

ULTRA-ESTRUTURA DO RIM NA DEFICIÊNCIA DE COLINA EXPERIMENTAL

ROBERTO S. COSTA, MARCOS A. ROSSI

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

RESUMO

Tem sido postulado como mecanismo patogênico básico da degeneração hemorrágica dos rins na deficiência de colina, um distúrbio circulatório renal causado por um desequilíbrio entre catecolaminas vaso-constritoras e um vaso-dilatador do tipo acetilcolina, devido a uma diminuição da acetilcolina tecidual. Trabalhos anteriores em nossos laboratórios foram realizados para se estimar os níveis teciduais renais de catecolaminas (noradrenalina) e acetilcolina em ratos controles suplementados com colina e ratos deficientes em colina. O nível de acetilcolina renal não foi diferente entre animais controles e deficientes em colina. Por outro lado, animais deficientes em colina apresentaram valores teciduais renais de catecolaminas bem maiores que os animais controles. Como o aumento das catecolaminas precedeu o aparecimento da lesão renal sugerimos que o predomínio do sistema simpático sobre o parasimpático poderia desempenhar um papel patogênico importante na lesão renal na deficiência de colina. Trabalhos posteriores realizados também em nossos laboratórios mostraram que a administração de agentes bloqueadores adrenérgicos (alfa-metil-Dopa e reserpina) preveniram o desenvolvimento da lesão renal na deficiência de colina. No presente trabalho, planejamos estudar a evolução da lesão renal em nível ultra-estrutural. Alterações patológicas importantes dos capilares peri-tubulares associadas a alterações degenerativas e necróticas do epitélio tubular, de natureza isquêmica, foram observadas.

SUMMARY

Ultrastructure of the kidney in experimental choline deficiency

A disturbed renal circulation due to an imbalance between vasoconstrictor catecholamines and a vasodilator such as acetylcholine, caused by a decrease in acetylcholine, has been postulated as the basic mechanism of hemorrhagic degeneration of the kidneys in choline deficiency. In previous works from our laboratory we have shown a marked increase in the levels of renal catecholamines in choline deficient rats in comparison to choline supplemented animals, while the content of acetylcholine remained unchanged. Since the changes in tissue catecholamines occurred before there were kidney lesions, we have suggested that an autonomic imbalance, due to an excess of catecholamines, plays an important role in the pathogenesis of renal injury in choline-deficient rats. Other works from our laboratories showed that administration of adrenergic blocking agents, alpha-methyl-Dopa and reserpine, prevented the development of the renal injury in choline deficiency. In the present work we planned to study the evolution of the renal injury at the electron microscopic level. Striking pathologic changes of the peritubular capillaries associated with degenerative and necrotic lesions of the epithelium of proximal and distal convoluted tubules, ischemic in nature, were observed. This represents a strong additional support to the theory that the kidney hemorrhagic necrosis of choline deficiency in young rats is, in all probability, due to an autonomic imbalance.

INTRODUÇÃO

Acúmulo de gordura no fígado e necrose hemorrágica nos rins são as alterações patológicas mais comuns em ratos jovens alimentados com dieta deficiente em colina.¹ Embora o mecanismo patogênico do acúmulo de gordura no fígado não seja totalmente esclarecido, parece que está relacionado a alterações na composição lipídica das membranas celulares e a um prejuízo no transporte de lipídios devido à deficiência da biossíntese de fosfatidilcolina. De maneira similar, níveis diminuídos de fosfolipídios foram sugeridos como causa da lesão renal.²⁻³ Contudo, foi demonstrado que precedendo a necrose não há diferença na concentração e no conteúdo total de fosfolipídios nos rins de ratos alimentados com dieta deficiente e dieta suplementada com colina,⁴ embora alterações no conteúdo renal de fosfolipídios possa acompanhar a necrose renal. Paralelamente a isso, postulou-se que o desequilíbrio entre catecolaminas vasoconstritoras e um vasodilatador do tipo da acetilcolina, devido a um decréscimo desta, resultaria em vaso-espasmo e, subsequentemente, isquemia, necrose e hemorragia dos

rins.⁵⁻⁸ Experimentos realizados em nossos laboratórios⁹ mostraram acentuado aumento nos níveis de catecolaminas renais em ratos alimentados com dieta deficiente em colina comparativamente a animais suplementados com colina, enquanto que o nível de acetilcolina renal mostrou-se constante. Como as alterações nas catecolaminas teciduais precederam as lesões renais sugerimos que o desequilíbrio entre os sistemas simpático e parassimpático deve exercer um papel importante na patogênese da lesão renal em ratos deficientes em colina. Este desequilíbrio seria devido ao excesso de catecolaminas renais. Posteriormente demonstramos que agentes bloqueadores adrenérgicos, alfa-metil-Dopa e reserpina, exercem um efeito protetor na necrose e hemorragia renais na deficiência de colina,¹¹ corroborando a hipótese inicial.

