

NEFROSIS TOXICA INDUCIDA POR CLORURO DE MERCURIO EN RATAS. ESTUDIO POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LAS ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES Y REGENERACION TUBULAR

Mercury chloride nephrotoxicity in rats. Ultrastructural changes and regeneration of the kidney tubules by scanning electron microscopy

**Amelia Luengo C.
Manuel Alvarado M.**

Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad del Zulia,
Maracaibo. Estado Zulia, Venezuela

RESUMEN

La nefrosis fue inducida por la inyección subcutánea de cloruro de mercurio en ratas, en dosis crecientes (1.5, 5.0, 7.0 y 10 mgr/kg p.v.) y a diferentes intervalos de observación (24 hr. 48 hr y 8 días). Los riñones fueron fijados "in situ" por perfusión con una mezcla de: glutaraldehído 25%, paraformaldehído 1%, cloruro de calcio 0.5% en buffer de cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7,4, 410 mOsm. Las alteraciones degenerativas ultraestructurales encontradas por microscopia electrónica de barrido (MEB) de los túbulos contorneados proximales (TCP) del riñón fueron: distorsión y pérdida progresiva de microvellosidades del ribete en cepillo, aumento en número y frecuencia de microcráteres, grandes vacuolas citoplasmáticas, microvellosidades con formaciones bulbosas o aplanadas, disminución del laberinto basai, pérdida de cilios, desprendimiento celular de la membrana nasal, hasta llegar a la necrosis del epitelio y disminución de las células epiteliales viables a medida que aumentaba la dosis. La regeneración y recuperación del epitelio lesionado fue observado por MEB a los 8 días con bajas dosis de mercurio. El origen de las células residuales, resistentes al efecto nefrotóxico, en las áreas lesionadas, al ser estimuladas por la necrosis inducida, para una rápida multiplicación por mitosis y reepitelización tubular.

Palabras claves: Túbulos renales, cloruro de mercurio, nefrosis ultraestructural, regeneración.

ABSTRACT

The nephrosis of epithelial cells of proximal convoluted tubules (PCT) in rats after administration of mercuric chloride injection in increasing doses (1.5, 5.0, 7.0 y 10 mgr/kg p.v.) was studied at 24 hr. 48 hr, and 8 days after treatment. Kidneys of each animal were fixed by perfusion in a mixture of glutaraldehyde 2.5%, paraformaldehyde 1%,

calcium chloride 0.5%, 0.2 M in sodium cacodylate buffer. pH 7.4. 410 mOsm. The ultrastructural degeneration of epithelial cells of proximal convoluted tubules was studied by scanning electron microscopy. as a result: distortion and loss of microvilli, increased microcrater-like, depressions within the microvillus border. increased vacuolation of cytoplasmic cells, small blebs in microvilli. loss of lateral and basal interdigitation. loss of cilia, disruption of cytoplasmic membranes and development of necrosis of epithelial cells were obtained progressively with the doses. The regeneration of altered epithelium was kept under observation for 8 days by scanning electron microscopy (SEM), with low mercury doses. It appears that cells, resistant to nephrotoxicity and that multiply when stimulated by necrosis.

Key words: Kidneys tubules, mercuric chloride. nephrosis, regeneration.

INTRODUCCION

Los primeros estudios por microscopia electrónica de barrido fueron enfocados hacia la estructura del glomérulo^[1,2,3,4,6,17,31]. Estos investigadores lograron observar el glomérulo completo con sus podocitos y sus delicados pedicelos.

El éxito de las observaciones por microscopia electrónica de barrido de los túbulos renales han estado retrasados en comparación con las realizadas del glomérulo, sin embargo excelentes trabajos han sido publicados que agregan conocimientos a las observaciones hechas previamente por microscopia electrónica de transmisión (MET) de los túbulos. Algunas investigaciones realizadas para describir las diferentes porciones de los túbulos uriníferos normales^[6,11,29] han servido de base para estudiar los cambios en la estructura tubular renal, que ocurren durante la injuria o enfermedad.

La mejor y más detallada descripción de la estructura del nefron por microscopia electrónica de barrido (MEB) es la de Bulger y col.^[6], quienes también describieron un procedimiento que permite la selección del tejido renal

para el estudio de los diferentes segmentos tubulares, conociendo la posición que ellos tienen en el riñón. Otros investigadores han estudiado por MEB las alteraciones patológicas que ocurren a nivel de los TCP como respuesta al Puromicin aminonucleósido (PAN), mostrando dilatación del lumen, pérdida de las microvellosidades del ribete en cepillo, y paredes anormalmente adelgazadas^[2]. Pero existen pocos investigadores que han estudiado, a través de observaciones por MEB, las alteraciones que ocurren a nivel de los túbulos renales inducidos por cloruro de mercurio^[33,34]. Estos en sus trabajos utilizaron dosis bajas y altas de mercurio como agente nefrotóxico y encontraron que 24 horas después de la administración subcutánea de dosis bajas de cloruro de mercurio (2 mgr/kg p.v.), la porción media y terminal de los TCP en todas las ratas mostró necrosis, caracterizada por pérdida de las microvellosidades del ribete en cepillo y disminución de la altura celular, en contraste con la necrosis total del epitelio de los TCP, como respuesta a dosis alta de cloruro de mercurio (4 mgr/kg p.v.).

