

NECROSE HEMORRÁGICA RENAL NA DEFICIÊNCIA DE COLINA: PREVENÇÃO DA LESÃO PELO TRATAMENTO COM ALFA-METIL-DOPA

Roberto Silva Costa,¹ Marcos A. Rossi² e J. S. M. Oliveira³

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

RESUMO

Em estudos anteriores pudemos verificar que ratos recém-desmamados alimentados com dieta deficiente em colina apresentavam um aumento acentuado dos níveis de catecolaminas renais em comparação com ratos controles suplementados com colina, enquanto os níveis de acetilcolina não mostravam diferença. Como esse aumento de catecolaminas precedia a necrose hemorrágica renal, sugerimos que o predomínio do sistema simpático sobre o parasimpático poderia desempenhar um papel importante na patogênese da lesão renal na deficiência de colina. Para explorar melhor essa hipótese planejamos uma série de experimentos fazendo uso de drogas simpatolíticas, na tentativa

Manuscrito modificado recibido: 30-10-81.

- 1 Professor Assistente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14100 Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- 2 Professor Livre-Docente do Departamento de Patologia da mesma Faculdade.
- 3 Professor Adjunto do Departamento de Patologia a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

de prevenir a lesão renal na deficiência de colina. Neste trabalho relatamos os resultados obtidos com o uso de alfa-metil-Dopa em ratos alimentados com dieta deficiente em colina e ratos controles. Ratos machos Wistar foram divididos em 4 grupos: Grupo SC - alimentado com dieta suplementada com colina; Grupo SC + D - alimentado com dieta suplementada com colina e tratado com alfa-metil-Dopa; Grupo DC - alimentado com dieta deficiente em colina; Grupo DC + D - alimentado com dieta deficiente em colina e tratado com alfa-metil-Dopa. Os resultados do presente estudo, além de confirmar nossos achados anteriores, demonstraram claramente que o alfa-metil-Dopa tem um efeito preventivo significativo no desenvolvimento da lesão renal na deficiência de colina, paralelamente a uma tendência à diminuição dos níveis de catecolaminas renais. Por outro lado, o alfa-metil-Dopa não modificou a esteatose hepática provocada pela deficiência de colina, indicando claramente a existência de diferentes mecanismos envolvidos na patogênese da lesão renal e da esteatose hepática na deficiência de colina. Esses achados dão forte apoio adicional à teoria de que a necrose hemorrágica renal na deficiência de colina seria devida a um desequilíbrio entre os sistemas simpático e parasimpático, desequilíbrio esse causado por um excesso de catecolaminas renais.

INTRODUÇÃO

Esteatose hepática e necrose hemorrágica renal são as alterações patológicas mais comuns em ratos jovens alimentados com dieta deficiente em colina (1, 2). Apesar do mecanismo patogênico da esteatose hepática não estar esclarecido, os dados atuais levam a crer que o efeito inicial seria uma alteração na síntese e metabolismo dos fosfolipídios que contém colina, advindo então uma alteração na síntese e metabolismo das lipo-proteínas hepáticas, tanto as que serão liberadas para o plasma quanto as que irão constituir estruturalmente o sistema de membranas dos hepatócitos (2). De maneira similar, os níveis diminuídos dos fosfolipídios têm sido apontados como causa da lesão renal (3, 4). Contudo, tem-se demonstrado que antes do início da necrose renal não existe diferenças tanto na concentração quanto no conteúdo total de fosfolipídios renais entre ratos deficientes e ratos suplementados com colina, muito embora tal alteração de fosfolipídios acompanhe a lesão renal (5). Por outro lado, tem sido também postulado que a patogênese da necrose renal na deficiência de colina seria devida a um desequilíbrio entre catecolaminas vaso-constritoras e acetilcolina vaso-dilatadora consequente

