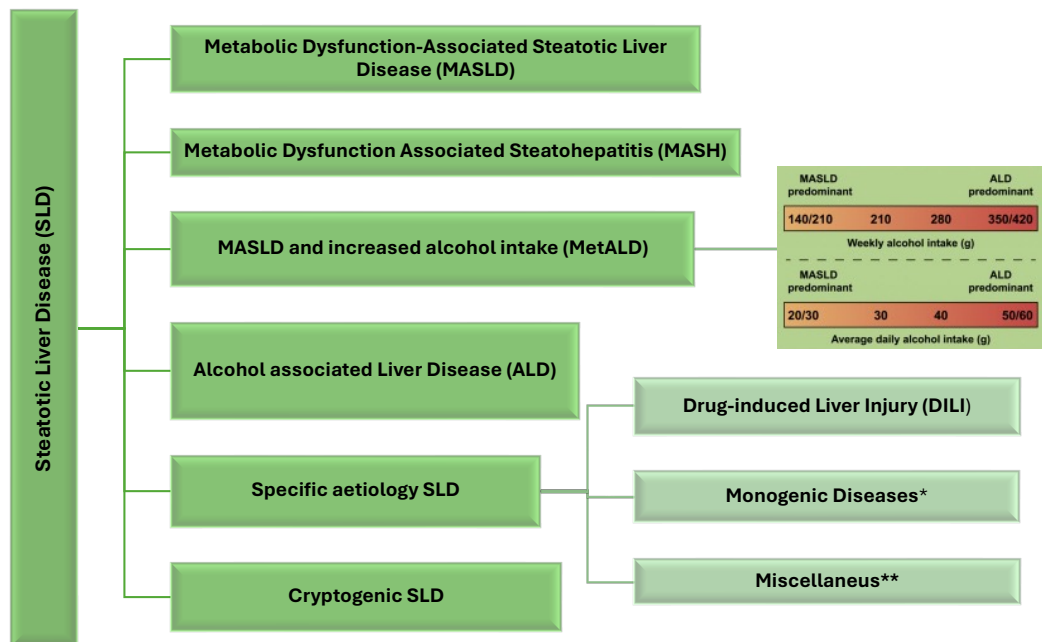


Figura 1: Clasificación actual de la enfermedad hepática esteatósica (SLD) *Ejemplos: deficiencia de lipasa ácida lisosomal (LALD), hipobetalipoproteinemia, errores congénitos del metabolismo. ** Ejemplos: infección por VHC, enfermedad celíaca, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Adaptado de Rinella et al. (5)

2.2. Factores de Riesgo

Los factores de riesgo de MASLD son:

- **Resistencia a la insulina:** conduce a un incremento de la lipólisis en el tejido adiposo, lo que resulta en niveles elevados de ácidos grasos libres que son captados por el hígado y almacenados como triglicéridos.
- **Obesidad central:** se asocia estrechamente con la resistencia a la insulina y con una mayor deposición de grasa visceral.
- **Dislipemia:** particularmente los triglicéridos elevados y el HDL bajo, ya que refleja alteraciones metabólicas subyacentes que favorecen la acumulación de grasa hepática (9)
- **Diabetes mellitus tipo 2.**

3. Histología convencional de la esteatosis hepática metabólica

Actualmente, existen múltiples herramientas no invasivas disponibles o en desarrollo para identificar pacientes con sospecha de MASH, pero ninguna ha cumplido con los estándares de evidencia actuales para su uso. A pesar de la variabilidad interobservador, la histología convencional es el patrón oro para diagnosticar y clasificar la severidad de la esteatosis, así como para distinguir entre la esteatosis simple y formas más avanzadas. Para una evaluación adecuada, se debe de utilizar una aguja de calibre 16G y un longitud de al menos 15-25 mm.(10)

MASLD abarca un espectro de lesiones que van desde la esteatosis hasta un patrón más complejo con daño hepatocelular e inflamación (MASH) en ausencia de consumo de alcohol. Sin embargo, cada vez es más evidente que pueden existir patrones histológicos intermedios. La evaluación histopatológica de muestras de biopsia hepática es fundamental para el diagnóstico de MASLD y MASH especialmente ante la ausencia de pruebas no invasivas suficientemente precisas, ya que una definición exacta de cada grupo es un aspecto clave.

SLD, por definición, es la presencia de al menos un 5% de esteatosis sin suficiente inflamación e injuria hepatocelular para establecer un diagnóstico de MASH. En las etapas iniciales en adultos, la esteatosis se concentra en la región perivenular, zona 3 de los acinos, y es principalmente macrovesicular (*Figura 2*). En contraste, en el MASLD pediátrico, es más común la inflamación portal localizada en la zona 1.(11)

Cuando además de la esteatosis se identifican inflamación lobulillar y degeneración balonizante de los hepatocitos, la lesión se define generalmente como MASH. La evaluación del estadio de fibrosis es incluso más relevante que la necroinflamación, ya que es el principal factor pronóstico de esta enfermedad.