El microscopio electrónico de barrido está siendo aplicado cada vez con mayor frecuencia en los estudios ultraestructurales del nefrón. Esto es en parte debido a que esta técnica permite examinar especímenes grandes, proporcionando una imagen tridimensional de fácil interpretación de los glomérulos y de los túbulos renales. La distribución y características de los cilios rudimentarios del nefrón no pudieron ser dilucidados hasta que se realizaron estudios por MEB^[1,2,6]. La distribución y apariencia de las microvellosidades, cilios, microcráteres, microbulbos, en los TCP, no pudieron ser apreciados hasta que fueron descritos en imágenes observadas por MEB^[6,11,15]. La superficie luminal del TCP se caracteriza por presentar una densa capa de microvellosidades, que pueden distinguirse en la superficie luminal sobre las células adyacentes a la cápsula de Bowman en el orificio o polo urinario. La mayoría de las microvellosidades que forman el ribete en cepillo son altas y paralelas, aunque se pueden encontrar algunas de forma irregular y con microproyecciones bulbosas apicales. Cada célula del TCP posee ocasionalmente uno o dos cilios primarios centrales, los cuales son similares a los encontrados en la capa parietal de la cápsula de Bowman. Un número variable de pequeñas áreas circulares que interrumpen el ribete en cepillo, llamadas microcráteres son consideradas como un artefacto producto de la fijación por perfusión^[6,29].

Andrews y Porter^[1], refieren que ocasionalmente en los TCP se encuentran largas y delgadas estructuras que llamaron zarcillos, que pueden variar en longitud (5-24 μ m) y tener un diámetro de aproximadamente 0,2 μ m. Estas estructuras poco usuales parecen emerger de una célula epitelial de un lado del lumen, y terminan en una punta expandida en forma de masa globular de diferentes tamaños, dirigida hacia la cara luminal opuesta. Andrews^[2]; y Hayat^[15], sugieren que estas estructuras en su mayoría son artefactos, como producto de la ruptura de las células del túbulo y la subsecuente expulsión del citoplasma y organelas hacia el lumen, o quizás de una función secretoria o ser cilios modificados. Las células del

TCP son relativamente altas y anchas de contorno poligonal o hexagonal, como transición hacia el delgado y escamoso de las células parietales que se encuentran abruptamente en el polo urinario de la lámina parietal de la cápsula de Bowman. Las células tubulares también poseen muchos pliegues laterales y basales, llamados "laberinto basal".

Los cilios, constituyen uno de los detalles ultraestructurales más prominentes del nefrón recientemente descritos y se encuentran esparcidos por la superficie luminal desde el epitelio parietal de la cápsula de Bowman hasta el epitelio de los túbulos contorneados proximales y distales, ya que en los túbulos colectores no existen cilios desarrollados, sugiriéndose que existe relación entre la aparición de estos cilios y la ontogenia del riñón^[29]. Los riñones se desarrollan de dos diferentes porciones, de la vesícula nefrogénica y de la yema ureteral, como una parte del conducto de Wolff, por lo que todas las estructuras derivadas de este conducto poseen cilios muy cortos o están desprovistas de los mismos. La función de estos cilios no se ha dilucidado, pero desde el punto de vista fisiológico su función podría ser la producción de movimiento del fluido tubular como un efecto mezclador que facilite la difusión y reabsorción tubular de solutos^[29]. Andrews y Porter^[1], sugieren que éstos, también podrían tener una función sensorial, pero eso hasta ahora no está confirmado.

Ha sido demostrado que el cloruro de mercurio causa necrosis tubular aguda en todas las porciones del TCP del riñón, tomándose la extensión de la necrosis y la falla renal aguda como modelo experimental, con diferentes dosis, diferentes vías de administración, diferentes especies animales, diferente sexo y en animales de la misma especie y sexo de manera individual, mediante estudios metabólicos, por microscopía óptica (MO) y electrónica de transmisión (MET)^[7,8,12,14,19,21,24,32,36,37,38]. En el citoplasma de las células tubulares se concentra el mercurio ligado a proteínas, en el retículo endoplasmático liso, en lisosomas y mitocondrias, causando las lesiones selectivas a nivel del TCP^[12,14,21]. Asimismo es conocido que en las microvellosidades de las células tubulares existen enzimas que intervienen en los procesos metabólicos de transporte activo (reabsorción tubular), que son muy sensibles a las nefrotoxinas y anoxia, causando tumefacción en las microvellosidades, formación de vacuolas citoplasmáticas, alteraciones a nivel de organelas (mitocondrias, aparato reticular de Golgi, retículo endoplasmático liso), hasta llegar a la necrosis^[12,14,24]; sin embargo, son pocos los investigadores que han estudiado las alteraciones inducidas por cloruro de mercurio mediante la microscopía electrónica de barrido (MEB)^[27,33,34].

