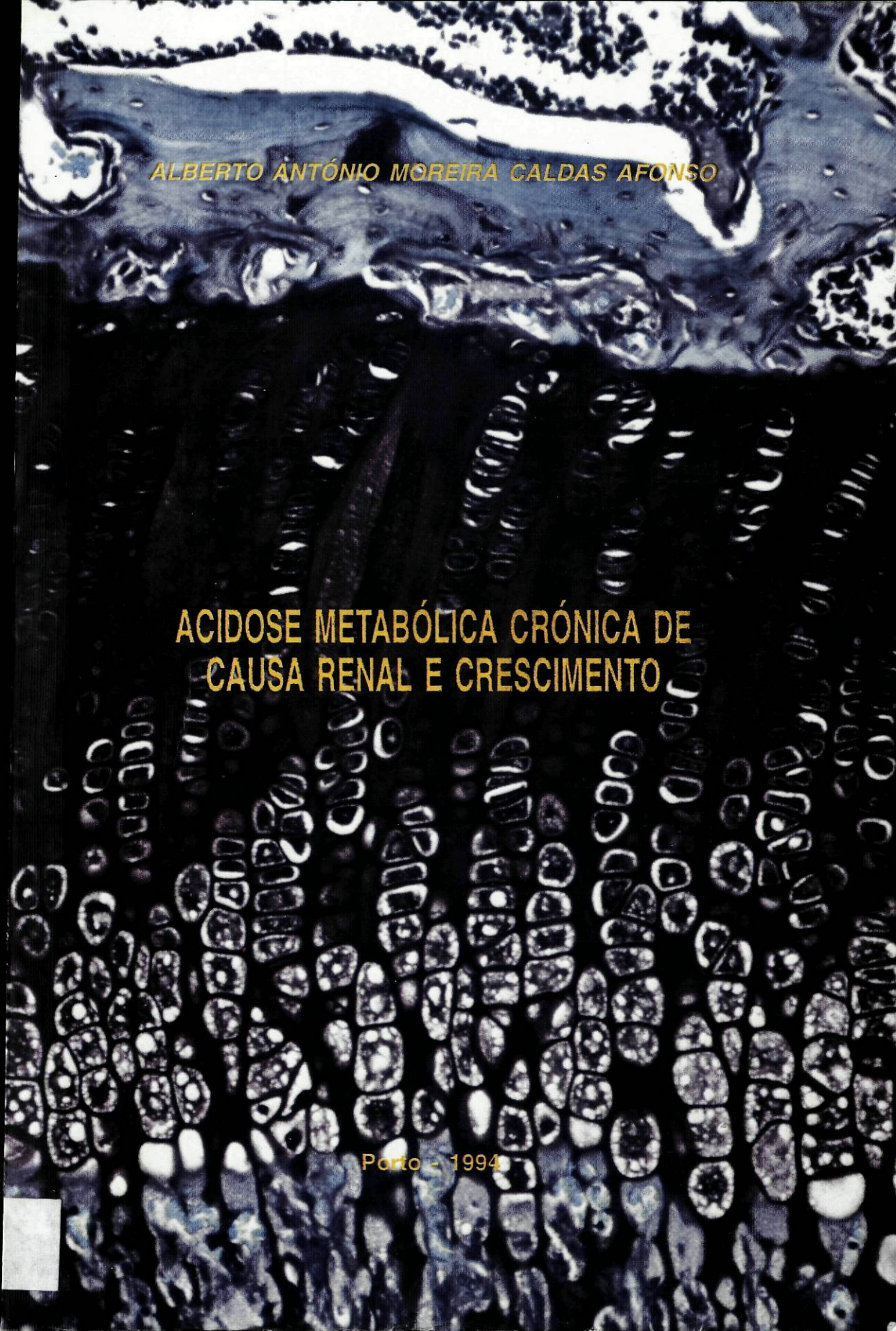
ALBERTO ANTÓNIO MOREIRA CALDAS AFONSO



ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL E CRESCIMENTO

Porto - 1994

ALBERTO ANTÓNIO MOREIRA CALDAS AFONSO

ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL E CRESCIMENTO

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Porto - 1994

A todas as Crianças

Este trabalho foi realizado com apoio de uma Bolsa para Doutoramento no Estrangeiro, concedida pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (JNICT) (processo nº BD/631/90-ID).