Para explorar melhor essa hipótese planejamos o presente experimento com o objetivo de estudarmos as alterações ultra-estruturais dos rins de ratos alimentados com dieta deficiente em colina, comparativamente a animais controles suplementados com colina, em diferentes fases da deficiência de colina.

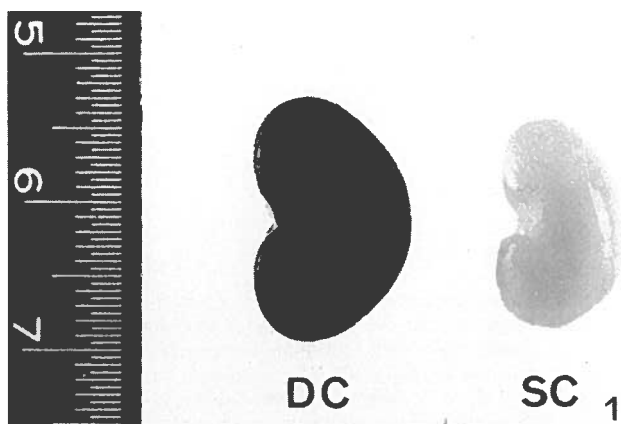


Figura 1: Aspecto macroscópico dos rins dos animais dos grupos controle suplementado com colina (SC) e deficiente em colina (DC) . (1,5×).

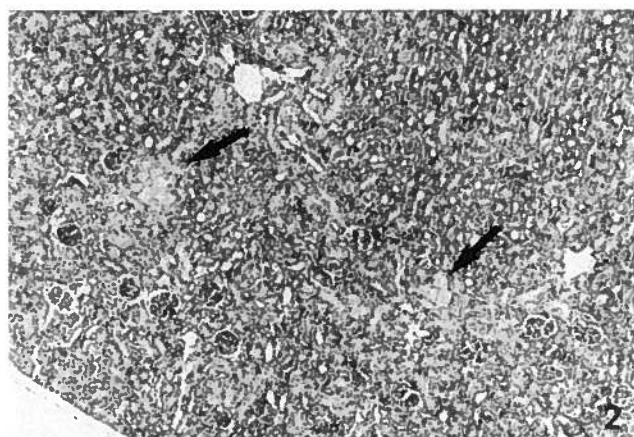


Figura 2: Rato DC. Lesão inicial da fase aguda da deficiência de colina caracterizada por discretos focos de necrose tubular (setas). (76×)

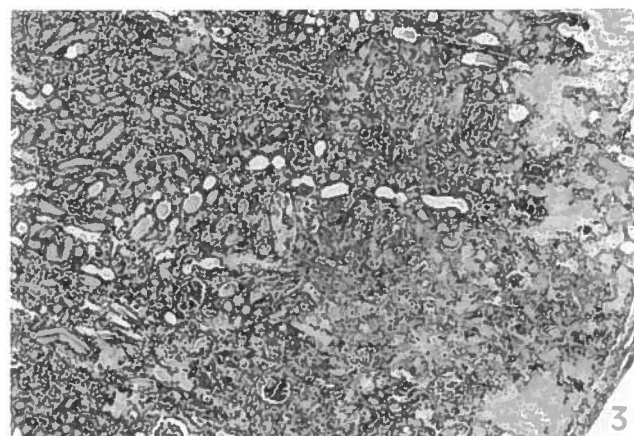


Figura 3: Rato DC. Fase aguda da deficiência de colina caracterizada por hemorragia cortical e sub-capsular, necrose cortical e cilindros hialinos no interior de túbulos. (76×)

MATERIAL E MÉTODOS

Dezasseis (16) ratos albinos da linhagem Wistar, machos, recém-desmamados, peso corporal $47,0 \pm 2,3$ g, foram colocados individualmente em gaiolas de arame com fundo elevado e alimentados com dieta comercial em comedouros metálicos e água em tubos graduados de Richter durante um período de 4 dias de adaptação ambiental. Após este período os animais foram pesados e divididos em 2 grupos: *Grupo SC*, 6 animais alimentados com dieta suplementada com colina; *Grupo DC*, 10 animais alimentados com dieta deficiente em colina.

Os animais do grupo DC receberam dieta básica e água de torneira *ad libitum* durante um período experimental de 8 dias. Os animais do grupo SC receberam a mesma dieta básica suplementada com cloreto de colina à base de 200 mg/100 mg de dieta e água de torneira também *ad libitum*. As composições da dieta básica, mistura salina e de vitaminas foram relatadas em publicações anteriores.⁹⁻¹⁰ Os animais foram pesados no primeiro, quarto, sexto e oitavo dias do experimento.