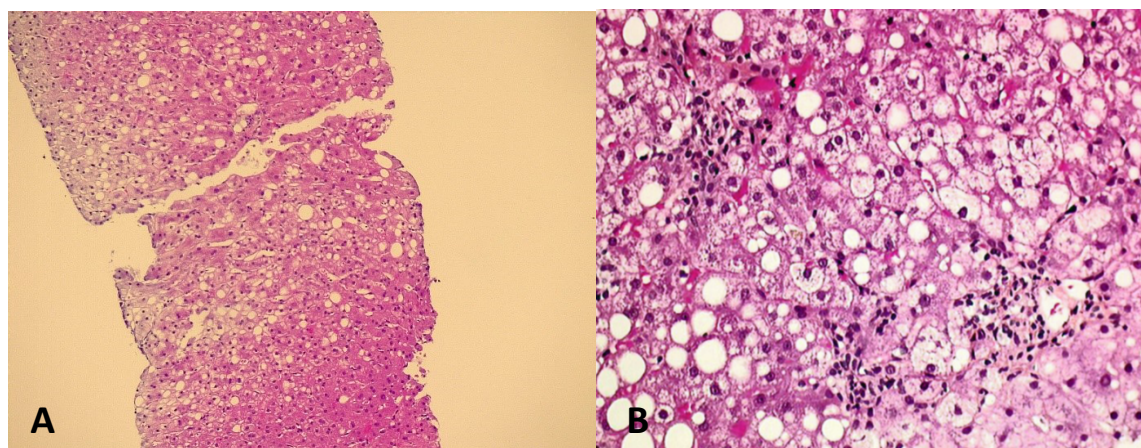


Figura. 2: Muestras en Hematoxilina Eosina. A (x10): MASLD con esteatosis macrovesicular con patrón de distribución en zona 3. (x10) B: patrón MASH con hepatocitos balonizados, focos de inflamación y esteatosis

Dado que la biopsia hepática continúa siendo la herramienta de referencia para el diagnóstico y la evaluación de la severidad en MASLD y MASH, resulta esencial contar con sistemas estandarizados que permitan interpretar de forma objetiva y reproducible los hallazgos histológicos. Para ello, se han desarrollado diversas escalas semicuantitativas que valoran la actividad inflamatoria, el grado de esteatosis y la progresión de la fibrosis.

Entre los sistemas más utilizados se encuentran el NAFLD Activity Score (NAS), la escala SAF (Steatosis, Activity, Fibrosis) y la clasificación de fibrosis del NASH Clinical Research Network (NASH CRN). Cada uno aporta información específica y complementaria sobre la lesión hepática, por lo que es importante especificar cuál ha sido empleado en cada caso y reportar los componentes por separado.

Estos sistemas se resumen a continuación en la Tabla 1, que presenta sus principales características, componentes evaluados y criterios de puntuación:

NAS	Medida validada y comúnmente utilizada para evaluar la actividad de la enfermedad en secciones de biopsia hepática. El NAS se basa en tres componentes evaluados de manera semicuantitativa: - Esteatosis: evalúa el grado de infiltración grasa; de 0 (<5%) a 3 (>66%) - Inflamación lobulillar: número de focos inflamatorios por campo de 200 aumentos; de 0 (sin focos) a 3 (>4 focos) - Balonización hepatocelular: de 0 (ninguna) a 2 (muchas células balonizadas) Un aumento en el NAS, mayor o igual a 5 se correlación con NASH y está estrechamente relacionado con la progresión de la fibrosis. Por el contrario, un NAS de <3 descarta el diagnóstico de NASH.(12)
SAF	Evalúa por separado: - Grado de esteatosis (S0 a S3) - Grado de actividad (A0 a A4, sumando los grados de degeneración balonizante e inflamación lobulillar, ambos de 0 a 2) - Estadio de fibrosis (F0 a F4).(13) Dado que existen diferencias en cómo se puntúa la actividad de la enfermedad, se recomienda especificar el enfoque utilizado para llegar al diagnóstico y reportar la puntuación de severidad de forma separada.
NASH CRN	Escala que a lo evaluado en la escala NAS, suma la fibrosis hepática, asignando una puntuación de 0-4 basada en la presencia y severidad de la fibrosis: - 0: nada - 1: leve (perisinusoidal o periportal) - 2: moderada (perisinusoidal y portal/periportal) - 3: grave (puentes de fibrosis) - 4: cirrosis El sistema de estadificación tiene en cuenta tanto la ubicación como la cantidad de deposición de matriz y remodelación vascular parenquimatosa. (11)

Tabla 1. Sistemas de puntuación de evaluación histológica: la escala NAS (NAFLD activity score) y los sistemas SAF (esteatosis, actividad y fibrosis), NASH Clinical Research Network (NASH CRN),

4. Microscopía electrónica: fundamentos y técnica

4.1. Principios de la Microscopia Electrónica

La ME es una técnica que utiliza un haz de electrones para crear una imagen de una muestra. Ofrece una resolución mucho mayor que la microscopía óptica (MO), lo que permite visualizar estructuras a escala nanométrica. Existen diversas modalidades de ME como la Microscopía Electrónica de Barrido (**SEM**) y la Microscopía Electrónica de Transmisión (**TEM**), dos técnicas con metodologías y aplicaciones distintas.