Esta dissertação não teria sido possível sem o contributo que tiveram para a minha formação os meus professores, desde o ensino primário ao universitário na Faculdade de Medicina do Porto, onde me formei e honro pertencer.

Ao Sr. Professor Doutor Norberto Teixeira dos Santos, venho em primeiro lugar agradecer toda a disponibilidade e o empenho na orientação deste trabalho. Não posso deixar de referir que a seu lado iniciei a minha carreira como investigador e o meu interesse pelos estudos da criança. Como Assistente de Pediatria tive o privilégio de com ele colaborar e apreciar no dia a dia, a sua profunda e brilhante formação humana e científica. Também, e no decurso da minha formação, lhe devo ainda ter-me possibilitado a realização de um estágio de dois anos e meio no Serviço de Nefrologia Pediátrica do Hospital Necker Enfants-Malades em Paris, mantendo sempre uma presença encorajadora e conselhos necessários à realização deste estudo. Foi igualmente sob a sua superior direcção e orientação que efectuei toda a minha preparação médica, no Serviço de Pediatria do Hospital de S. João / Faculdade de Medicina do Porto.

Acima de tudo, sempre encontrei no Professor Doutor Norberto Teixeira dos Santos mais que um chefe, um verdadeiro amigo a quem dedico o meu mais sincero reconhecimento.

Ao Sr. Professor Michel Broyer, Professor do Departamento de Pediatria do Hospital Necker Enfants-Malades da Universidade Necker de Paris, agradeço de uma forma especial toda a disponibilidade, interesse e entusiasmo sempre manifestados durante a preparação deste trabalho. Ele

foi, e será para mim, o exemplo mais vivo da exigência, da perseverança e da capacidade de trabalho na realização de qualquer estudo quer de índole clínico quer experimental. Com ele adquiri grande parte dos meus conhecimentos sobre as alterações do crescimento associadas a patologia renal, que muito úteis e imprescindíveis me foram para a interpretação dos resultados desta dissertação.

À Senhora Drª Claire Kleinknecht, mulher de extraordinária envergadura moral e profissional, de quem tudo o que possa escrever não ilustra nem de perto o quanto lhe devo por todo o apoio que me deu. Nela encontrei sempre uma amiga que depositou confiança na minha capacidade, que me orientou com competência, calor humano e paciência e me incutiu o rigor da investigação experimental. Aqui lhe presto a minha sincera homenagem.

Ao Dr. Saad Maniar, pela colaboração preciosa que me dispensou na realização de todo o trabalho experimental. Com ele construí uma sólida amizade que muito me honra. Aqui lhe afirmo o meu reconhecido agradecimento.

Ao Sr. Professor Doutor Levi Guerra, quero agradecer o valor das suas opiniões sempre críticas e pertinentes sobre alguns dos meus trabalhos, bem como a sua total e amiga disponibilidade em todas as ocasiões a que a ele recorri.

O sincero reconhecimento ao meu amigo e companheiro Manuel Fontoura, com quem compartilhei momentos difíceis e outros bem agradáveis que marcaram o início deste meu trabalho em França.

A todos os colegas do Serviço de Pediatria em particular às Drªs Matilde Barreira e Helena Jardim da Unidade de Nefrologia Pediátrica, a todos os colegas da minha equipa de urgência em particular o Dr. José Pinho, bem como os docentes da disciplina de Clínica Pediátrica e Pediatria Social da Faculdade de Medicina do Porto, o meu sincero agradecimento pela ajuda e trabalho extra que realizaram ao substituir-me nas actividades hospitalares e docentes.

A todo o pessoal do Serviço de Nefrologia Pediátrica (Director: Professeur Michel Broyer) do Hôpital Necker Enfants-Malades e da Unidade de Fisiologia e Genética das Nefropatias da Criança, INSERM-U-192, em Paris, França, a minha mais profunda gratidão por toda a colaboração prestada na realização deste trabalho.