Foram sacrificados 2 animais do grupo SC e 3 animais do grupo DC, nos quarto, sexto e oitavo dias do experimento. O animal restante do grupo DC foi desprezado. O sacrifício foi realizado por exsanguinação da aorta abdominal, sob anestesia superficial com éter. O rim esquerdo foi rapidamente removido seccionando-se o pedículo renal, secado em papel de filtro e seccionado longitudinalmente. A metade ventral foi fixada por imersão em solução a 4% de formaldeído tamponado durante 24 horas para posterior processamento histológico. Cortes de parafina de 5 micrometros de espessura foram corados com hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio óptico. A metade dorsal foi seccionada para amostragem de fragmentos para estudo ultra-estrutural. Fragmentos de 1 mm³ foram seccionados e fixados por imersão em aldeído glutárico a 4,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) a 4 °C durante 12 a 14 horas.¹¹ Após 3 lavagens de 10 minutos cada em tampão fosfato fez-se a pós-fixação em tetraóxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) durante 2 horas a 4 °C.¹² A desidratação foi feita em concentrações crescentes de acetona (banhos de 10 minutos cada) e a infiltração foi realizada por imersão dos fragmentos em mistura araldite-acetona (1:1) durante 12 a 24 horas à temperatura ambiente, seguida por imersão em araldite durante 3 a 4 horas a 40 °C. A inclusão foi feita por imersão em araldite durante 3 dias a 60 °C. Cortes de 0,5 micrometros foram obtidos com navalha de vidro em micrótomo Sorvall JB-4A, corados com azul de toluidina e examinados ao microscópio óptico. Cortes de 500 a 700 Å foram obtidos com navalha de diamante montada em ultramicrótomo Sorvall MT-1, montados em grades de 300 mesh, duplamente corados com acetato de uramila¹³ e citrato de chumbo¹⁴ e posteriormente examinados e fotografados em microscópio eletrônico Zeiss EM-109.

RESULTADOS

Aspectos macroscópicos

O aspecto macroscópico dos rins dos 6 animais do grupo SC mostrou-se dentro dos padrões da normalidade (Fig. 1), assim como os rins dos 6 animais do grupo DC sacrificados nos quarto e sexto dias de deficiência de colina. Por outro lado, os 3 animais do grupo DC sacrificados no oitavo dia de deficiência de colina mostraram o padrão macroscópico de *necrose hemorrágica* descrito anteriormente⁹ (Fig. 1).

Aspectos à microscopia óptica

Os 6 animais do grupo SC, assim como os 3 animais do grupo DC sacrificados no quarto dia do experimento mostraram padrões de normalidade do córtex renal de mamíferos.¹⁵ Os aspectos microscópicos dos rins dos animais deficientes em colina reproduziram os achados já descritos anteriormente de maneira pormenorizada.^{9, 10} Resumidamente, os achados microscópicos são os que se seguem. Os três animais do grupo DC sacrificados no sexto dia do experimento também mostraram aspecto microscópico dentro dos padrões da normalidade, embora eventualmente fossem encontrados discretos focos de necrose de epitélio tubular (Fig. 2). Por outro lado, os 3 animais do grupo DC sacrificados no oitavo dia do experimento mostraram alterações de fase aguda da deficiência de colina caracterizadas por congestão acentuada dos capilares corticais e dos vasos sanguíneos capsulares, frequentemente acompanhada de hemorragia sub-capsular e da porção mais periférica do córtex renal. Áreas de necrose do epitélio tubular, em maior ou menor extensão, acompanharam sempre a hemorragia cortical, embora fossem encontradas também independentemente desta. Áreas focais de degeneração hidrópica e/ou vacuolar do epitélio tubular foram eventualmente encontradas. Os glomérulos mostraram-se poupados em praticamente todos os casos, excepto nas áreas de necrose onde os glomérulos também estavam necrosados. Frequentemente presente no interior dos túbulos da porção mais externa da camada medular e em toda a camada cortical encontrou-se um material hialino acidófilo preenchendo a luz destes túbulos revestidos de células achatadas (Fig. 3).

Aspectos ultra-estruturais

A ultra-estrutura do córtex renal dos 6 animais do grupo SC (animais alimentados com dieta suplementada com colina) sacrificados dois a dois nos quarto, sexto e oitavo dias do experimento mostrou padrões de normalidade do córtex renal de mamíferos.¹⁵

A ultra-estrutura do córtex renal dos 3 animais do grupo DC (animais alimentados com dieta deficiente em colina) sacrificados no quarto dia experimental revelou um aparente aumento numérico dos lisosomas, discreto aclaramento da matriz citoplasmática e expansão das dobras de membrana baso-lateral das células epiteliais dos túbulos proximais e distais (Fig. 4).