La intoxicación por mercurio inorgánico es un problema potencialmente grave en la industria moderna porque produce nefrosis y necrosis tubular con insuficiencia renal y síndrome nefrótico. Estas lesiones causadas por el mercurio han servido como modelo experimental para estudiar la enfermedad renal^[16]. Cuando el mercurio se une con un átomo de carbono se transforma en compuesto orgánico, aumentando grandemente su toxicidad, debido a que así es más fácilmente absorbido por el

organismo, así como también a éste se le hace más difícil eliminarlo y se acumula en órganos y tejidos. El metilmercurio es uno de los compuestos mercuriales orgánicos más tóxicos, y que ha sido ampliamente usado como fungicida, en cosechas de semillas y también como desecho industrial. Estos compuestos mercuriales también pueden contaminar alimentos especialmente aquellos de la cadena alimentaria de la vida marina, debido a la contaminación de las aguas producto de efluentes industriales^[28].

En 1968, una planta química japonesa, vertió desechos mercuriales en los afluentes de la bahía de Minamata. Parte del mercurio había sido convertido en metilmercurio antes de ser desechado. Este compuesto se unió al plancton y se acumuló en los peces de la bahía, envenenándose aproximadamente 100 personas, de las que fallecieron 46, por insuficiencia renal aguda. A finales de 1971, un cargamento de semillas de trigo y cebada, tratados previamente con mercurio fue importado por Irak y distribuido para el cultivo. Algunas personas consumieron estos cereales y más de 6.000 sufrieron envenenamiento, y de los cuales murieron 500. En 1980, aproximadamente 10.000 bebés en Argentina, fueron expuestos al fenilmercurio utilizado en pañales para evitar el moho, y de los cuales 12 mostraron síntomas de envenenamiento por mercurio. Otros accidentes parecidos han sucedido en otros países como: Paquistán, Guatemala y Perú^[13,30,35].

En nuestro medio la fuente más común de exposición al mercurio, es el pescado de nuestras dietas, sobre todo de aquellos que provienen de la bahía del Tablazo, porque se ha comprobado que sus aguas están contaminadas por este metal, lo cual pudiera ser un problema de salud pública potencial y latente^[28].

El mercurio orgánico como inorgánico además del daño renal, también produce lesiones tóxicas a nivel del sistema nervioso central (SNC), hemorragias a nivel de faringe, esófago, estómago, debilitamiento de las capas musculares del intestino, colitis severa, congestión hepática y estasis biliar, degeneración e inflamación del miocardio y fibrosis pulmonar, si la exposición al mercurio es por la inhalación de sus vapores^[5,13]. El mercurio al ingresar al organismo se acumula en los órganos y tejidos, principalmente en el riñón, SNC e hígado, debido a que éste se une a proteínas propias de la membrana celular y sus organelas, específicamente a los grupos tiol de las proteínas celulares, por lo que es difícil su detoxificación por parte del organismo, en aproximadamente 70 días, aumentando así su efecto tóxico. Para eliminar el mercurio acumulado se han empleado sustancias quelantes como la selenita, que se supone se une al mercurio, y así es más fácilmente excretado por los riñones^[18,25].

Luego de la necrosis causada por mercurio a nivel del epitelio de los TCP, se producen aparentes procesos regresivos y/o regenerativos de los mismos, por un proceso celular intrínseco. Estos fenómenos han sido estudiados por algunos investigadores por microscopía óptica y transmisión^[8,9,10,18,20] y por microscopía electrónica de barrido^[27,33,34].

La microscopía electrónica de barrido ha permitido la observación ultraestructural tridimensional de los proce-

sos de regeneración celular luego de la injuria causada por mercurio. Con bajas dosis de mercurio (1,5 mgr/kg p.v.) los procesos regresivos y regenerativos parece que ocurren simultáneamente, observándose que después de 7 a 10 días, que el epitelio regenerado es difícil de diferenciar del normal^[8,9,10,27]. El epitelio regenerado invade la membrana basal denudada, como un denso fluido esparcido sobre una superficie plana. El epitelio neoformado es plano e inicialmente posee una superficie sin microvellosidades o con microvellosidades cortas, que son precursoras del ribete en cepillo. Se piensa que la regeneración que comienza a partir de células epiteliales intactas o residuales durante el daño tubular^[9,10,27,33,34]. Estas células están relacionadas con el proceso de crecimiento del epitelio por multiplicación mitótica. Las células neoformadas son planas desdiferenciadas entre sí y poseen un aparato ribosomal que es necesario para la síntesis de proteínas^[8]. Estas células residuales son idénticas a las células escamosas descritas por Siegel and Bulger^[33].