4.1.1. Microscopía Electrónica de Barrido

La SEM consiste en escanear un haz de electrones enfocado sobre la superficie de una muestra y detectar los electrones secundarios o retrodispersados emitidos para formar una imagen. Se utiliza principalmente para analizar la topografía superficial y la composición. Proporciona una gran profundidad de campo y puede capturar imágenes de áreas extensas con alta resolución. Los avances recientes incluyen técnicas de volumen SEM como el SEM de corte en bloque serial (**SBEM**) y el SEM de haz de iones focalizado (**FIB-SEM**), que permiten la reconstrucción tridimensional de tejidos biológicos. (14,15)

4.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión:

La TEM consiste en transmitir un haz de electrones a través de una muestra ultrafina y detectar los electrones que la atraviesan para formar una imagen. Se utiliza para el análisis detallado de estructuras internas a escala atómica o molecular. Proporciona una resolución más alta que la SEM, permitiendo la visualización de detalles estructurales finos. Técnicas como la TEM de barrido (**STEM**) amplían las capacidades de esta modalidad al ofrecer diferentes contrastes de imagen y modalidades adicionales como mapeo elemental.(16)

4.1.3. Comparación y aplicaciones:

Ambas técnicas tienen ventajas y limitaciones únicas. La SEM es ventajosa para imágenes de superficie y reconstrucciones tridimensionales, mientras que la TEM sobresale en el análisis de estructuras internas con alta resolución. La elección entre SEM y TEM depende de los requisitos específicos del estudio, como la necesidad de imágenes superficiales o internas y la resolución requerida.

5. Microscopía Electrónica en la Esteatosis Hepática

La TEM comenzó a aplicarse en la investigación biomédica para analizar detalles ultraestructurales de tejidos y órganos, incluido el hígado, en los años 50 y 60. Pero fue a partir de los 90 cuando empezó a aplicarse más ampliamente para diferenciar entre condiciones hepáticas como la esteatosis simple y la esteatohepatitis.

La Tabla 2 resume los principales estudios que han utilizado ME para analizar los cambios ultraestructurales en la SLD, incluyendo formas progresivas como MASH. En estos trabajos se han documentado alteraciones morfológicas relevantes en mitocondrias, retículo endoplásmico, gotas lipídicas, lisosomas, células endoteliales sinusoidales y estructuras asociadas a la autofagia, lo que refuerza el valor de esta técnica en la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad.