Por outro lado, os 3 animais do grupo DC sacrificados no sexto dia de deficiência de colina exibiram alterações ultra-estruturais de grau moderado tanto ao nível de capilares peri-tubulares quanto ao nível de células epiteliais dos túbulos proximais e distais. As alterações dos capilares peri-tubulares consistiam em vacuolização citoplasmática e tumefacção mitocondrial de células endoteliais, dissociação da célula endotelial da membrana basal subjacente, áreas de fragmentação da célula endotelial com desnudamento da membrana basal. O espaço intersticial estava expandido por líquido de edema e eventualmente continha eritrócitos, polimorfonucleares e mononucleares. As alterações capilares estavam associadas a alterações degenerativas das células epiteliais dos túbulos proximais e distais, também de grau moderado, que consistiam em aumento do tamanho e número dos lisosomas com eventual confluência e fusão destas organelas, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, aclaramento da matriz citoplasmática, tumefacção celular com formação de *bolhas* na porção apical do citoplasma, e expansão do espaço entre as dobras da membrana celular baso-lateral (Figs. 5, 6, 7).

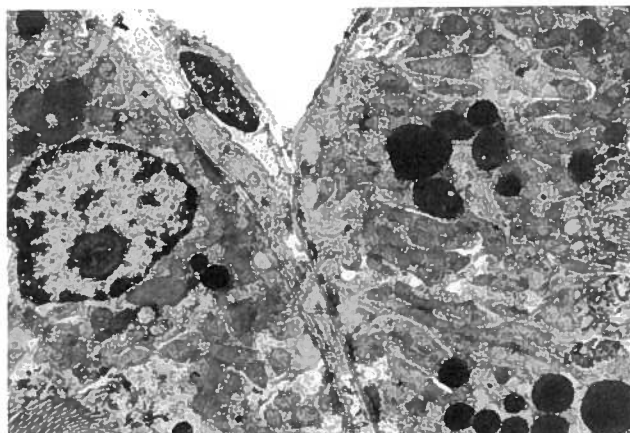


Figura 4: Rim de rato no 4.º dia de deficiência de colina. Corte transversal passando por 2 túbulos contornados proximais adjacentes. Aumento do número dos lisosomas das células epiteliais tubulares. Ausência de lesões no capilar peri-tubular. Acetato de uranila (AU) e citrato de chumbo (CC). (5200×)

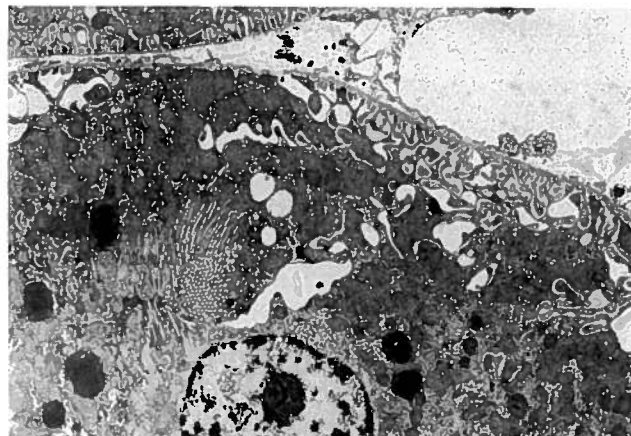


Figura 5: Rim de rato no 6.º dia de deficiência de colina. Revestimento endotelial dissociado da membrana basal subjacente e mostrando vacuolização citoplasmática. Espaço intersticial edemaciado e com presença de eritrócitos e restos celulares. Células do epitélio do túbulo contornado distal mostrando expansão dos espaços entre as dobras da membrana celular baso-lateral. AU, CC. (6992×)

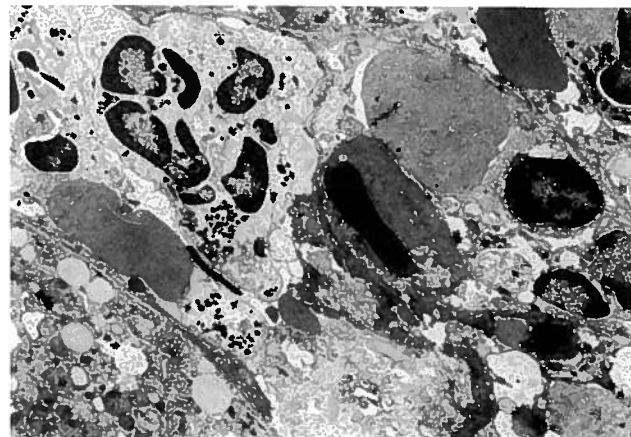


Figura 6: Rim de rato no 6.º dia de deficiência de colina. Corte transversal passando por 2 túbulos contornados proximais adjacentes. Capilar peri-tubular mostrando vacuolização citoplasmática, tumefacção mitocondrial e dissociação da célula endotelial da membrana basal subjacente. Edema intersticial. Células epiteliais tubulares mostrando expansão dos espaços entre as dobras da membrana celular baso-lateral. AU, CC. (5200×)