En el presente trabajo estamos considerando los cambios ultraestructurales tridimensionales a nivel de los TCP del riñón de rata, después de la administración de dosis crecientes de cloruro de mercurio a diferentes intervalos de tiempo, la relación de estos cambios con los ya descritos por MET y microscopía óptica de alta resolución (MOAR) en investigación anterior^[20] y los posibles eventos regenerativos del epitelio de los túbulos lesionados.

MATERIALES Y METODOS

En el ensayo fueron utilizadas 22 ratas (Cepa Wistar), divididas en 4 grupos de tratamiento, a las que se administró una dosis subcutánea de cloruro de mercurio (1.5, 5.0, 7.0 y 10 mgr/kg p.v.) respectivamente y un grupo control, a diferentes intervalos de observación (24 horas, 48 horas y 8 días). Los riñones fueron fijados "in situ" por perfusión, según el método de Maunsbach^[22,23], con una mezcla fijadora de glutaraldehído 2.5%, paraformaldehído 1%, cloruro de calcio 0.5% en buffer de cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.4, 410 mOsm. Las muestras de corteza renal fueron procesadas según la técnica de rutina para MEB, realizando post-fijación con osmio 1% en buffer de cacodilato de sodio, tinción conductiva osmio-ácido tánico-osmio (O-T-O), según la técnica de Murakami^[26], deshidratación en alcoholes crecientes, secadas por punto crítico (SPC), cubiertas con una capa de oropaladio de 100 Å y observadas en ultra-alta resolución en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-570. Algunas muestras luego de SPC y observadas por MEB, fueron transferidas a una solución de óxido de propileno en tres pases de 10 minutos cada uno e incluidas en resina Spurr, obteniendo cortes ultrafinos que fueron observados por MET. El copiado y selección de negativos de MEB y MET se realizaron en una ampliadora Durst 1200.

RESULTADOS Y DISCUSION

Después de la administración de cloruro de mercurio en dosis crecientes, se observó variabilidad en el grado y aparición de las alteraciones ultraestructurales tridimensionales vistas por MEB, en las células epiteliales de los TCP del riñón, en los diferentes intervalos de tiempo. La alteración ultraestructural más temprana fue la distorsión de las microvellosidades en áreas del epitelio tubular, cambios éstos que coinciden con los reportados en estudio anterior por MET y MOAR, con bajas dosis de mercurio (1.5 mgr/kg p.v. a las 24 y 48 horas), pero que difieren de los reportados por Siegel y Bulger^[33,34], quienes reportaron como alteración más temprana, el incremento en número y frecuencia de aparición de vesículas y partículas electronodensas a nivel de la porción apical del citoplasma.

Subsecuentemente, las alteraciones que se observaron en el epitelio de los TCP fueron: aumento en el número y frecuencia de aparición de microcráteres con microproyecciones bulbosas centrales, vacuolas citoplasmáticas de gran tamaño, pérdida de microvellosidades, microvellosidades marcadamente irregulares con formaciones bulbosas o aplanadas en su extremo apical, disminución del laberinto basal, pérdida de cilios, desprendimiento de células lesionadas de la membrana basal, hasta llegar a la necrosis total del epitelio, con ruptura de la membrana citoplasmática y detritus celulares que obstruían luces tubulares.

A medida que aparecieron estas alteraciones, disminuía el número de células aparentemente viables, llamadas también células residuales o escamosas y aumentaba el número de células necróticas, lo que coincidió con lo reportado por Siegel y Bulger^[33,34] y Ormos^[27].

Por MEB la necrosis fue masiva con la dosis de 5 mgr/kg p.v. a las 48 horas, mientras que por MET en trabajo anterior^[21], se observó con la dosis de 7 mgr/kg p.v. a las 24 horas. Estas diferencias pudieran deberse, a que las muestras observadas por MEB son de mayor tamaño, que las de MET, lo que permite hacer un análisis más extenso de las muestras, o también pudo deberse a diferencias individuales en la respuesta de los animales a la injuria causada por mercurio.

No se observó engrosamiento o ruptura de la membrana basal de los TCP, lo cual coincide con los resultados reportados por Siegel y Bulger^[33,34] y Ormos^[27], pero difieren de los hallazgos por MET, en trabajo anterior^[21], donde se observó engrosamiento de la membrana basal con altas dosis de mercurio. Esto pudiera deberse a edema o algún cambio regenerativo que no pudo ser aclarado. La membrana basal intacta es necesaria para el ordenado reemplazo del epitelio necrótico^[8,9,33].