Finalmente o meu obrigada à minha mulher, Maria Teresa, às minhas filhas, Teresa Joana, Ana Rita e Sara Margarida e aos meus pais e sogros, pelo apoio e coragem com que sempre me senti confortado, durante os anos que levaram até à conclusão desta dissertação.

Para os doentes incluídos neste estudo e seus pais, e que assim contribuiram para a sua concretização, vai também o meu agradecimento, na esperança de que eles próprios e outras crianças dele venham a beneficiar.

O Decreto-Lei nº 388/70, Artº 8º, parágrafo 2, refere: "É admitido na elaboração da dissertação, o aproveitamento, total ou parcial, do resultado de trabalhos já publicados, mesmo em colaboração, devendo, neste caso, o candidato esclarecer qual a sua contribuição pessoal".

Alguns resultados apresentados nesta dissertação foram publicados:

Caldas A, Broyer M, Dechaux M: Achievement and maintennance of normal stature with alkali therapy in infants and children with classic renal tubular acidosis. *Pediatric Nephrology*, 1(4):C108, 1987.

Caldas A, Maniar S, Laouari D,Kleinknecht C: Role of chronic metabolic acidosis on calcium metabolism in uremic and non uremic rats. *Pediatric Nephrology*, 5(5):C23, 1991.

Caldas A, Maniar S, Souberbielle JC, Cournot G, Kleinknecht C: Reduced bone formation rate (BFR) and plasma IGF_1 levels in chronic metabolic acidosis (CMA) with and without uremia. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2(3):609, 1991.

Caldas A, Richard M, Maniar S, Laouari D, Dechaux M, Favier A, Kleinknecht C: Zinc bone loss in chronic renal failure and chronic metabilic acidosis. *Biological Trace Elements Recherche*, 32:339-348, 1992.

Maniar S, Caldas A, Laouari D, Kleinknecht C: Severity of chronic metabolic acidosis and growth of rats with chronic uremia. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 18:241-244, 1992.

Maniar S, Laouari D, Caldas A, Kleinknecht C: Protein synthesis and growth in uremic rats with and without chronic metabolic acidosis. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 18:250-252, 1992

Caldas A, Maniar S, Laouari D, Garabédian M, Cournot G, Kleinlnecht C: Chronic metabolic acidosis (CMA) - induced bone alterations are not mediated by changes in vitamin D metabolism and parathormone (PTH) secretion. *Pediatric Nephrology*, 6(5):C172, 1992.

Caldas A, Dechaux M, Kleinknecht C. Broyer M: Primary distal renal acidosis in children. Long term follow-up of 28 patients. *Journal of Pediatric*, 121:233-241, 1992.

Caldas A, Fontoura M: 24 hour GH secretion in chronic metabolic acidosis (CMA) of renal origin.*Hormon Recherch*, 37(4):58,1992.

Caldas A, Fontoura M: Effects of Chronic Metabolic Acidosis (CMA) in 24 Hour Growth Hormone Secretion. *Journal of the American Society of Nephrology*, 4(3),828, 1993.

Nestes trabalhos coube-me a recolha de grande parte dos dados, elaboração dos resultados e do manuscrito.

ÍNDICE

I ABREVIATURAS 1

II - PREFÁCIO 3

III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7

III.1 - POSIÇÃO DO PROBLEMA 8

IV - MATERIAL E MÉTODOS 21

IV.1 - ESTUDO 1: CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO PUBERTÁRIO E ESTATURA FINAL NA ACIDOSE TUBULAR DISTAL 25

1.1 - POPULAÇÃO 25

1.2 - INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL 26

1.3 - INVESTAGAÇÃO RADIOLÓGICA 28

1.4 - CRESCIMENTO 29

1.5 - TRATAMENTO DA ACIDOSE 31

IV.2 - ESTUDO 2: SECREÇÃO DA HORMONA DE CRESCIMENTO, NA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL 32

2.1 - POPULAÇÃO 32

2.2 - ESTATURA, DESENVOLVIMENTO PUBERTÁRIO E IDADE ÓSSEA 33

2.3 - PROTOCOLO DE ESTUDO 33

2.4 - ESTUDOS HORMONAIS E ÁCIDO-BASE 35

IV.3 - ESTUDO 3: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL NO CRESCIMENTO: EFEITO SOBRE O METABOLISMO FOSFOCÁLCICO, ÓSSEO E PROTEICO 37