a uma diminuição desta por falta de seu precursor. Esse desequilíbrio resultaria em vaso-espasmo, com conseqüente isquemia e necrose hemorrágica dos rins (6-8). Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório (9, 10) demonstraram um acentuado aumento dos níveis de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) nos rins de ratos deficientes em colina comparativamente a animais controles, enquanto os níveis de acetilcolina permaneceram inalterados. Como o aumento das catecolaminas renais precedeu a lesão morfológica, sugerimos que um desequilíbrio entre os sistemas simpático e parasimpático, com predomínio do simpático causado por um excesso de catecolaminas, exerceria um papel pato-genético importante na lesão renal na deficiência de colina. Para explorar melhor essa hipótese, planejamos uma série de experimentos com o uso de drogas bloqueadoras da atividade simpática, na tentativa de prevenir a lesão renal na deficiência de colina. Neste artigo relatamos os resultados obtidos com o uso de alfa-metil-Dopa, um depletor de catecolaminas teciduais endógenas (11-13).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos machos recém-desmamados da linhagem Wistar provenientes do Biotério Geral da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos durante 4 dias em nosso laboratório com dieta comercial até atingirem o peso médio de 47 g. Após, os animais foram divididos ao acaso em 4 grupos. Grupo SC: constituído de 8 animais alimentados com dieta suplementada com colina; Grupo SC + D: constituído de 8 animais alimentados com dieta suplementada com colina e tratados com alfa-metil-Dopa; Grupo DC: constituído de 15 animais alimentados com dieta deficiente em colina; Grupo DC + D: constituído de 14 animais alimentados com dieta deficiente em colina e tratados com alfa-metil-Dopa. Os grupos DC e DC + D tiveram um número maior de animais comparativamente aos grupos SC e SC + D em virtude da mortalidade que incide nos animais deficientes em colina. Os grupos tratados (SC + D e DC + D) foram submetidos a injeções intra-peritoniais diárias do 1o. ao 9o. dia de experimentação (300 mg/kg de peso corporal, dissolvido em solução de cloreto de sódio a 0.90/o). Os grupos SC e DC receberam apenas injeções intraperitoniais de solução salina. Os ratos foram mantidos em gaiolas metálicas individuais com fundo elevado e recebe-

ram água de torneira em tubos de vidro e dieta sólida em comedouros metálicos, ambos *ad libitum*. Foram pesados no primeiro, quinto e décimo dias do experimento, e o consumo de dieta sólida foi registrado no quarto, sétimo e décimo dias do experimento. As dietas sólidas suplementada e deficiente em colina encontram-se na Tabela 1. A mistura de vitaminas (sem colina) contém (mg/100 g): retinol (100.000 UI/g), 900; colecalciferol (200.000 UI/g), 50; alfa-tocoferol, 500; ácido ascórbico, 4.500; inositol, 500; menadiol, 225; ácido p-amino-benzóico, 500; niacina, 450; tiamina, 100; riboflavina, 100; piridoxina HCl, 100; pantotenato de cálcio, 300; biotina, 2; ácido fólico, 9; cianocobalamina, 0,135, e dextrose q.s.p. 100 gramas. A mistura salina (Association of Official and Agricultural Chemists) contém (g/100 g): NaCl, 13,94; KI, 0,079; KH_2PO_4 , 38,9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,73; CaCO_3 , 38,14; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,7; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,401; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,055; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,048, e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,002. Ambas as dietas são isocalóricas fornecendo 4,15 Kcal/g.

No décimo dia do experimento os animais sobreviventes foram sacrificados sob anestesia superficial com éter por secção da aorta abdominal. Ambos os rins foram removidos, examinados macroscopicamente e pesados. Os rins esquerdos de 8 ratos do grupo SC, 8 ratos do grupo SC + D, 11 ratos do grupo DC e 11 ratos do grupo DC + D, foram utilizados para extração e dosagem de catecolaminas de acordo com o método de Anton e Sayre (15, 16). Esse método envolve extração de catecolaminas com butanol, após prévia homogeneização do tecido na presença de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) em tampão fosfato (0,2M, pH 7,8) em que foi dissolvido um inibidor sulfidrílico, ácido paracloromercurifenilsulfônico (PCMPS), e retorno da amina a uma fase aquosa por eluição com ácido clorídrico 0,1 N. A dosagem de noradrenalina e adrenalina baseia-se na formação de um derivado fluorescente triidroxindólico pela oxidação do eluído na presença de ferricianeto de potássio seguida da adição de ascorbato alcalino. A fluorescência foi lida em espectrofluorímetro Aminco-Bowman. As leituras foram feitas em comprimentos de onda de excitação 409 a 422 nm e comprimentos de onda de emissão de 519 e 529 nm. Os valores de catecolaminas são dados em microgramas/grama de tecido úmido.