El origen de las células regenerativas del túbulo lesionado se cree que pueda estar en las células residuales sin necrosis, en la zona lesionada^[7,9]. Estas células residuales se dividen para repoblar el túbulo, estimuladas por la necrosis. El ciclo celular normal en los riñones de los mamíferos, es lento y factible que sólo unas cuantas células se multipliquen periódicamente para reemplazar las células que mueren en el nefrón por

necrobiosis, como un sistema intrínseco de autorregulación. Luego que las células epiteliales son estimuladas por la necrosis inducida, el ciclo celular se acorta y comienza una rápida multiplicación celular por mitosis para revestir y realinear la membrana basal del túbulo lesionado. Cuando el túbulo es totalmente reepitelizado, cesa la multiplicación celular, quizás por un mecanismo de "inhibición por contacto". Nuestros hallazgos, difieren de los reportados por Ormos^[27], quien observó el epitelio con características muy similares a lo normal entre 5 y 10 días, después de la administración de dosis bajas de mercurio, mientras que nosotros observamos que algunas alteraciones persistían a los 8 días con la misma dosis (1.5 mgr/kg p.v.) (Ver micrografías 1 a 10). Creemos que quizás es necesario más tiempo para que se restablezca por completo el epitelio lesionado en estructura y función. Por lo tanto sería importante continuar con estas investigaciones utilizando dosis diferentes de cloruro de mercurio con diferentes intervalos de observación y estudios metabólicos por análisis de rayos X por MET y MEB, que permitan correlacionar estos resultados con los procesos regenerativos y/o reversibles que ocurren en los TCP.

AGRADECIMIENTO

A la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA), al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) y a la División de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias por su apoyo económico. En especial al Dr. Manuel Alvarado M., por su desinteresada colaboración y al Dr. Yoshimichi Kozuka (tutor) por sus oportunos y sabios consejos en la realización del presente trabajo.

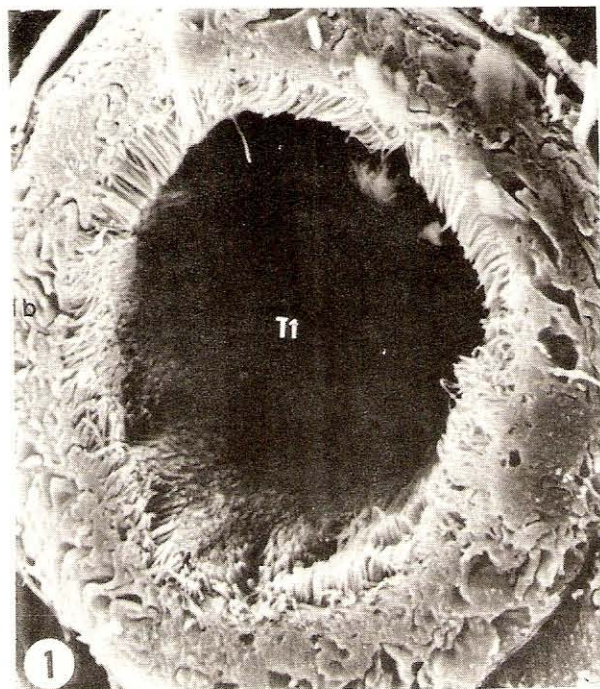


FIG. 1. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de TCP (T1) fracturado transversalmente mostrando laberinto basal (lb) con sus interdigitaciones basales y laterales. 4.200 x (Grupo Control).



FIG. 2. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de TCP fracturado; observe pared lateral con membrana citoplasmática (mp) intacta mostrando prolongaciones basales unidas a la membrana basal (mb), microvellosidades (mv) largas, uniformes y cilios simples (cs) que sobresalen en el ribete en cepillo. 1.300 x (Grupo Control).

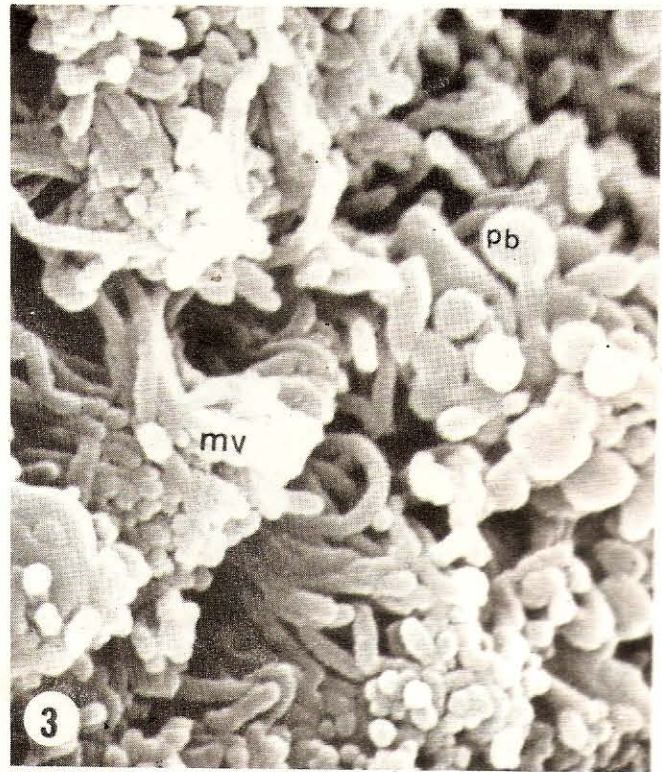


FIG. 3. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de superficie apical de TCP, mostrando distorsión de microvellosidades (mv) con plegamiento apical y microproyecciones bulbosas (pb). 27.000 x (Dosis 1.5 mgr/kg p.v. de cloruro de mercurio, 24 y 48 horas).