3.1 - ANIMAIS E CIRURGIA 37

3.2 - REGIMES ALIMENTARES 40

3.3 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL 43

3.3.1 - EXPERIÊNCIA I: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO ATRASO DO CRESCIMENTO 45

3.3.2 EXPERIÊNCIA II: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO METABOLISMO FOSFOCÁLCICO E ÓSSEO 47

3.3.3 - EXPERIÊNCIA III: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO METABOLISMO PROTEICO 49

3.4 - MEDIÇÕES E TÉCNICAS 50

3.4.1 - DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS E URINÁRIAS 50

3.4.2 - METABOLISMO FOSFOCÁLCICO E ÓSSEO 53

3.4.2 - a) Balanço fosfocálcico 53

3.4.2 - b) Conteúdo mineral ósseo 54

3.4.2 - c) Histomorfometria óssea 54

3.4.3 - METABOLISMO PROTEICO 58

3.4.3 - a) Velocidade de síntese proteica: 58

a1) - Princípios e cálculos 58

a2) - Técnicas 59

3.4.4 - b) Velocidade de crescimento e degradação proteica 63

IV.3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA 64

V - RESULTADOS 67

V.1 ESTUDO 1: CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO PUBERTÁTIO E ESTATURA FINAL NA ACIDOSE TUBULAR DISTAL 68

1.1 - CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO, DADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E RADIOLÓGICOS 68

1.2 - CRESCIMENTO: ESTATURA INICIAL, EVOLUÇÃO ESTATURAL E DA VELOCIDADE DE CRESCIMENTO APÓS O INÍCIO DO TRATAMENTO, CRESCIMENTO PUBERTÁRIO E ESTATURA ADULTA 74

1.3 - TRATAMENTO 90

V.2 - ESTUDO 2: SECREÇÃO DA HORMONA DE CRECIMENTO, NA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL 91

2.1 - CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO 91

2.2 - EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE 92

2.3 - PERFIS DE SECREÇÃO DE 24 HORAS DA HORMONA DE CRESCIMENTO 92

2.4 - TESTES DE ESTIMULAÇÃO FARMACOLÓGICOS DA HORMONA DE CRESCIMENTO 95

2.5 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DO FACTOR 1 DO CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA 97

V.3 - ESTUDO 3: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL NO CRESCIMENTO: EFEITO SOBRE O METABOLISMO FOSFOCÁLCICO, ÓSSEO E PROTEICO 100

3.1 - EXPERIÊNCIAI: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO ATRASO DO CRESCIMENTO 100

3.1.1 - EQUILÍBRIO ÁCIDO BÁSICO E FUNÇÃO RENAL 100

3.1..2 - CONSUMO ALIMENTAR 102

3.1.3 - CRESCIMENTO 104

3..2 - EXPERIÊNCIA II: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO METABOLISMO FOSFOCÁLCICO E ÓSSEO 106

3.2.1 - DADOS NUTRICIONAIS E PLASMÁTICOS 106

3.2..2 - DADOS URINÁRIOS 108

3.2.3 - DADOS SOBRE O METABOLISMO FOSFOCÁLCICO 111

3.2.4 - DADOS ÓSSEOS 111

3.2.5 - DADOS HORMONAIS 114

3.3 - EXPERIÊNCIA III: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO METABOLISMO PROTEICO 118

3.3.1 - DADOS PLASMÁTICOS 118

3.3..2 - DADOS NUTRICIONAIS 120

3.3.3 - DADOS DA SÍNTESE E DEGRADAÇÃO PROTEICA 122

VI - DISCUSSÃO 125

VI .1 - ESTUDO 1: CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO PUBERTÁRIO E ESTATURA FINAL NA ACIDOSE TUBULAR DISTAL 126