Os rins direitos, após a remoção, foram seccionados, fixados por imersão em solução tamponada de formalina a 40% durante 24 horas e incluídos em parafina. Secções de 6 micrometros de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e examinadas

TABELA 1

COMPOSIÇÃO DAS DIETAS SUPLEMENTADA COM COLINA E
DEFICIENTE EM COLINA (g/100 g)

Componentes (g/100 g)	Dieta suplementada com colina	Dieta deficiente em colina
Caseína *	15.0	15.0
Sacarose	70.5	70.7
Oleo de soja	8.0	8.0
Mistura salina	5.0	5.0
Mistura de vitaminas	1.0	1.0
Colina	0.2	—
Cisteína	0.3	0.3

* Caseína comercial submetida a tratamento (14) para torná-la livre de vitaminas.

em microscópio óptico. A intensidade da lesão renal foi quantificada de acordo com uma escala arbitrária de 0 a 4 (17): 0, sem alterações microscópicas; 1, alguma hiperemia e discretos focos de necrose cortical; 2, necrofocal mais extensa que no grau 1 e discreta hemorragia subcapsular; 3, necrose mais extensa que no grau 2 com áreas de hemorragia na cortex e moderada quantidade de cilindros hialinos nos túbulos medulares; 4, áreas confluentes de hemorragia e necrose na cortex com grande quantidade de cilindros nos túbulos medulares.

Fragmentos do lobo médio do fígado foram retirados e processados de maneira idêntica para estudo histológico. A esteatose hepática (vacuolização hepatocítica) foi quantificada de acordo com uma escala arbitrária de 0 a 5: 0, ausência de vacúolos; 1, vacuolização discreta; 2, vacuolização discreta a moderada; 3, vacuolização moderada; 4, vacuolização moderada a acentuada; 5, vacuolização acentuada. Todo o material histológico foi codificado de modo a permitir um estudo cego.

Para a análise estatística foi utilizado o teste "t" de Student (18). Diferenças entre médias com valores de probabilidade (P) menores que 0,05 foram consideradas significantes.

RESULTADOS

Quatro animais do grupo deficiente em colina (DC) e 3 animais do grupo deficiente em colina tratados com alfa-metil-Dopa (DC + D) morreram durante o experimento. A necrópsia revelou necrose hemorrágica renal bilateral, tendo esse material sido desprezado.

O consumo médio diário da dieta, o peso corporal e o índice de crescimento dos 4 grupos de animais estão expostos na Tabela 2. Os ratos deficientes em colina do grupo DC mostraram um menor ganho de peso corporal em comparação com os animais controles (SC). Esse menor ganho de peso corporal acentuou-se nos animais deficientes em colina tratados com alfa-metil-Dopa (grupo DC + D). Por outro lado, o índice de crescimento dos ratos suplementados com colina tratados com alfa-metil-Dopa (SC + D) não diferiu significativamente dos ratos do grupo SC, embora houvesse uma tendência dos ratos do grupo SC + D a ganhar menos peso que os ratos SC.

O peso absoluto do rim esquerdo dos ratos DC ($631,0 \pm 69,9$) foi significativamente maior que os valores correspondentes nos ratos SC ($415,0 \pm 29,0$) e DC + D ($453,6 \pm 53,8$). Por outro lado, o peso absoluto do rim dos animais SC não foi significativamente diferente dos valores correspondentes nos animais SC + D ($385,0 \pm 26,2$) e DC + D. Paralelamente, como mostrado na Tabela 3, somente o peso absoluto do rim dos animais do grupo DC foi significativamente maior que os correspondentes valores esperados de peso renal para animais controles de mesmo peso corporal. Com a finalidade de se poder analisar os pesos renais médios de animais com diferentes pesos corporais médios, foram coletados dados de peso corporal e peso renal de um grande número de ratos machos Wistar pesando entre 50 e 450 g. Dessa maneira, pode ser traçada uma curva de peso renal em relação a peso corporal tornando possível o confronto dos pesos renais dos grupos SC, SC + D, DC e DC + D com os pesos renais de animais controles de mesmo peso corporal (valor esperado). Procedimento idêntico a este foi utilizado em nosso laboratório para a análise comparativa de peso de coração (19).