FIG. 4. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de TCP cortado transversalmente; observe epitelio necrótico, grandes vacuolas (v) que protruyen hacia el lumen tubular (L). 3.600 x (Dosis 5 mgr/kg p.v. de cloruro de mercurio, 48 horas).

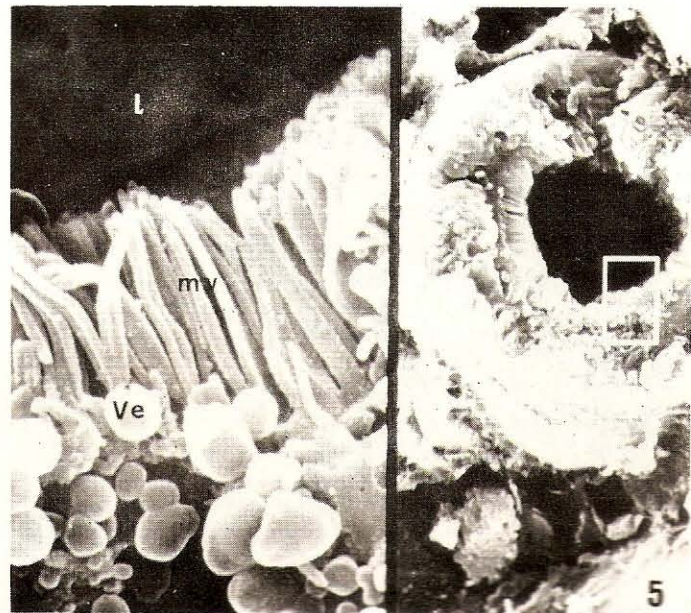


FIG. 5. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de corte transversal de TCP; observe citoplasma apical con formaciones redondeadas parecidas a vesículas exocíticas (ve), microvellosidades (mv) proyectándose hacia el lumen tubular (L). 2.400 x (a), 76.200 x (b) (Dosis 5 mgr/kg p.v. de cloruro de mercurio).



FIG. 6. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de superficie epitelial de TCP, con grandes formaciones globulosas (g) parecidas a células epiteliales degeneradas, desprovistas de microvellosidades y protruyen hacia el lumen tubular. 15.000 x (Dosis 1.5 mgr/kg p.v. de cloruro de mercurio).

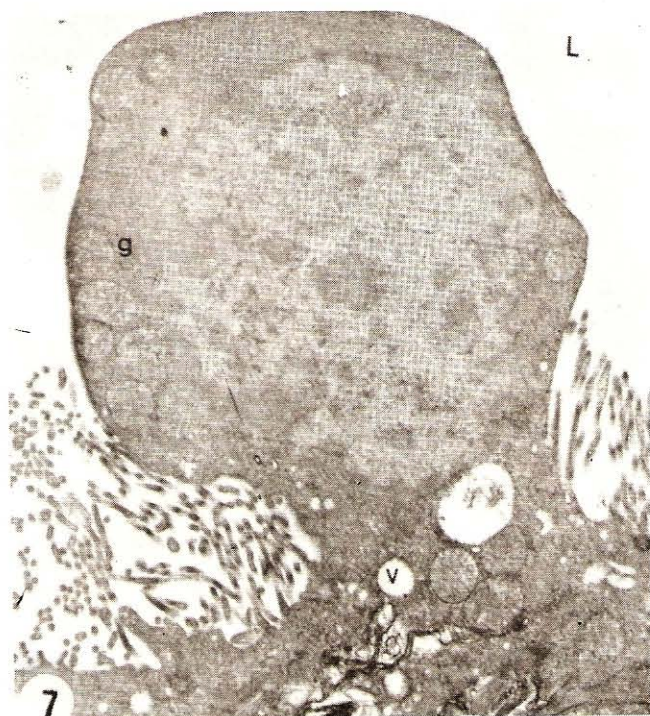


FIG. 7. Micrografía electrónica de transmisión (MET) de TCP procesados y observados previamente por MEB y luego procesados para MET. Epitelio tubular con formaciones globulosas (g) o células epiteliales degeneradas, unidas aún al epitelio proyectándose hacia el lumen tubular (L) y vacuolas citoplasmáticas (V). 4000 x (Dosis 1.5 mgr/kg p.v. de cloruro de mercurio, 8 días).