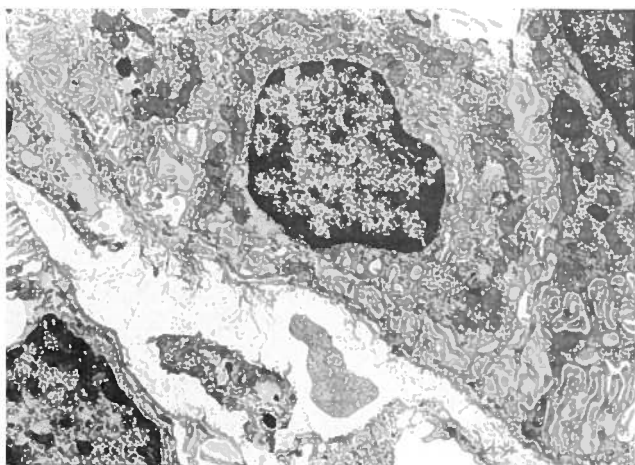


Figura 7: Rim de rato no 6.º dia de deficiência de colina. Célula do epitélio tubular mostrando expansão dos espaços entre as dobras de membrana celular baso-lateral, diminuição da densidade eletrônica da matriz citoplasmática e dilatação do retículo endoplasmático. Células endoteliais mostrando vacuolização e fragmentação citoplasmática com desnudamento da membrana basal subjacente. Edema intersticial, AU, CC. (6.992×)

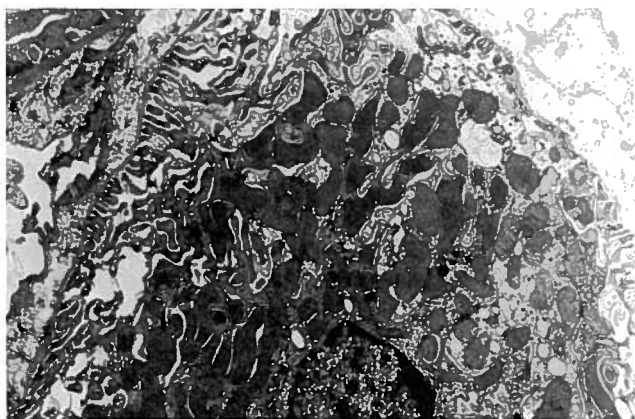


Figura 8: Rim de rato no 8.º dia de deficiência de colina. Acentuada estase de eritrócitos e leucócitos com material fibrinóide nos capilares peri-tubulares. Células epiteliais tubulares com acentuadas alterações degenerativas. Núcleo em cariólise pode ser observado no quadrante superior esquerdo. AU, CC. (5.200×)

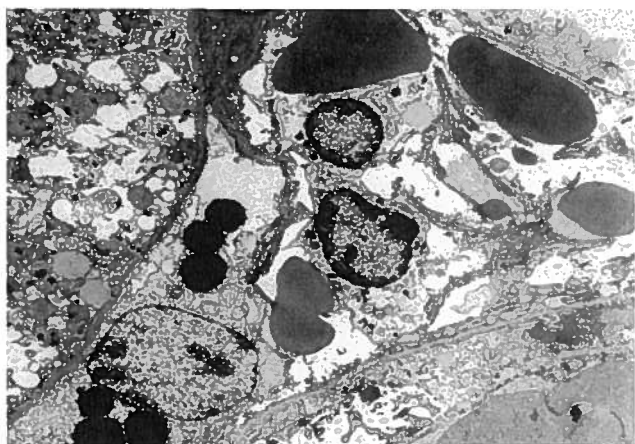


Figura 9: Rim de rato no 8.º dia de deficiência de colina. Necrose do epitélio de revestimento tubular. Acentuada estase de eritrócitos e leucócitos com material fibrinóide no capilar peri-tubular (trombose). AU, CC. (5.200×)

Os três animais do grupo DC sacrificados no oitavo dia de deficiência de colina e que exibiram quadro macroscópico renal de necrose *hemorrágica*, revelaram à microscopia eletrônica alterações também ao nível dos capilares peri-tubulares e células epiteliais dos túbulos proximais e distais. As alterações capilares incluíam vacuolização citoplasmática, tumefacção mitocondrial, dissociação e fragmentação da célula endotelial da membrana basal subjacente com desnudamento desta, presença de material fibrinóide sobre a membrana basal desnudada, estase de eritrócitos e leucócitos e trombose. O espaço intersticial estava expandido por edema, eritrócitos, leucócitos, histiócitos, material fibrinóide, e restos celulares (Figuras 8 e 9). As alterações das células epiteliais dos túbulos proximais e distais incluíam aumento do tamanho e número dos lisosomas com confluência e fusão de algumas organelas, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, tumefacção e vacuolização citoplasmática, condensação de cromatina nuclear, cariólise, fragmentação de membranas, lumen tubular preenchido frequentemente por restos celulares e material fibrinóide e menos frequentemente por material homogêneo de alta densidade eletrônica. Ocasionalmente, alguns túbulos apresentavam início de regeneração do epitélio de revestimento. Alterações glomerulares foram detectadas ocasionalmente e caracterizavam-se por estase de eritrócitos e leucócitos, trombose capilar, degeneração endotelial e vacuolização de podócitos com fusão e alargamento de processos podais, excepto nas áreas de necrose onde os glomérulos também se mostravam necrosados.