ESTUDIO	MÉTODO	HALLAZGOS
Caldwell et al. 1999 (17)	ME para el evaluar la presencia de inclusiones cristalinas mitocondriales (IMCs) en 26 pacientes; 10 NASH, 7 ALD y 9 con otras patologías hepáticas.	Se observaron IMC lineales en 8 de 10 pacientes con NASH frente a 1 de 7 con ALD y 2 de 9 con otras enfermedades, lo que podría reflejar un daño o adaptación en la patogénesis de la enfermedad.
Caldwell et al. 2009 (18)	Estudio de IMCs mediante TEM.	IMCs son estructuras dinámicas e inestables. La detección disminuye con Tª de fijación más bajas, lo que refuerza su naturaleza dinámica. Se especula que estas transiciones son causadas por cambios microambientales mitocondriales y podrían abrir nuevas vías terapéuticas, especialmente relacionadas con la modificación dietética de los lípidos mitocondriales. <i>Fig 2.</i>
Caldwell et al. 2010 (19)	Estudio de la balonización hepatocelular en 10 pacientes con NASH mediante MO (H&E y anti K18) y TEM	Relación entre la degeneración balonizante celular, la acumulación de gotas lipídicas, dilatación del retículo endoplásmico y el daño al citoesqueleto en la NASH.
Ahishali et al. 2010 (20)	Evaluación por ME ultraestructural de forma cuantitativa y semicuantitativas de 23 pacientes; 10 con NAFL y 13 con NASH	No se objetivaron diferencias ultraestructurales significativas entre pacientes con NASH y NAFL, lo que sugiere que pacientes con NAFL pueden evolucionar a fibrosis y cirrosis como NASH
Jayakumar et al. 2011 (21)	Análisis ultraestructural del hepatocito por ME en NAFLD and NASH	Describe megamitocondrias, tres tipos de cuerpos de Mallory-Denk basándose en la organización de sus filamentos, gotas lipídicas de pequeño a mediano tamaño y dilatación del retículo endoplásmico en NASH.
Iancu et al. 2013 (22)	Análisis por ME ultraestructural de 12 biopsias entre 7-18años; 7 con NASH y 5 con NAFLD	Clasificó los liposlisosomas en monolocular (tipo I), multilocular (tipo2) y gigante multilocular (tipo III) <i>Fig.3</i>
Lotowska et al. 2014 (23)	Análisis ultraestructural mitocondrial de hepatocitos de 10 biopsias con NASH pediátrico (2-14años)	Una vez más se hallan megamitocondrias, pérdida de crestas mitocondriales y la presencia de IMCs lineales dentro de la matriz.
Fukuo et al. 2014 (24)	Estudio mediante TEM de biopsias de pacientes con: hepatitis B {n=16}, hepatitis C {n=20}, NAFLD{n=22}, cirrosis biliar primaria {n=23}, y grupo control {n=14}.	Se demostró la correlación entre la función autofágica y la expresión de catepsinas en el hígado de pacientes con NAFLD. La disminución de expresión hepática de catepsinas y la inflamación hepática se correlacionan con la disfunción autofágica en el NAFLD no presentes en el resto de muestras.
Shami et al. 2021 (25)	Estudio de 4 pacientes con NAFLD con enfoque multimodal con array tomography y tomografía electrónica de transmisión (TET) de la estructura mitocondrial.	Se revelaron alteraciones asociadas con la función de las megamitocondrias, incluyendo una reducción significativa en la relación superficie-volumen y la desorganización de las membranas mitocondriales internas, lo que indica una función deteriorada. Finalmente, la TET reveló la estructura tridimensional de las IMCs, como inclusiones filamentosas en forma de varilla distribuidas a lo largo de la matriz mitocondrial y el espacio intercristal.
Verhaegh et al. 2021 (3)	Estudio de los cambios ultraestructurales en las células endoteliales sinusoidales hepáticas en biopsias de 37 pacientes con NAFLD	Encontraron que la defenestración era más común en muestras con NAFLD en comparación con aquellas con NASH, lo que sugiere un mecanismo protector para manejar el exceso de lípidos con sustancias tóxicas y así no desarrollar NASH.

Tabla 2. Estudios relevantes en cuanto a la ME en el estudio de MASLD

A partir de los datos recopilados, es posible identificar distintos patrones de daño subcelular según el compartimento afectado:

1) Alteraciones mitocondriales

Las mitocondrias son uno de los orgánulos más consistentemente alterados en MASLD y, especialmente, en MASH. Varios estudios (17,18,21,23,25,26) describen megamitocondrias, pérdida o rarefacción de crestas, y en particular, la presencia de inclusiones cristalinas mitocondriales (IMCs). Estas IMCs, de apariencia lineal o filiforme, se distribuyen en la matriz mitocondrial y el espacio intercristal, y podrían reflejar una respuesta adaptativa al estrés oxidativo persistente o a cambios en la composición lipídica de las membranas mitocondriales. La Figura 3 muestra ejemplos característicos de estos cristales bajo TEM.