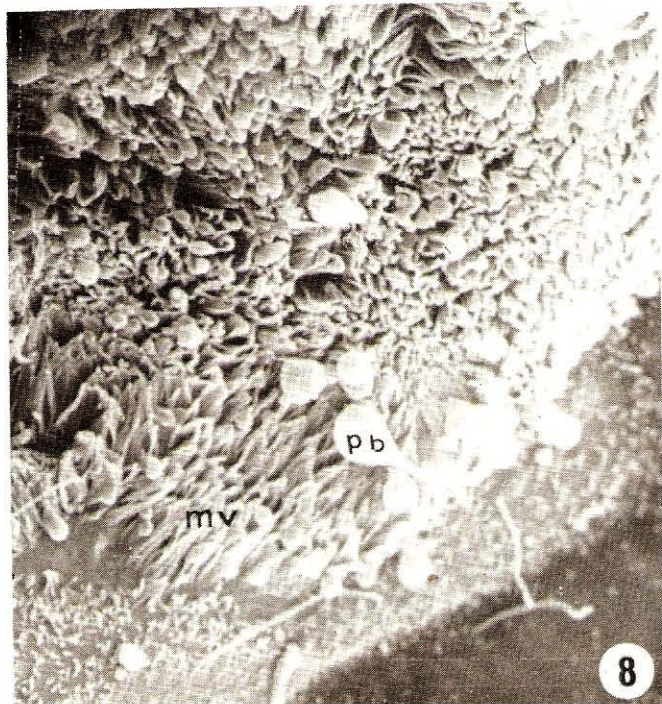


FIG. 8. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de superficie epitelial de TCP, con áreas denudadas de microvellosidades, otras áreas con microvellosidades de baja altura (mv) e irregulares y microproyecciones bulbosas (pb) apicales. 6.000 x (Dosis 1.5 mgr/kg p.v. de cloruro de mercurio, 8 días).



FIG. 9. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de TCP, mostrando microvellosidades distorsionadas (mv) con formaciones aplanadas o discos (pd). 13.000 x (Dosis 5 y 7 mgr/kg p.v. de cloruro de mercurio).



FIG. 10. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de superficie epitelial del TCP, mostrando microcráteres (c), microproyecciones bulbosas (pb) apicales en microvellosidades y eritrocitos deformes (GR). 20.000 x (Dosis 1.5 mgr/kg p.v. de cloruro de mercurio, 8 días).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Andrews, P. M. and Porter, K. R. A Scanning Electron Microscopic study of the nephron. *Am. J. Anat.* 140: 81-116. 1974.
- [2] Andrews, P. M. A Scanning and Transmission Electron Microscopic comparison of Puromycin aminonucleoside-induced nephrosis to hyperalbuminemia-induced proteinuria with emphasis on kidney podocyte pedicel loss. *Lab. Invest.* 36(2): 183-197. 1977.
- [3] Arakawa, M. A Scanning Electron Microscopy of the glomerulus of normal and nephrotic rats. *Lab. Invest.* 23(5): 480-496. 1970.
- [4] Arakawa, M. and Tokunaga, J. A Scanning Electron Microscopy study of the glomerulus. *Lab. Invest.* 27(4): 366-371. 1972.
- [5] Buck, W. B., Osweiler, G. D. y Van Gelder, R. *Toxicología Veterinaria, Clínica y Diagnóstica.* Ed. Acribia. 418-433. 1981.
- [6] Bulger, R. E., Siegel, F. L. and Pendergrass, R. Scanning and Transmission Electron Microscopy of the rat kidney. *Am. J. Anat.* 139: 483-502. 1974.
- [7] Carroll, N., Crock, C. C., Funder, C. R., Green, K. N., Ham, N. and Tange, J. D. Scanning Electron Microscopy of aminonucleoside nephrosis. *J. Path.* 111: 37-42. 1973.
- [8] Cuppage, F. E., Neagody, D. R. and Tate, A. Repair of the nephron following temporary occlusion of the renal pedicle. *Lab. Invest.* 17(6): 660-674. 1967.
- [9] Cuppage, F. E., Cunningham, N. and Tate, A. Nuclei acid synthesis in the regenerating nephron following injury with mercuric chloride. *Lab. Invest.* 21(5): 449-457. 1969.
- [10] Cuppage, F. E., Chiga, M. and Tate, A. Cell Cycle studies in the regenerating rat nephron following injury with mercury chloride. *Lab. Invest.* 26(1): 122-126. 1972.
- [11] Fujita, T., Tanaka, K. and Tokunaga, J. *SEM Atlas of cells and tissues.* Ed. Igaku-Shoin. Tokyo. New York: 185-206. 1981.
- [12] Ganote, C. E.; Reimer, K. A. and Jennings, R. B. Acute mercuric chloride nephrotoxicity and electron microscopic and metabolic study. *Lab. Invest.* 31(6): 633-647. 1974.
- [13] Goyer, R. A. Toxic metals and their effect on the kidneys. *Diag. Med. Nov.*: 50-61. 1978.
- [14] Gritzka, T. L. and Trump, B. F. Renal tubular lesions caused by mercuric chloride. *Electro. Microscopic observations, degeneration of pars recta.* *Am. J. Pathol.* 52: 1225-1277. 1968.
- [15] Hayat, M. A. *Scanning Electron Microscopy of the normal and pathological mammalian kidney.* Ed. Van Nostrand Reinhold Co. New York: 236-260. 1981.
- [16] Higuchi, T. A., Fukumura, K. R., Ohguchi, A. Y., Hayashi, A. S., Sakamoto, N. and Hanaichi, T. An Association of mercury with selenium in inorganic mercury intoxication. *Human Toxicol.* 4: 637-642. 1985.
- [17] Jones, D. B. Correlative Scanning and Transmission Electron Microscopy of glomeruli. *Lab. Invest.* 37(6): 569-574. 1977.
- [18] Kempczinski, R. F. and Caufield, J. B. A Light and Electron Microscopic study of renal tubular regeneration. *Nephron.* 5: 249-264. 1968.
- [19] Klein, R. and Sheldon, P. H. Methyl mercury intoxication' in rat kidney. *Arch. Pathol.* 96(Aug): 83-90. 1973.
- [20] Luengo, A. C. y Kozuka, Y. Nefrosis Tóxica inducida por Cloruro de mercurio en ratas. Secuencia de alteraciones ultraestructurales y regeneración tubular (TEM). XXXIV Jornadas Nacionales de Anatomía Patológica. Maracay. Venezuela. Nov.: 1-53. 1990.
- [21] Madsen, K. M. Mercury accumulation in kidney lysosomes of proteinuric rats. *Kidney Inter.* 18: 445-453. 1980.
- [22] Maunsbach, A. B. The Influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells. *J. Ultrastructure. Research.* 15: 242-282. 1966 (a).
- [23] Maunsbach, A. B. Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. *J. Ultrastructure Research.* 16: 239-258. 1966 (b).
- [24] McDowell, E. M. Studies on the pathophysiology of acute renal failure. I Correlation of ultrastructure and function in the proximal tubule of the rat following administration of mercuric chloride. *Virch. Arch. Cell.* 22(3): 173. 1976.
- [25] Miura, K., Mori, R. and Imura, N. Effects of selenium on mercury-induced renal lesions and on subcellular mercury distribution. *Ecotoxic and Environmental Safety.* 5: 35-367. 1981.
- [26] Murakami, T. *Biological specimen preparations for SEM.* Asakura-Shoten. Tokyo: 119-128. 1980.
- [27] Ormos, K. B. Regeneration of proximal tubules of the rat kidney following sublimate necrosis. *A Scanning Electron*