VI.2 - ESTUDO 2: SECREÇÃO DA HORMONA DE CRESCIMENTO, NA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL 137

VI.3 - ESTUDO 3: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL NO CRESCIMENTO: EFEITO SOBRE O METABOLISMO FOSFOCÁLCICO, ÓSSEO E PROTEICO 142

VI.3.1 - EXPERIÊNCIA I: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO ATRASO DO CRESCIMENTO 142

VI.3.2 - EXPERIÊNCIA II: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO METABOLISMO FOSFOCÁLCICO E ÓSSEO 147

VI.3.3. - EXPERIÊNCIA III: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO METABOLISMO PROTEICO 164

VII - CONCLUSÕES 179

VIII - SUGESTÕES 189

IX - RESUMO 195

X - SUMMARY 205

XI - BIBLIOGRAFIA 215

ABREVIATURAS MAIS UTILIZADAS

AMC	-	Acidose metabólica crónica
ATR	-	Acidose tubular renal
ATR_2	-	Acidose tubular renal proximal
ATR_1	-	Acidose tubular renal distal
IRC	-	Insuficiência renal crónica
1,25 $(OH)_2$ D	-	1,25 dihidroxy vitamina D
25 (OH) D	-	25 hidroxy vitamina D
PTH	-	Hormona paratiroideia
HC	-	Hormona de crescimento
IGF_1	-	$Factor_1$ de crescimento semelhante a insulina
SDS	-	Valor do desvio padrão em relação à média
DP	-	Desvio padrão
VFO	-	Velocidade de formação óssea
SRO	-	Superfície de reabsorção óssea
CO	-	Contagem de osteoclastos
EO	-	Espessura osteóide
ECC	-	Espessura da cartilagem crescimento
VSP	-	Velocidade de síntese proteica
VDP	-	Velocidade de degradação proteica
VCP	-	Velocidade de crescimento proteico
NH_4Cl	-	Cloreto de amónia
$NaHCo_3$	-	Bicarbonato de sódio

II - PREFÁCIO

II - PREFÁCIO

A especialidade de Pediatria é a Medicina Integral do período evolutivo da existência humana que ocorre entre a concepção e o fim do crescimento e do desenvolvimento da criança, atingindo-se a forma e as funções próprias do adulto.

O crescimento é sem dúvida uma característica que se pode reivindicar como exclusiva desta especialidade.

O crescimento do ser humano, desde as duas células germinativas até à sua multiplicação e maturação completa na idade adulta, é um fenómeno extraordinário. Através de uma codificação genética, as células dividem-se, desenvolvem-se e da sua integração resulta um complexo sistema de tecidos e órgãos.

Desde sempre nos preocuparam as crianças que, por qualquer causa, não atingiram o seu potencial genético de crescimento.

A feliz coincidência de um trabalho clínico e laboratorial que desde muito cedo marcou a nossa formação, inicialmente no âmbito do Departamento de Anatomia Patológica e, posteriormente, no da Pediatria, associado a uma diferenciação neste Serviço da área da Nefrologia Pediátri-

ca, predispuseram-nos para o estudo das alterações do crescimento de crianças com patologia renal.

Padrões anormais do crescimento durante a progressão e tratamento das doenças renais são desde há muito conhecidos, servindo mesmo como objecto de investigações no passado [41,43,47,49], bem como tema de Simpósios Internacionais [74-77] na actualidade. São trabalhos essencialmente focalizados nas situações de insuficiência renal crónica (IRC), podendo estes ocorrer mesmo antes duma redução significativa da função renal. Era porém um problema somenos importância, dada a morte precoce desses doentes. O seu estudo alcançou presentemente um enorme interesse, dado o aumento da sobrevida destes doentes. As alterações do crescimento passaram a constituir um dos principais objectivos a controlar, uma vez feito o diagnóstico de disfunção renal. A melhoria imediata verificada, quando o diagnóstico e a terapêutica são feitos precoce e adequadamente é na maior parte dos casos conseguida.