Todos os animais dos grupos SC (grau de necrose renal $0,12 \pm 0,12$) e SC + D (grau de necrose renal $0,00$) mostraram rins normais ao exame macro e microscópico, exceto um animal do grupo SC que exibiu grau 1 de necrose renal. Em contrapartida, os ratos do grupo DC apresentaram grau de necrose renal ($2,54$

TABELA 2

PESO CORPORAL, INDICE DE CRESCIMENTO E CONSUMO DE DIETA

Grupos	Peso corporal (g)		Indice de crescimento	Consumo de dieta	
	Inicial	Final	g/dia/rato	g/dia/rato	g/100 g
SC	47,0 ± 2,3 (8)	75,5 ± 5,1 (8)	2,85 ± 0,34 (8)	8,67 ± 0,63 (8)	11,46 ± 0,26 (8)
SC +D	47,4 ± 2,5 (8)	67,4 ± 4,8 (8)	2,00 ± 0,38 (8)	8,21 ± 0,61 (8)	12,20 ± 0,30 (8)
DC	47,6 ± 1,3 (15)	66,9 ± 3,6 (11)	1,83 ± 0,27 (11)	8,01 ± 0,49 (11)	11,99 ± 0,48 (11)
DC +D	47,7 ± 1,1 (14)	59,2 ± 2,4 (11)	1,04 ± 0,18 (11)	7,62 ± 0,47 (11)	12,80 ± 0,40 (11)
SC x SC+D	NS	NS	NS	NS	P < 0.05
SC x DC	NS	NS	P < 0.025	NS	NS
SC x DC+D	NS	P < 0.01	P < 0.0025	NS	NS
DC x DC+D	NS	P < 0.05	P < 0.025	NS	NS

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média, com o número de animais entre parênteses.

NS = Estatisticamente não significante.

SC = Grupo suplementado com colina.

SC+D = Grupo suplementado com colina e tratado com alfa-metil-Dopa.

DC = Grupo deficiente em colina.

DC+D = Grupo deficiente em colina e tratado com alfa-metil - Dopa.

TABELA 3

PESO DO RIM ESQUERDO, GRAU DE NECROSE RENAL, GRAU DE ESTEATOSE HEPATICA E NIVEIS DE CATECOLAMINAS (NORADRENALINA E ADRENALINA) RENAIIS

Grupos	Peso do rim esquerdo (mg)			P*	Grau de necrose renal	Grau de esteatose hepática	Noradrenalina (µg/rim)	Adrenalina (µg/rim)
	Observado	Esperado	% do esperado					
SC	415,0 ± 29,0 (8)	421,6	98,43	NS	0,12 ± 0,12 (8)	0	0,079 ± 0,006 (8)	0,0081 ± 0,0017 (8)
SC+D	385,0 ± 26,2 (8)	400,0	96,25	NS	0 (8)	0,12 ± 0,12 (8)	0,070 ± 0,004 (8)	0,0139 ± 0,0023 (8)
DC	631,0 ± 69,9 (11)	394,7	159,86	P < 0,005	2,54 ± 0,48 (11)	4,10 ± 0,50 (11)	0,117 ± 0,016 (11)	0,0380 ± 0,0091 (11)
DC+D	453,6 ± 53,8 (11)	371,0	122,20	NS	1,00 ± 0,47 (11)	3,80 ± 0,56 (11)	0,096 ± 0,017 (10)	0,0260 ± 0,0093 (10)
SC x SC + D	NS				NS	NS	NS	P < 0,05
SC x DC	P < 0.01				P < 0,001	P < 0,0001	P < 0,025	P < 0,0025
SC x DC + D	NS				P < 0,05	P < 0,0001	NS	P < 0,05
DC x DC + D	P < 0.05				P < 0,025	NS	NS	NS

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média, com o número de animais entre parênteses.

NS = Estatisticamente não significante.

P* = Valor observado versus valor esperado.

SC = Grupo suplementado com colina.

SC+D = Grupo suplementado com colina e tratado com alfa-metil - Dopa.

DC = Grupo deficiente em colina.

DC+D = Grupo deficiente em colina e tratado com alfa-metil-Dopa.