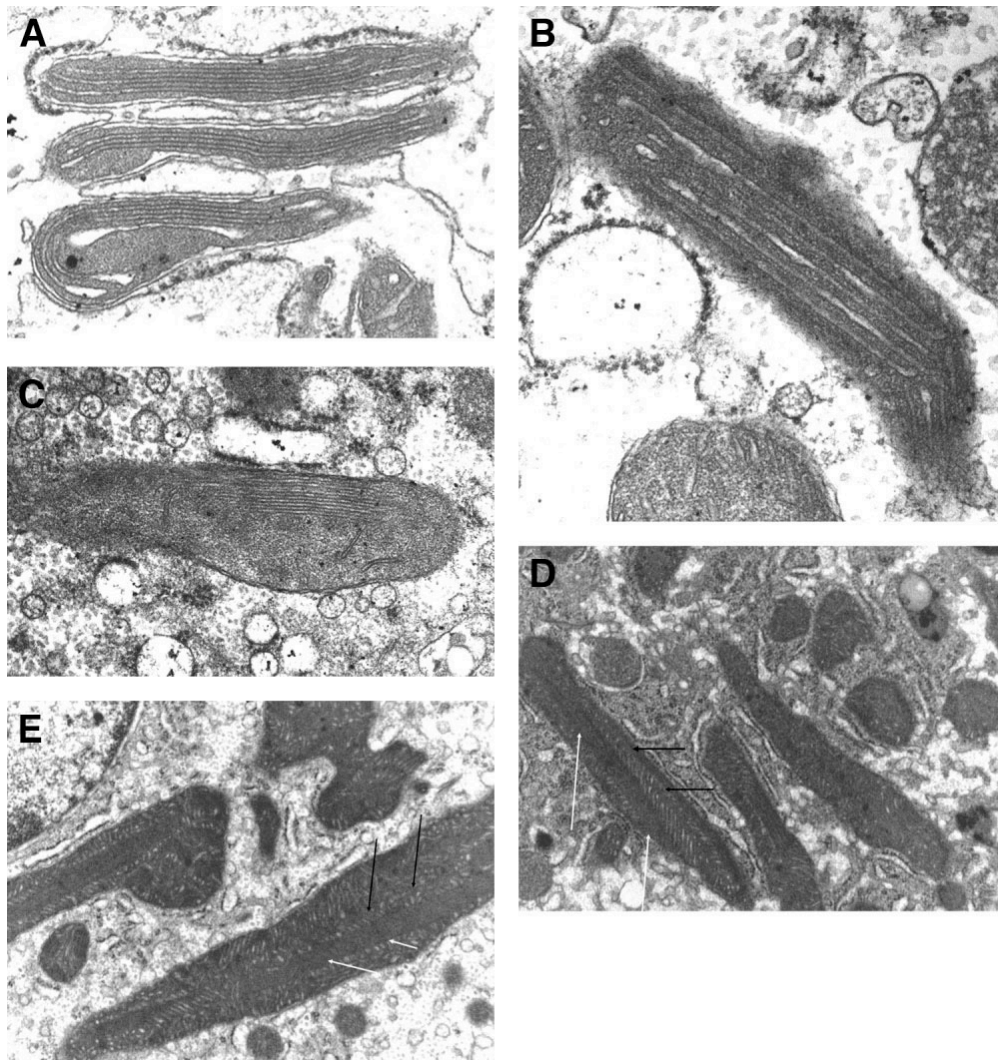


Figura 3. Apariencia de los cristales intramitocondriales (IMCs) en NASH humana bajo microscopía electrónica de transmisión (TEM). (A-C) Cristales mitocondriales en forma longitudinal y su relación con las crestas mitocondriales. (D, E) Apariencia de mitocondrias con cristales al aumento utilizado para la morfometría cuantitativa (x10,000). Las flechas negras indican cristales lineales; las flechas blancas indican las crestas mitocondriales. (18)

2) Cambios en lisosomas y autofagia

Iancu *et al.* describieron diferentes tipos de lipolisosomas en biopsias hepáticas de pacientes con NASH, clasificados como tipo I (monolocular), tipo II (multilocular) y tipo III (gigante multilocular). Estos hallazgos, representados en la Figura 4, sugieren alteraciones en los procesos de degradación intracelular y acúmulo de materiales no digeridos como lipofuscina, lo que puede contribuir a la disfunción hepatocelular. (22)

Adicionalmente, Fukuo *et al.* demostraron una correlación entre disfunción autofágica y la disminución de catepsinas hepáticas en pacientes con NAFLD, hallazgos que no se observaron en otras hepatopatías, lo que subraya un mecanismo patogénico diferencial. (24)