DISCUSSÃO

A ultra-estrutura do córtex renal dos animais com 4 dias de deficiência de colina mostrou aumento numérico de lisosomas, discreto aclaramento da matriz citoplasmática e expansão das dobras da membrana baso-lateral das células epiteliais tubulares. Monserrat et al.¹⁶ relataram, no quarto dia de deficiência de colina, uma dilatação do retículo endoplasmático.

No sexto dia de deficiência de colina pudemos observar nítidas alterações, em grau moderado, tanto de capilares peri-tubulares quanto de células epiteliais dos túbulos proximais e distais. As alterações dos capilares peri-tubulares caracterizavam-se por vacuolização citoplasmática, tumefacção mitocondrial, e dissociação da célula endotelial da membrana basal algumas vezes associadas à fragmentação da célula endotelial com desnudamento da membrana basal. Estas alterações estavam associadas a alterações da célula epitelial tubular caracterizadas por aumento do tamanho e número dos lisosomas com eventual área de confluência e fusão dessas organelas, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, aclaramento da matriz citoplasmática, tumefacção celular com formação de *bolhas* no citoplasma apical, e expansão dos espaços entre as dobras da membrana celular baso-lateral. Monserrat et al.¹⁶ relataram no sexto dia de deficiência de colina um moderado aumento do tamanho e número dos lisosomas, progredindo para confluência e ruptura das membranas dessas organelas, diminuição da electro-densidade citoplasmática, alterações mitocondriais moderadas (tumefacção, perda dos grânulos da matriz e dilatação dos espaços entre as cristas) e perda da membrana celular baso-lateral. Este último achado contrapõe-se ao nosso que revelou expansão dos espaços entre as dobras da membrana celular baso-lateral. Esta expansão, juntamente com o aclaramento da matriz citoplasmática e a tumefacção mitocondrial, seria resultado do edema intracelular que se desenvolveria em decorrência de um aumento de permeabilidade capilar consequente às alterações capilares. Em apoio a esta interpretação o espaço intersticial, no

nosso material, estava expandido por líquido de edema e continha, ocasionalmente, eritrócitos e leucócitos. Rastegar et al.¹⁷ relataram expansão das dobras da membrana basolateral de células epiteliais de túbulos coletores em sobrecarga experimental crônica de potássio, atribuindo este achado à adaptação de nefron distal para aumentar a secreção de potássio no lume tubular. Além disso, Monserrat, Porta & Hartroft¹⁶ não fazem referência a lesões vasculares, que no nosso material se mostraram proeminentes no sexto dia da deficiência de colina. Estas alterações do endotélio capilar peri-tubular estavam associadas às alterações da célula epitelial tubular e estavam presentes antes que se desenvolvesse o quadro macroscópico da lesão renal na deficiência de colina, portanto, no estágio pré-necrótico da lesão.

A ultra-estrutura do córtex renal no oitavo dia de deficiência de colina mostrava alterações bastante acentuadas nos capilares peri-tubulares e túbulos proximais e distais. As alterações capilares consistiam em necrose da célula endotelial e trombose. As alterações dos túbulos proximais e distais consistiam em necrose do epitélio de revestimento com presença de restos celulares no lume. Associadas a estas alterações, o interstício apresentava edema e hemorragia. Ocasionalmente associavam-se lesões glomerulares. O aspecto ultra-estrutural das fases finais de necrose celular é relativamente inespecífico independentemente do tipo de injúria inicial.¹⁸ Trump & Mergner¹⁸ descreveram a evolução das lesões celulares decorrentes de injúria isquêmica, estagiando as lesões de 1 a 7. O estágio 1 correspondendo à célula normal, os estágios 2 a 3 correspondendo a alterações celulares ainda reversíveis e os estágios 4 a 7 correspondendo à fase irreversível das alterações celulares pós-isquemia. Nossos achados ultra-estruturais no sexto dia de deficiência de colina correspondem, ainda que não exactamente, às fases 2 a 4 da descrição de Trump & Mergner,¹⁸ embora, eventualmente, fossem encontradas células correspondentes ao estágio 5. Já, no oitavo dia de deficiência, as alterações ultra-estruturais que observamos correspondem aos estágios 6 e 7 para a grande maioria das células. Apesar da inespecificidade do aspecto ultra-estrutural nas fases finais de necrose celular, a correspondência parcial dos nossos achados com os descritos por Trump & Mergner¹⁸ corroboram a hipótese de que a lesão renal na deficiência de colina tenha origem isquêmica. Além disso, a falta de uma correspondência exacta entre os nossos achados e o dos autores acima citados devem-se, acreditamos, ao facto de que a descrição de Trump & Mergner¹⁸ é feita genericamente para qualquer célula, e é de se esperar que cada tipo celular deva reagir com particularidades próprias a um mesmo tipo de injúria.