$\pm 0,48$) acentuado, valor este significativamente maior que o dos ratos do grupo DC + D ($1,00 \pm 0,47$).

O conteúdo total de noradrenalina e adrenalina nos rins dos ratos dos grupos DC + D ($0,096 \pm 0,017 \mu\text{g}/\text{rim}$ e $0,0260 \pm 0,0093 \mu\text{g}/\text{rim}$, respectivamente) e DC ($0,117 \pm 0,016 \mu\text{g}/\text{rim}$ e $0,0380 \pm 0,0091 \mu\text{g}/\text{rim}$, respectivamente) não foram estatisticamente diferentes, embora houvesse uma tendência à queda nos ratos DC + D. O conteúdo total de noradrenalina e adrenalina dos ratos do grupo DC foi significativamente maior que os respectivos valores dos ratos do grupo SC ($0,079 \pm 0,006 \mu\text{g}/\text{rim}$ e $0,0081 \pm 0,0017 \mu\text{g}/\text{rim}$, respectivamente). Paralelamente, o conteúdo total de noradrenalina nos rins dos ratos do grupo DC + D não mostrou diferença quando comparado aos animais do grupo SC, enquanto que o conteúdo total de adrenalina daqueles mostrou-se maior que o destes. O conteúdo total de noradrenalina dos ratos SC e SC + D ($0,070 \pm 0,0040 \mu\text{g}/\text{rim}$) também não mostrou diferença, embora o conteúdo total de adrenalina deste último grupo ($0,0139 \pm 0,0023 \mu\text{g}/\text{rim}$) fosse maior (Tabela 3 e Figura 1).

Macroscopicamente os fígados dos animais deficientes em colina (grupos DC e DC + D) mostraram-se amarelados, ao contrário dos fígados dos animais dos grupos suplementados com colina (grupos SC e SC + D) cujo aspecto era vermelho-acastanhado. Microscopicamente os fígados dos animais deficientes em colina apresentaram acentuada vacuolização hepatocítica que tomava todo o lóbulo hepático, enquanto que os animais suplementados com colina apresentaram estrutura hepática normal (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente experimento confirmaram nossas observações anteriores (9, 10) mostrando que a deficiência de colina em ratos jovens induz, paralelamente à necrose hemorrágica renal, um aumento significativo do conteúdo total de noradrenalina e adrenalina nos rins desses animais. Além disso, verificamos que o alfa-metil-Dopa teve um efeito preventivo significativo no desenvolvimento da lesão renal na deficiência de colina, paralelamente a uma tendência à diminuição dos níveis de catecolaminas renais. Por outro lado, o alfa-metil-Dopa não modificou a esteatose hepática provocada pela deficiência de colina, indicando claramente a existência de diferentes mecanismos envolvidos na patogênese da lesão renal e da esteatose hepática induzidas por deficiência de colina.

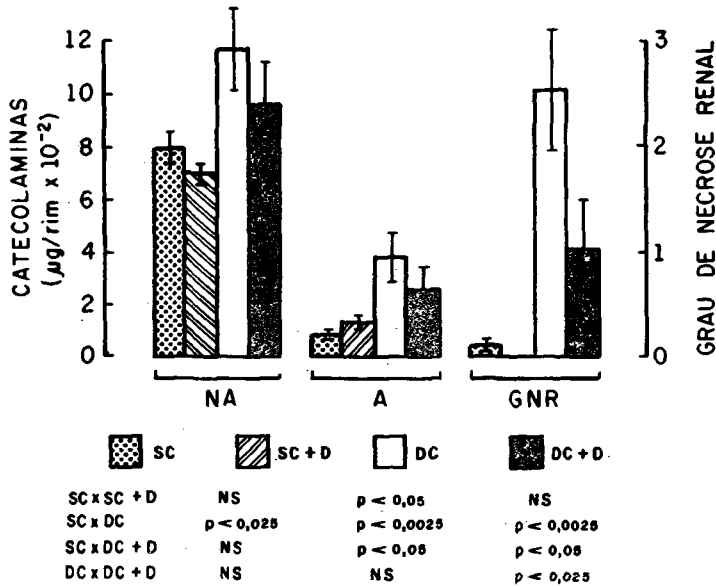


FIGURA 1

Conteúdo total de noradrenalina (NA) e adrenalina (A) nos rins e grau de necrose renal (GNR) de ratos suplementados com colina (SC), ratos suplementados com colina e tratados com alfa-metil-Dopa (SC+D), ratos deficientes em colina (DC) e ratos deficientes em colina e tratados com alfa-metil-Dopa (DC+D). As barras verticais representam o erro padrão da média