O apoio do Director do Serviço de Pediatria, Professor Doutor Norberto Teixeira dos Santos, foi o incentivo para, em colaboração com o Serivço de Nefrologia Pediátrica do Hôpital Necker Enfants-Malades e com a Unidade de Fisiopatologia e Genética das Nefrologias da Criança, INSERM--U-192, em Paris, orientados respectivamente pelo Professor Doutor Michel

Broyer e pela Investigadora Drª Claire Kleinknecht, podermos contribuir para o esclarecimento das alterações do crescimento associado a patologia renal.

Ao médico e ao pediatra nada gratifica mais que ver o resultado da sua intervenção quer a nível individual quer familiar e da integração na comunidade, de crianças que estavam, pode dizer-se, até tempos atrás, condenadas a uma vida curta e sem qualidade.

É neste âmbito que se insere o nosso particular interesse nos efeitos da acidose metabólica crónica (AMC) de origem renal no crescimento. São, assim, objectos do presente trabalho, avaliar a existência de um atraso do crescimento e da sua correlação com AMC, principalmente nas formas associadas a IRC, bem como identificar o mecanismo ou mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas alterações do crescimento.

III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1 - POSIÇÃO DO PROBLEMA

As duas principais entidades clínicas que se acompanham de AMC, têm uma origem renal [1]: acidose tubular renal (ATR); acidose da IRC.

A ATR é um síndrome clínico dependente da perturbação da acidificação renal, caracterizado pela presença de AMC hiperclorémica, devido a insuficiente secreção tubular de iões H^+, na ausência de insuficiência renal [2-6].

ATR classifica-se em vários tipos, de acordo com o local da alteração tubular e da sua respectiva função fisiológica [6].

Uma alteração na reabsorção do bicarbonato filtrado, com perda de grandes quantidades de bicarbonato pela urina, caracteriza a ATR proximal (ATR_2).

A ATR distal (ATR_1), caracteriza-se pela incapacidade de acidificação da urina e subdivide-se em dois tipos: (a) forma clássica de ATR_1, em que a deficiente secreção do ião H^+ é o único defeito pre-

sente no túbulo distal; e (b) a ATR_1 generalizada ou tipo 4 que cursa com disfunção tubular distal completa onde, para além duma limitação na secreção de iões H^+, se associa um defeito na secreção de K^+, originando uma acidose hiperkaliémica.

A ATR_1 pode ser uma doença primária ou secundária a alterações tubulares de causa imunológica, particularmente na idade adulta [6].

As formas pediátricas são clinicamente mais homogéneas: a doença tem um carácter congénito, com aparecimento muito precoce dos sintomas, mesmo se o diagnóstico é feito tardiamente [7]. Estas formas correspondem à forma clássica de ATR_1 ou doença de Albright [2]. As formas com início precoce estão usualmente associadas a um atraso do crescimento e a lesões ósseas [8-9]. Apesar de haver vários estudos clínicos sobre esta doença, só muito raramente englobam populações pediátricas [10-12].

McSherry e Morris [11] avaliando o crescimento de crianças com ATR_1 no início do tratamento, encontraram um atraso severo do crescimento, com uma média estatural superior a 2,5 DP abaixo do normal para crianças testemunhas, com a mesma idade e sexo, bem como uma correlação entre a duração da acidose e o atraso estatural.

Apesar da escassez de informação sobre o crescimento em crianças com ATR_1 hiperkaliémica, 17 crianças da série descrita por Santos e Chan [10], apresentavam uma estatura média no percentil 12,6, sendo inferior ao percentil 5 em 15 delas.

Nash e col [12] encontraram uma estatura inferior ao percentil 3, na altura do diagnóstico, nas 9 crianças com ATR_2.

Donckerwolke recolheu informação sobre uma criança com ATR_2, não tratada durante pelo menos 12 anos, encontrando um aumento progressivo do atraso estatural, durante o referido período [13].

Independentemente do mecanismo fisiopatológico implicado, as 13 crianças com ATR tipo 4, descritas por McSherry [14], apresentavam uma média estatural de 2,5 DP abaixo da média da população de referência, antes do início do tratamento.