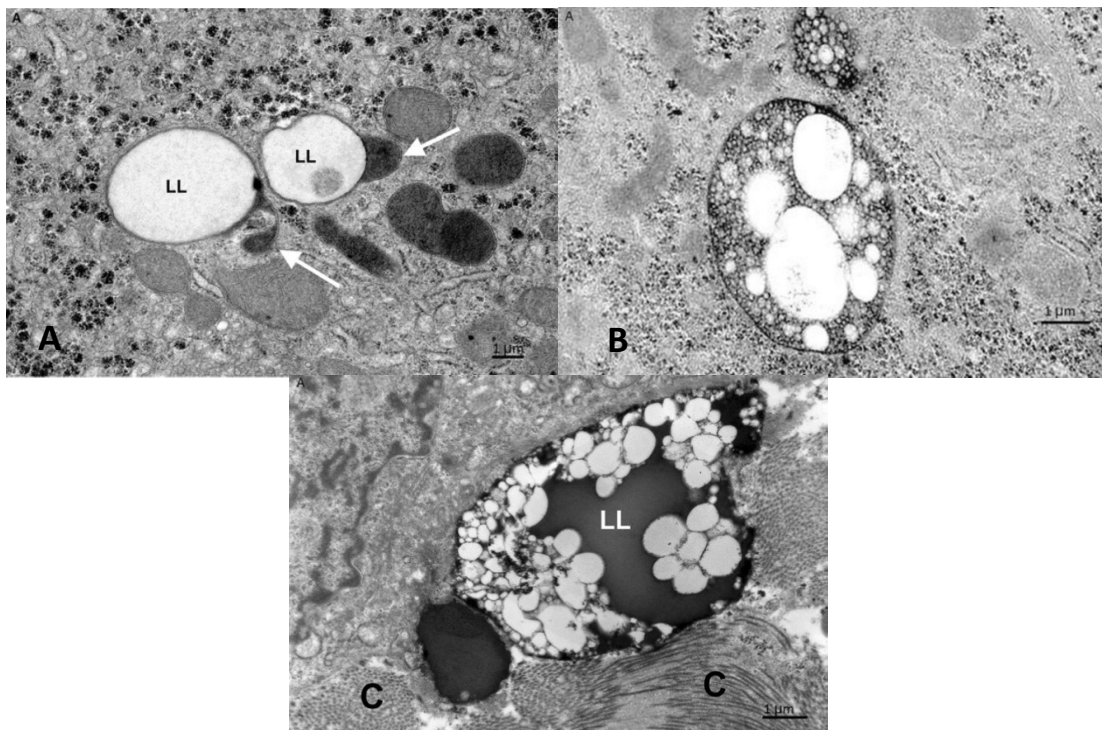


Figura 4. Ejemplos en microscopia electrónica de los diferentes tipos de lipolisosomas. (A) Lipolisosomas tipo I, rodeados por una estructura electrodensa similar a la lipofuscina (flechas). (B) Lipolisosoma tipo II (C) lipolisosoma tipo III rodeado por acúmulos de lipofuscina y fibras de colágeno. Tomado de Iancu TC *et al.* (22)

3) Retículo endoplásmico y balonización

El estudio de Caldwell (2010) estableció una relación entre la degeneración balonizante de los hepatocitos y alteraciones en el citoesqueleto, el retículo endoplásmico y las gotas lipídicas. Estas modificaciones podrían ser consecuencia de estrés del retículo y alteración en la homeostasis proteica, características típicas de MASH. (19)

4) Endotelio sinusoidal hepático

Verhaegh et al. (2021) evaluaron el endotelio de las células sinusoidales hepáticas, encontrando defenestración más marcada en pacientes con NAFL que con NASH, lo que podría representar una respuesta adaptativa temprana para limitar el daño asociado a la acumulación lipídica. (3)

Estos estudios confirman que la ME no solo permite visualizar alteraciones morfológicas a una escala que escapa a la microscopía convencional, sino que también proporciona claves sobre la progresión patológica de MASLD y sus posibles puntos de intervención terapéutica. La identificación de cambios ultraestructurales específicos puede ser útil tanto en la investigación clínica como en la futura definición de biomarcadores tisulares.

6. Limitaciones de la técnica y su interpretación.

La preparación del tejido hepático para la ME, que incluye fijación, inclusión, corte y tinción, es técnicamente exigente y consume tiempo. Además, este proceso puede introducir artefactos que complican la interpretación de las características ultraestructurales

Uno de los problemas más frecuentes se relaciona con la fijación inadecuada de las gotas lipídicas, ya que estas están compuestas principalmente por ésteres lipídicos, los cuales no reaccionan bien con los fijadores aldehídicos comúnmente usados en la ME. Esto puede llevar a una mala preservación y visualización de las gotas. (27)

Aunque la ME puede proporcionar información ultraestructural detallada, su utilidad diagnóstica en MASLD sigue siendo limitada. Por ejemplo, distinguir entre MASLD y MASH solo a partir de características ultraestructurales es complicado, ya que ambas condiciones comparten características ultraestructurales similares.

Además, la ME requiere muestras de tejido pequeñas (1-2 mm) que deben ser procesadas de manera específica y con un protocolo estricto de fijación inmediata, lo que representa una limitación logística cuando la disponibilidad de tejido es reducida o el procedimiento no está planificado con antelación.

A esto se suma la necesidad de equipamiento especializado, infraestructura adecuada y personal con experiencia en ultraestructura hepática, ya que la interpretación de las imágenes requiere conocimientos avanzados para distinguir hallazgos reales de artefactos.

En resumen, aunque la ME permite detectar alteraciones ultraestructurales relevantes en MASLD, su uso en la práctica clínica rutinaria se ve limitado por la complejidad del procesamiento tisular, la presencia de artefactos, la baja

disponibilidad de tejido, la necesidad de experiencia especializada y su valor diagnóstico relativo en comparación con otros métodos.(21)

7. Perspectivas Futuras

Las técnicas emergentes para el diagnóstico de MASLD están evolucionando rápidamente, con varias metodologías avanzadas que muestran un gran potencial cuando se combinan con la ME tradicional.