Dados recentes (8) mostraram que ratos deficientes em colina mostram uma tendência a excretar níveis mais elevados de catecolaminas na urina comparativamente a ratos controles e que esses ratos deficientes quando tratados com reserpina, um agente depletor de catecolaminas no sistema nervoso central e periférico, apresentam um grau de necrose renal significativamente menor paralelamente a uma excreção diminuída de catecolaminas comparativamente aos animais deficientes em colina não tratados com reserpina. Estes fatos levaram os autores a apoiar a teoria do desequilíbrio entre catecolaminas vasoconstritoras e acetilcolina vasodilatadora, na patogênese da lesão renal na deficiência de colina.

É fato estabelecido que alfa-metil-Dopa depleta o conteúdo tecidual de catecolaminas principalmente pela formação de falsos neurotransmissores (alfa-metil-noradrenalina e alfa-metil-dopamina) que deslocam o transmissor fisiológico de seus grânulos de estoque (11-13). Além disso, alfa-metil-Dopa tem também um efeito de limitar a síntese de catecolaminas através de uma inibição de Dopa-descarboxilase (13, 20, 21). Na maioria dos sítios efetores das catecolaminas o falso neurotransmissor atua com efeito fisiológico menor, mas nunca desprezível, em comparação com o transmissor não metilado verdadeiro (22). O efeito fisiológico do falso neurotransmissor depende da liberação e recaptação do verdadeiro transmissor e da sua interação com os sítios receptores (23). Tratamento prolongado com alfa-metil-Dopa induz a depleção dos estoques periféricos de noradrenalina com acúmulo das aminas alfa-metiladas. Desse modo, a quantidade total de catecolaminas nos tecidos com inervação adrenérgica pode exceder o conteúdo normal de noradrenalina (24, 25). Estes fatos explicam os níveis relativamente altos de catecolaminas nos rins dos ratos deficientes em colina tratados com alfa-metil-Dopa, e inclusive o porque da proteção fornecida pela droga não ter sido perfeita.

Em conclusao, as observações da presente investigação, somadas às anteriores (9, 10), dão forte apoio à teoria segundo a qual a necrose hemorrágica renal na deficiência de colina em ratos jovens seria devida a um desequilíbrio entre os sistemas simpático e parassimpático, desequilíbrio este em consequência de um excesso de catecolaminas renais. Com efeito, a participação de receptores adrenérgicos no desenvolvimento da insuficiência renal aguda, provavelmente através da liberação de renina, já foi demonstrada (26, 27). Além disso, sabe-se que as catecolaminas também afetam a membrana celular dos túbulos renais alterando a bomba de sódio (28, 29). Por outro lado, as alterações renais da deficiência de colina são bastante semelhantes à necrose cortical bilateral, uma lesão renal humana associada a várias situações patológicas aparentemente não relacionadas mas de origem provavelmente isquêmica (30-32). Paralelamente, demonstrou-se (33) a semelhança entre as lesões renais observadas em cães injetados com adrenalina intraperitonealmente e a necrose cortical bilateral. Finalmente, os presentes resultados indicam claramente a existência de diferentes mecanismos envolvidos na patogênese da necrose renal e da esteatose hepática na deficiência de colina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Merck Sharp e Dohme (Merck Sharp & Dohme Indústria Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil) pela doação do alfa-metil-Dopa utilizado na presente investigação; à Sandoz do Brasil e CNPq pelo suporte financeiro.

SUMMARY

PREVENTION OF KIDNEY HEMORRHAGIC NECROSIS OF CHOLINE-DEFICIENT RATS BY ALPHA-METHYL-DOPA TREATMENT

In a previous report 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 changes in tissue catecholamines occurred before there were kidney lesions, we have suggested that an imbalance between the sympathetic and parasympathetic systems plays an important role in the pathogenesis of renal injury in choline-deficient rats, this imbalance being the result of an excess of catecholamines in the kidneys. A series of experiments was then planned to explore this theory further by administering sympatholytic drugs, in an attempt to prevent the development of renal injury in choline deficiency.