As alterações glomerulares que encontramos no oitavo dia de deficiência de colina foram ocasionais comparativamente às lesões dos capilares peri-tubulares e túbulos, e caracterizavam-se por estase de eritrócitos e leucócitos, trombose capilar, degeneração endotelial e vacuolização de podócitos com fusão e alargamento de processos podais. Monserrat, Porta & Hartroft¹⁶ descreveram glomérulos normais à microscopia electrónica mesmo nos rins francamente hemorrágicos. Trabalhos com modelo experimental de insuficiência renal aguda induzida por infusão de noradrenalina¹⁹ e por clampagem de artéria renal²⁰ também não descrevem alterações ultra-estruturais dos glomérulos renais. Por outro lado, Ashworth & Grollman²¹ em estudo ultra-estrutural de glomérulos renais na fase aguda de deficiência de colina descreveram edema do revestimento citoplasmático endotelial das ansas glomerulares, edema e fusão das trabéculas e pedicélos das células epiteliais, aumento focal das fendas dos poros entre os pedicélos e redução dos espaços inter-trabeculares. Complementando o estudo ultra-estrutural na fase crônica da deficiência de colina, onde os animais já ha-

viam desenvolvido hipertensão arterial, estes autores dão suporte ao mecanismo vascular na patogênese da hipertensão arterial secundária à deficiência de colina.

Em resumo, as alterações ultra-estruturais encontradas no nosso material mostravam-se desde o início concentradas no binómio endotélio capilar-célula epitelial tubular, sugerindo que deva ser este o local fundamental da lesão renal na deficiência de colina, provavelmente devido a uma maior susceptibilidade das células desse binómio à injúria do tipo isquémico. A maior susceptibilidade individual das células endoteliais de capilares à isquemia foi demonstrada na microvasculatura do coração.²² Além disso, a maior susceptibilidade das células endoteliais dos capilares peri-tubulares renais após injeção de endotoxina também foi demonstrada.²³

Os presentes resultados, tomados em conjunto com resultados anteriores,^{9, 10} corroboram a hipótese de que o desequilíbrio entre os sistemas simpático e parasimpático, devido a um excesso de catecolaminas, deve exercer um papel importante na patogênese da lesão renal em ratos deficientes em colina.

De facto, o envolvimento de receptores adrenérgicos no desenvolvimento da insuficiência renal de natureza isquémica através da libertação de renina já foi demonstrado.^{24, 25} Catecolaminas alteram também a bomba de sódio actuando directamente na membrana celular do epitélio tubular.^{26, 27} Além disso, as alterações renais na deficiência de colina são bastantes similares à necrose cortical bilateral humana, cuja etiologia é provavelmente isquémica.^{28, 30} Paralelamente, Penner e Bernheim³¹ mostraram a semelhança entre as lesões renais observadas em cães injectados intra-peritonealmente com adrenalina e a necrose cortical bilateral.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Sr.^a Dina B. Pelizaro pelos serviços dactilográficos.

BIBLIOGRAFIA

1. KUKSIS, A.; MOOKERJEA, S.: Choline. *Nutr. Rev.*, 1978; 36: 201.
2. PATTERSON, J. M.; MCHENRY, E. W.: Choline and the prevention of hemorrhagic kidneys in the rat: III. Amounts of water, nitrogen, total lipid, and choline in the livers and kidneys. *J. Biol. Chem.*, 1944; 156: 265.
3. MONSERRAT, A. J.; PORTA, E. A.; GHOSHAL, A. K.; HARTMAN, S. B.: Sequential lipid changes in weanling rats fed a choline-deficient diet. *J. Nutr.*, 1974; 104: 1496.
4. SIMON, J. B.; SCHEIG, R.; KLATSKIN, G.: Relationship of early lipid changes in kidney and liver to the hemorrhagic renal necrosis of choline-deficient rats. *Lab. Invest.*, 1968; 19: 503.
5. WOLBACH, S. B.; BESSEY, O. A.: Tissue changes in vitamin deficiencies. *Physiol. Rev.*, 1942; 22: 233.
6. NAGLER, A. L.; DETTBARN, W. D.; SEIFTER, E.; LEVENSON, S. M.: Tissue levels of acetylcholine and acetylcholinesterase in weanling rats subjected to acute choline deficiency. *J. Nutr.*, 1968; 94: 13.
7. NAGLER, A. L.; BAEZ, S.; LEVENSON, S. M.: Status of microcirculation during acute choline deficiency. *J. Nutr.*, 1969; 95: 603.
8. BRUCE, J. R.; WEISE, H. J.; CARTER, M. K.: The effects of reserpine on renal necrosis and urinary catecholamines of choline-deficient rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1976; 36: 607.