- **Microscopía de Dispersión Raman Estimulada Hiperespectral (SRS):** Esta técnica permite medir de manera cuantitativa la composición hepática, incluyendo proteínas, ADN y contenido lipídico, sin necesidad de marcadores exógenos. Es especialmente sensible para detectar esteatosis en etapas tempranas en cuestión de minutos, proporcionando una evaluación rápida y cuantitativa de la esteatosis hepática y las vías metabólicas implicadas
- **Proteómica Nanofluídica:** este método mide cuantitativamente las perturbaciones en los perfiles de modificaciones postraduccionales de proteínas hepáticas selectivas, identificando anomalías en procesos celulares como la regulación del ciclo celular, la señalización PI3K/Akt/mTOR, la autofagia, la cetogénesis y el transporte de ácidos grasos. Ofrece un análisis integral de los cambios moleculares asociados con MASLD. (28)
- **Espectrometría de Masas por Análisis de Superficie de Extracción Líquida (LESA-MS):** esta técnica extrae lípidos directamente de la superficie de cortes de tejido hepático y los analiza mediante espectrometría de masas de alta resolución. LESA-MS permite discriminar entre tejido hepático sano, esteatosis simple y MASH, basándose en perfiles lipídicos característicos, ofreciendo una herramienta diagnóstica rápida y mínimamente invasiva. (29)
- **Microscopía de Dispersión Raman Anti-Stokes Coherente Multimodal (CARS):** la microscopía CARS es altamente sensible para detectar esteatosis microvesicular y proporciona datos cuantitativos sobre el contenido lipídico hepático, el tamaño de las gotas lipídicas y el grado de insaturación de los lípidos. Este método permite una caracterización detallada del tejido hepático sin necesidad de tinción ni marcadores. (30)

Estas técnicas avanzadas, cuando se emplean junto con métodos tradicionales como la ME, ofrecen una evaluación más integral y rápida de MASLD. Su aplicación actual se orienta principalmente a la investigación, facilitando la identificación de biomarcadores, la caracterización ultraestructural de la enfermedad y el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas. Prometen transformar el enfoque diagnóstico en el futuro al proporcionar herramientas más precisas, rápidas y adaptadas a una evaluación más eficiente del tejido hepático, con aplicaciones prometedoras en investigación traslacional.

8. Conclusiones

MASLD representa un desafío creciente en la práctica clínica debido a su alta prevalencia y a su estrecha asociación con el síndrome metabólico y la DM2. La evolución reciente en su terminología refleja una mejor comprensión de su fisiopatología, aunque persisten debates sobre los criterios diagnósticos más adecuados.

Desde el punto de vista diagnóstico, la histología hepática sigue siendo el patrón oro para diagnosticar y evaluar la severidad de la enfermedad, a pesar de sus limitaciones. Paralelamente, los avances en técnicas de imagen y en biomarcadores no invasivos podrían mejorar en el futuro la detección temprana y la estratificación del riesgo.

La ME ha permitido describir con mayor detalle las alteraciones ultraestructurales del hígado en MASLD y sus diferentes estadios, proporcionando información clave sobre la afectación mitocondrial, el daño al citoesqueleto y la disfunción endotelial. Hallazgos como la presencia de IMCs, las megamitocondrias, los cambios en los lipolisosomas y la disfunción del retículo endoplásmico y del endotelio sinusoidal han contribuido a esclarecer mecanismos patogénicos que podrían servir como futuras dianas terapéuticas. El uso combinado de técnicas avanzadas de ME, como la TEM y la reconstrucción tridimensional, ofrece nuevas perspectivas sobre la progresión de la enfermedad. Sin embargo, su implementación en la práctica clínica aún es limitada y requiere estudios adicionales para validar su utilidad diagnóstica y pronóstica.

En conclusión, la caracterización ultraestructural de la MASLD mediante ME aporta información valiosa sobre la fisiopatología de la enfermedad y su progresión. Combinada con nuevas herramientas moleculares, esta aproximación puede facilitar la identificación de mecanismos patogénicos relevantes, la exploración de dianas terapéuticas y el desarrollo de biomarcadores útiles en la investigación traslacional.