Results concerning the administration of alpha-methyl-Dopa, a drug that depletes the tissue stores of catecholamines, in choline-deficient and choline-supplemented rats are herein reported. Young male Wistar rats were randomly assigned to four groups: group CS, fed a choline-supplemented diet; group CS+D, fed a choline-supplemented diet and treated with alpha-methyl-Dopa; group CD, fed a choline-deficient diet; and group CD+D, fed a choline-deficient diet and treated with alpha-methyl-Dopa. The appropriate groups received daily intraperitoneal injections of alpha-methyl-Dopa (300 mg/kg of body weight). The kidneys of all surviving rats were then studied grossly and histologically, and the levels of noradrenaline and adrenaline determined. All animals from control groups CS and CS+D showed essentially normal kidneys on gross and light microscopic examination. On the other hand, CD rats showed a marked renal injury, while the kidneys lesions of CD+D animals were significantly less pronounced than those of rats from group CD. The total content of noradrenaline and adrenaline in the kidneys of CD+D and CD rats was not statistically different, although the CD + D animals tended to have lower levels of catecholamines. The noradrenaline and adrenaline content of

rats from group CD was significantly higher than the corresponding values in CS rats. Furthermore, the total content of renal noradrenaline of CD+D animals was found to be unaltered when compared to CS rats, while their adrenaline content was found to be higher than the corresponding value in the CS group. The noradrenaline levels of CS and CS+D rats were similar, but the latter group had a higher renal adrenaline content than the former. These findings, besides confirming our previous observations, clearly show that alpha-methyl-Dopa had a protective effect against the renal injury of choline deficiency, thus providing 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.

BIBLIOGRAFIA

1. Engel, R. W. & W. D. Salmon. Improved diets for nutritional and pathological studies of choline deficiency in young rats. **J. Nutrition**, **22**: 109-121, 1941.
2. Kuksis, A. & S. Mookerjee. Choline. **Nutr. Rev.**, **36**: 201-207, 1978.
3. Patterson, J. M. & E. W. McHenry. 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.**, **156**: 265-269, 1944.
4. Monserrat, A. J., E. A. Porta, A. K. Ghoshal & S. B. Hartman. Sequential lipid changes in weanling rats fed a choline-deficient diet. **J. Nutrition**, **104**: 1496-1502, 1974.
5. Simon, J. B., R. Sheig & G. Klatskin. Relationship of early lipid changes in kidney and liver to the hemorrhagic renal necrosis of choline-deficient rats. **Lab. Invest.**, **19**: 503-509, 1968.
6. Wolbach, S. B. & O. A. Bessey. Tissue changes in vitamin deficiencies. **Physiol Rev.**, **22**: 233-289, 1942.
7. Nagler, A. L., W. D. Dettbarn, E. Seifter & S. M. Levenson. Tissue levels of acetylcholine and acetylcholinesterase in weanling rats subjected to acute choline deficiency. **J. Nutrition**, **94**: 13-19, 1968.
8. Bruce, J. R., H. J. Weise & M. K. Carter. The effects of reserpine on renal necrosis and urinary catecholamines of choline-deficient rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **36**: 607-610, 1976.
9. Costa, R. S., M. A. Rossi & J. S. M. Oliveira. Pathogenesis of the renal injury in choline deficiency: The role of catecholamines and acetylcholine. **Brit. J. Exp. Pathol.**, **60**: 613-619, 1979.
10. Rossi, M. A. & R. S. Costa. Catecholamine and acetylcholine levels of the kidney in weanling rats fed a choline-deficient diet. **J. Neural**