9. COSTA, R. S.; ROSSI, M. A.; OLIVEIRA, J. S. M.: Pathogenesis of the renal injury in choline deficiency: the role of catecholamines and acetylcholine. *Br. J. exp. Path.*, 1979; 60: 613.
10. COSTA, R. S.; ROSSI, M. A.: Protective effect of adrenergic Blocking Agents Against Kidney Hemorrhagic Necrosis of Choline Deficiency. *J. Neural Transm.*, 1982; 54: 251.
11. SABATINI, D. D.; BENSCH, K. & BARNETT, R. J.: Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.*, 1963; 17: 19.
12. KAY, H. D.: Techniques for Electron Microscopy. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1965.
13. WATSON, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958; 4: 475.
14. REYNOLDS, E. S.: The use of lead citrate at high pH as electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 1963; 17: 208.
15. BULGER, R. E.: The urinary system. In: Histology. Eds. Greep e Weiss. Mc Graw-Hill Book Company. N. Y., Third Ed., chapter 22. 1973.
16. MONSERRAT, A. J.; PORTA, E. A. & HARTROFT, W. S.: Sequential renal changes in choline-deficient weanling rats. Conventional and electron histochemistry. *Arch. Path.*, 1968; 85: 419.
17. RASTEGAR, A.; BIEMESDERFER, D.; KASHGARIAN, M. & HAYSLETT, J. P.: Changes in membrane surface of collecting duct cells in potassium adaptation. *Kidney Int.*, 1980; 18: 293.
18. TRUMP, B. F. & MERGNER, W. J.: Cell Injury. In: The inflammatory Process. Eds. B. W. Zweifach, L. Grant and R. T. McCluskey, Academic Press, Inc. Second Edition. 1974; Vol. I, chapter 3.
19. CRONIN, R. E.; DE TORRENTE, A.; MILLER, P. D.; BULGER, R. E.; BURKE T. F.; SCHRIER, R. W.: Pathogenic mechanisms in early norepinephrine-induced acute renal failure: functional and histological correlates of protein. *Kidney Int.*, 1978; 14: 115.
20. DONOHUE, J. F.; VENKATACHALAM, M. A.; BERNARD, D. B. & LEVINSKY, N. G.: Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural functional correlations. *Kidney Int.*, 1978; 13: 208.
21. ASHWORTH, C. T. & GROLLMAN, A.: Electron microscopy in experimental hypertension. Glomerular changes in choline deficiency-induced hypertension in the rat. *Arch. Path.*, 1959; 68: 148.
22. WEST, P. N.; CONNORS, J. P.; CLARK, R. E.; WELDON, C. S.; RAMSEY, D. L.; ROBERTS, R.; SOBEL, B. E. & WILLIAMSON, J. R.: Compromised Microvascular Integrity in Ischemic Myocardium. *Lab. Invest.*, 1978; 38: 677.
23. RICHMAN, A. V.; GERBER, L. I. & BALIS, J. N.: Peritubular Capillaries. A major target site of endotoxin-induced vascular injury in the primate kidney. *Lab. Invest.*, 1980; 43: 327.
24. IAINA, A.; SOLOMON, A.; ELIAHOU, H. E.: Reduction in severity of acute renal failure in rats beta-adrenergic blockade. *Lancet*, 1975; 2: 157.
25. ELIAHOU, H. E.; SOLOMON, S.; IAINA, A.; OSHMAN, R.; SERBAN I.: Alleviation of acute anuric renal failure in rats β_1 -adrenergic blockade with prazosin. *Isr. J. Med. Sci.*, 1978; 14: 274.
26. GILL, J. R.; JR.; GASPERS, A. G. T.: Depression of proximal tubular sodium reabsorption in the response to renal beta-adrenergic stimulation by isoproterenol. *J. Clin. Invest.*, 1971; 50: 112.
27. ZAMBRASKI, E. J.; DIBONA, G. F.; KALOYIANIDES, G. J.: Effect of sympathetic blocking agents on the antinatriuresis of reflex renal nerve stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976; 198: 464.
28. CHRISTENSEN, K.: Renal changes in the albino rat on low choline and choline-deficient diets. *Arch. Path.*, 1942; 34: 633.
29. MOORE, H. C.: The acute renal lesions produced by choline deficiency in the male weanling rat. *J. Path. Bact.*, 1957; 74: 171.
30. ANDERSON, W. A. D.; JONES, D. B.: Kidneys. In: *Pathology* (Anderson, W. A. D., ed), 1971; pp. 773. St. Louis: Mosby.
31. PENNER, A.; BERNHEIN, A. I.: Acute ischemic necrosis of the kidneys. A clinicopathologic and experimental study. *Arch. Path.* 1940; 30: 465.

Pedido de separatas: Roberto Silva Costa
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
14100 - Ribeirão Preto - SP - Brasil