Concomitantemente aos estudos clínicos, anteriormente referidos, um importante atraso do crescimento estava também presente, em estudos experimentais, utilizando uma carga ácida excessiva e prolongada, induzindo uma AMC severa em ratos com função renal conservada [21-23], estando contudo associada a uma anorexia severa, cuja importância neste fenómeno não foi excluída.

O mecanismo do atraso do crescimento na ATR, mantém-se desconhecido. A acidose, isoladamente, pode interferir no crescimento, mas algumas alterações associadas a ATR, podem também estar envolvidas neste processo. Nas ATR primárias, uma hipovolémia, hipokaliémia, hiponatrémia, desidratação, bem como alterações no metabolismo fosfocálcico, podem estar presentes, e afectar o crescimento, enquanto nas ATR secundárias, a doença subjacente poderá ser, por si só, um factor importante na génese do atraso do crescimento.

O papel da acidose no atraso do crescimento de crianças com ATR, parece ser melhor elucidado na forma clássica de ATR_1 do que nas outras formas da doença. Tal facto, deve-se ao carácter congénito e permanente do defeito de acidificação na forma clássica ATR_1, enquanto que em outras formas, nomeadamente na ATR_2, tem, na maior parte dos casos, um carácter transitório [6], bem como tratar-se duma forma de AMC, que cursa com um balanço positivo de hidrogeniões, como a que acompanha a IRC [15-17]. Nas formas proximais, a AMC é essencialmente dependente dum aumento das perdas urinárias em bicarbonato, com um balanço normal ou mesmo diminuído em hidrogeniões [16-17].

A importância da escolha dum modelo clínico em que AMC resulta duma sobrecarga em hidrogeniões, depende do seu efeito no osso como tamponador da referida sobrecarga e da sua importância na génese de eventuais lesões ósseas [18-19].

A associação que parece estar presente entre a AMC e o atraso do crescimento das crianças com ATR, chamou a atenção para a possibilidade do mesmo fenómeno também se poder verificar nas crianças com IRC [20].

A alteração do crescimento, mantém-se como um dos principais problemas da IRC da criança [24-32], apesar de importantes progressos terapêuticos terem feito desaparecer o clássico "nanismo renal" essencialm entedependente das lesões ósseas de osteodistrofia [33-36].

Nas crianças em IRC, o atraso do crescimento é particularmente grave nos primeiros dois anos de vida, período crítico, dado o crescimento ser nesta fase da vida extremamente rápido. Assim, na presença duma paragem ou mesmo duma desaceleração, mesmo por períodos curtos de tempo, origina-se um importante atraso do crescimento. Na criança mais velha, uma desaceleração do crescimento é mais rara, estando porém, geralmente associada a uma incapacidade de recuperação do atraso verificado (24,27,31,37,38].

Assim, enquanto que na criança normal, todo o atraso do crescimento secundário a uma doença intercorrente, é rapidamente compensado por uma aceleração do crescimento com recuperação do atraso verificado [39], torna-se excepcional e limitado na IRC experimental [40].

Os mecanismos invocados neste defeito do crescimento são múltiplos e complexos. Várias consequências da IRC podem ser incriminadas como causadoras deste atraso do crescimento [41-43]. A osteodistrofia renal, com os seus componentes de raquitismo e hiperparatiroidismo é a causa dos atrasos mais dramáticos [33-36].

Actualmente as grandes lesões ósseas com deformidades são geralmente evitadas com os tratamentos preventivos (cálcio, vitamina D), apesar da dificuldade em normalizar duma maneira satisfatória o equilíbrio fosfocálcico.

A subnutrição crónica, associada a anorexia está sempre presente em qualquer idade, desde que uma IRC, mesmo moderada, se estabeleça [43-46]. É particularmente severa no período de recém-nascido e lactente, sendo nestas idades que a sua importância, como responsável pelo atraso de crescimento é mais incriminada, embora o seu mecanismo se mantenha desconhecido.

As alterações hidro-electrolíticas, associadas a um defeito de concentração de urina, particularmente importantes nas uropatias malformativas e nas hipoplasias poderiam frenar o crescimento. Finalmente a AMC, devido a um defeito de eliminação de iões H^+ é, também, um dos factores frequentemente incriminados na génese do atraso do crescimento [41].