- Transm.**, **47**: 79-87, 1980.
11. Maître, L. & M. Staehelin. On the norepinephrine replacement by alpha-methyl-norepinephrine in the rat after treatment with alpha-methyl-dopa. **Experientia**, **23**: 810-811, 1967.
 12. Henning, M. Studies on the mode of action of α -methyl-dopa. **Acta Physiol. Scand. Suppl.** **322**: 1-37, 1969.
 13. Pletscher, A. The impact of monoamine research on drug development. In: **Frontiers in Catecholamine Research**. E. Usdin and S. Snyder (Eds.) Elmsford, N.Y., Pergamon Press Inc., 1973, p. 27-37.
 14. El Sadr, M. M., T. F. Macrae & E. Work. The estimation of riboflavin. **Biochem. J.**, **34**: 601-602, 1940.
 15. Anton, A. H. & D. F. Sayre. A study of the factors affecting the aluminum oxide trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **138**: 360-375, 1962.
 16. Anton, A. H. & D. F. Sayre. Possible sources of error in solvent extraction procedures for catecholamines. **Eur. J. Pharmacol.**, **4**: 435-440, 1968.
 17. Levenson, S. M., M. Stanley, A. L. Nagler, E. F. Greever & E. Seifter. Acute choline deficiency in germ-free, conventionalized and open-animal-room rats: Effects of neomycin, chlortetracycline, vitamin B₁₂ and coprophagy prevention. **J. Nutrition**, **95**: 247-270, 1968.
 18. Snedecor, G. W. & W. G. Cochran. **Statistical Methods**. 6th ed. Ames, Iowa, Iowa State University Press, 1967, p. 91-119.
 19. Rossi, M. A., J. S. M. Oliveira, S. Zucoloto, O. Pissaiá & R. S. Costa. Effect of protein-calorie malnutrition on catecholamine levels and weight of heart in rats. **J. Neural Transm.**, **48**: 85-99, 1980.
 20. Sourkes, T. L. Inhibition of dihydroxyphenylalanine decarboxylase by derivatives of phenylalanine. **Arch. Biochem.**, **51**: 444-456, 1954.
 21. Sourkes, T. L., G. F. Murphy & A. Rabinovitch. Conversion of DL-m-tyrosine to dopamine in the rat. **Nature**, **189**: 577-578, 1961.
 22. Muscholl, E. Adrenergic false transmitters. In: **Catecholamines**. H. Blaschko and E. Muscholl (Eds.), Berlin. Springer-Verlag, 1972, p. 618-660.
 23. Shore, P. A. Transport and storage of biogenic amines. **Ann. Rev. Pharmacol.**, **12**: 209-222, 1972.
 24. Maître, L., M. Meir, P. R. Hedwall & H. Brunner. Veränderungen des Catecholamingehaltes im Herzen und Gehirn von Ratten nach Behandlung mit α -methylierter catecholaminanalogen. **Arch. Exp. Path. Pharmacol.**, **255**: 4, 1966.
 25. Brunner, H., P. R. Hedwall, L. Maître & M. Meier. Antihypertensive effects of alpha-methylated catecholamine analogues in the rat. **Brit. J. Pharmac. Chemother.**, **30**: 108-122, 1967.

26. Iaina, A., A. Solomon, & H. E. Eliahou. Reduction in severity of acute renal failure in rats beta-adrenergic blockade. *Lancet*, **2**: 157-159, 1975.
27. Eliahou, H. E., A. Solomon, A. Iaina, R. Oshman & I. Serban. Alleviation of acute anoxic renal failure in rats β_1 -adrenergic blockade with practolol. *Israel J. Med. Sci.*, **14**: 274-278, 1978.
28. Gill, J. R. Jr. & A. G. T. Casper. Depression of proximal tubular sodium reabsorption in the dog in response to renal beta-adrenergic stimulation by isoproterenol. *J. Clin. Invest.*, **50**: 112-118, 1971.
29. Zambranski, E. J., G. F. DiBona & G. J. Kaloyianides. Effects of sympathetic blocking agents on the antinatriuresis of reflex renal nerve stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **198**: 464-472, 1976.
30. Christensen, K. Renal changes in the albino rat on low choline and choline-deficient diets. *Arch. Pathol.*, **34**: 633-646, 1942.
31. Moore, H. C. The acute renal lesions produced by choline deficiency in the male weanling rat. *J. Pathol., Bacteriol.*, **74**: 171-184, 1957.
32. Anderson, W. A. D. & D. B. Jones. Kidneys. In: *Pathology*. W. A. D. Anderson (Ed.). St. Louis, Mo., The C. V. Mosby Company, 1971, p. 773-827.
33. Penner, A. & A. I. Bernheim. Acute ischemic necrosis of the kidneys. A clinicopathologic and experimental study. *Arch. Pathol.*, **30**: 465-480, 1940.