- Microscopic study. *Acta. Morph. Acad. Sci. Hung.* 27(3): 221-232. 1979.
- [28] Ortega, J. Evaluación del contenido de mercurio en especies marinas y sedimento en el Sistema Lago Maracaibo. Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia: 1-58. 1984.
- [29] Pfaller, W. and Klima, J. A critical reevaluation of the structure of the rat uriniferous tubule as revealed by scanning electron microscopy. *Cell Tiss. Res.* 166: 91-100. 1976.
- [30] Piscator, M. Toxic metals of clinical importance. *Prog. Clin. Biol. Res.* 77: 209-217. 1981.
- [31] Porter, K. R. and Bonneville, M. A. Fine structure of cells and tissues. Ed. Lea & Febiger. Fourth Edition: 103-117. 1973.
- [32] Rodin, A. E. and Crowson, C. N. Mercury nephrotoxicity in the rat. II Histochemical studies. *Am. J. Pathol.* 41: 485. 1962.
- [33] Siegel, F. L. and Bulger, R. E. Scanning and Transmission Electron Microscopy of mercuric chloride induced acute tubular necrosis in rat kidney. *Virch. Arch.* 18: 243-262. 1975 (a).
- [34] Siegel, F. L. and Bulger, R. E. Scanning and Transmission Electron Microscopy of rat kidney following low dose mercuric chloride administration. *Beitr. Path. Anat.* 156: 313-342. 1975 (b).
- [35] Turner, M. D., Marsh, D. O., Smith, C. J., Inglis, J. B., Clarkson, T. W., Rubio, C. E., Chiriboga, J. and Collazos, C. C. Methylmercury in populations eating large quantities of marine fish. *Arch. of Environ. Health.* Nov./Dec. 35(6): 367-378. 1980.
- [36] Verity, M. A. and Brown, N. J. Hg²⁺ induced kidney necrosis. Subcellular localization and structure-linked lysosomal enzyme changes. *Am. J. Pathol.* 61(1): 57-74. 1970.
- [37] Ware, R. A., Burkholder, P. M. and Chang, L. W. Ultrastructural changes in renal proximal tubules after organic mercury intoxication. *Environ. Res.* 10(1): 121-140. 1975.
- [38] Zalupus, R. K. and Diamond, G. L. Mercuric chloride induced nephrotoxicity in the rat following unilateral nephrectomy and compensatory renal growth. *Virch. Arch.* 53: 336-346. 1987.