9. Bibliografia

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016 Jul;64(1):73–84.
2. Qadri S, Yki-Järvinen H. Surveillance of the liver in type 2 diabetes: important but unfeasible? *Diabetologia*. 2024 Jun;67(6):961–73.
3. Verhaegh P, Wisse E, de Munck T, Greve JW, Verheij J, Riedl R, et al. Electron microscopic observations in perfusion-fixed human non-alcoholic fatty liver disease biopsies. *Pathology*. 2021 Feb;53(2):220–8.
4. Shami GJ, Cheng D, Huynh M, Vreuls C, Wisse E, Braet F. 3-D EM exploration of the hepatic microarchitecture - lessons learned from large-volume in situ serial sectioning. *Sci Rep*. 2016 Nov;6:36744.
5. Rinella ME, Lazarus J V, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Ann Hepatol*. 2024;29(1):101133.
6. Huang H-K, Li Y-M, Xu C-F. Pre-MASLD: Should it be defined separately? Vol. 23, *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. Singapore; 2024. p. 1–3.
7. Chen L, Tao X, Zeng M, Mi Y, Xu L. Clinical and histological features under different nomenclatures of fatty liver disease: NAFLD, MAFLD, MASLD and MetALD. Vol. 80, *Journal of hepatology*. Netherlands; 2024. p. e64–6.
8. Arab JP, Díaz LA, Rehm J, Im G, Arrese M, Kamath PS, et al. Metabolic dysfunction and alcohol-related liver disease (MetALD): Position statement by an expert panel on alcohol-related liver disease. *J Hepatol*. 2025 Apr;82(4):744–56.
9. Semmler G, Balcar L, Wernly S, Völkerer A, Semmler L, Hauptmann L, et al. Insulin resistance and central obesity determine hepatic steatosis and explain cardiovascular risk in steatotic liver disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1244405.
10. Bedossa P. Histological Assessment of NAFLD. *Dig Dis Sci*. 2016 May;61(5):1348–55.
11. Brunt EM, Kleiner DE, Carpenter DH, Rinella M, Harrison SA, Loomba R, et al. NAFLD: Reporting Histologic Findings in Clinical Practice. *Hepatology*. 2021 May;73(5):2028–38.
12. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun;41(6):1313–21.
13. Bedossa P, Poitou C, Veyrie N, Bouillot J-L, Basdevant A, Paradis V, et al. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology*. 2012 Nov;56(5):1751–9.
14. Laws R, Steel DH, Rajan N. Research Techniques Made Simple: Volume Scanning Electron Microscopy. *J Invest Dermatol*. 2022 Feb;142(2):265–271.e1.
15. Titze B, Genoud C. Volume scanning electron microscopy for imaging biological ultrastructure. *Biol cell*. 2016 Nov;108(11):307–23.
16. Franken LE, Grünewald K, Boekema EJ, Stuart MCA. A Technical Introduction to Transmission Electron Microscopy for Soft-Matter:

- Imaging, Possibilities, Choices, and Technical Developments. *Small*. 2020 Apr;16(14):e1906198.
17. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 1999 Sep;31(3):430–4.
 18. Caldwell SH, de Freitas LAR, Park SH, Moreno ML V, Redick JA, Davis CA, et al. Intramitochondrial crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009 Jun;49(6):1888–95.
 19. Caldwell S, Ikura Y, Dias D, Isomoto K, Yabu A, Moskaluk C, et al. Hepatocellular ballooning in NASH. *J Hepatol*. 2010 Oct;53(4):719–23.
 20. Ahishali E, Demir K, Ahishali B, Akyuz F, Pinarbasi B, Poturoglu S, et al. Electron microscopic findings in non-alcoholic fatty liver disease: is there a difference between hepatosteatosis and steatohepatitis? *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Mar;25(3):619–26.
 21. Jayakumar S, Guillot S, Argo C, Redick J, Caldwell S. Ultrastructural findings in human nonalcoholic steatohepatitis. Vol. 5, Expert review of gastroenterology & hepatology. England; 2011. p. 141–5.
 22. Iancu TC, Manov I, Shaoul R, Haimi M, Lerner A. What's in a name?-"Lipolysosome": ultrastructural features of a lipid-containing organelle. *Ultrastruct Pathol*. 2013 Oct;37(5):293–303.
 23. Lotowska JM, Sobaniec-Lotowska ME, Bockowska SB, Lebensztejn DM. Pediatric non-alcoholic steatohepatitis: the first report on the ultrastructure of hepatocyte mitochondria. *World J Gastroenterol*. 2014 Apr;20(15):4335–40.
 24. Fukuo Y, Yamashina S, Sonoue H, Arakawa A, Nakadera E, Aoyama T, et al. Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2014 Sep;44(9):1026–36.
 25. Shami GJ, Cheng D, Verhaegh P, Koek G, Wisse E, Braet F. Three-dimensional ultrastructure of giant mitochondria in human non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep*. 2021 Feb;11(1):3319.
 26. Sarabhai T, Kahl S, Gancheva S, Mastrototaro L, Dewidar B, Pesta D, et al. Loss of mitochondrial adaptation associates with deterioration of mitochondrial turnover and structure in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease. *Metabolism*. 2024 Feb;151:155762.
 27. Fujimoto T, Ohsaki Y, Suzuki M, Cheng J. Imaging lipid droplets by electron microscopy. *Methods Cell Biol*. 2013;116:227–51.
 28. Urasaki Y, Zhang C, Cheng J-X, Le TT. Quantitative Assessment of Liver Steatosis and Affected Pathways with Molecular Imaging and Proteomic Profiling. *Sci Rep*. 2018 Feb;8(1):3606.
 29. Hall Z, Chu Y, Griffin JL. Liquid Extraction Surface Analysis Mass Spectrometry Method for Identifying the Presence and Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Anal Chem*. 2017 May;89(9):5161–70.
 30. Le TT, Ziemba A, Urasaki Y, Brotman S, Pizzorno G. Label-free evaluation of hepatic microvesicular steatosis with multimodal coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *PLoS One*. 2012;7(11):e51092.