Como se pode ver, no momento actual, muito se desconhece relativamente ao atraso do crescimento associado a IRC.

Recentemente, foi proposta a possibilidade da AMC, como já observado nas ATR, ser um dos principais factores implicados no atraso do crescimento presente na IRC [20,26,116-117]. West e Smith [41] verificaram que 15 das 17 crianças com atraso do crescimento e IRC, por eles estudadas, eram acidóticas. Por sua vez, Stickler e Bergen [47] não encontraram qualquer correlação entre o crescimento e acidose, em 16 crianças com IRC, não sendo porém possível comparar a gravidade da acidose entre os dois estudos.

Nas crianças em IRC, a acidose é em regra corrigida com um tratamento alcalino. Porém, vários autores [29,49], sugeriram que o tratamento da acidose nas situações de insuficiência renal, com bicarbonato, não melhorava o crescimento, o mesmo se verificava na

grande maioria das crianças em hemodiálise crónica, onde a acidose é geralmente corrigida. É possível que a AMC seja incorrectamente corrigida ao longo do dia, podendo-se questionar se uma acidose, mesmo mínima ou intermitente, contribuirá para o atraso do crescimento ou para a sua não recuperação nas situações de IRC.

Os poucos estudos experimentais sobre acidose associada a IRC, nem sempre mostraram uma diminuição do ganho ponderal [dados pessoais, 51-52], mas tratava-se de ratos adultos com acidoses mínimas.

Podemos pois questionar sobre a existência dum limiar de acidose, a partir do qual haveria uma interferência no crescimento e consequentemente em que medida a correcção da acidose deverá ser rigorosa e estável.

Parece pois ser evidente que a AMC presente na ATR, bem como na IRC, se acompanha geralmente de um importante atraso do crescimento. Uma relação causal tem sido documentada e sugerida em diversos estudos experimentais [21,49,54,55,57] e clínicos [10--12,41,47,58-65], com ou sem IRC. Mesmo em algumas crianças, com baixa estatura, foram encontradas formas frustes de acidose tubular crónica [66].

Após correcção da acidose com terapêutica alcalinizante, uma recuperação do atraso estatural foi observada em crianças com ATR [10-12,14,47,61-62,64,67-72].

Contudo, uma ausência de alterações no crescimento foi assinalada por outros autores, utilizando modelos experimentais animais com função renal normal [22], bem como em estudos clínicos com ou sem IRC [47,49,56], não sendo possível avaliar a partir dos dados publicados da severidade e duração da acidose.

Também uma diminuta ou mesmo ausência de influência da terapêutica alcalinizante isoladamente nos atrasos de crescimento de crianças em AMC urémicas [29,49] ou com função renal conservada [47], foi também assinalada.

Os mecanismos fisiopatológicos, responsáveis pelo atraso de crescimento associado a AMC continuam por esclarecer, tendo sido motivo de várias publicações.

Os principais mecanismos propostos foram os seguintes: a) perda de catiões pela urina; b) alterações do metabolismo fosfocálcico; c) alterações do metabolismo ósseo; d) alterações da regulação endócrina do crescimento; e) perda de sulfatos pela urina, que passamos a pormenorizar:

— Cooke e col, em 1960 [21], utilizando o rato como modelo experimental e com função renal normal, correlacionou o atraso do crescimento associado a AMC à perda mantida de catiões pela urina. Em 1964, Bergstrom e col [49], sugerem o mesmo mecanismo na acidose da IRC.

— Uma alteração do metabolismo fosfocálcico foi sugerido já em 1950, a partir dos estudos clínicos, com ou sem IRC por Cooke e Kleeman [72] e por Greenberg e col, em 1966 [53], Stickler em 1976 [28], Chan em 1984 [16], Caruana e Bulkalew em 1988 [78]. Donckerwolcke e col em 1989 [17] e Morris e Ives em 1991 [6].

— Vários autores utilizando estudos esperimentais *in vitro* [79-84]; *in vivo* com função renal normal [85-89]; ou com IRC [52], bem como estudos clínicos com função renal conservada [18] ou em IRC [90], sugerem como principal mecanismo uma alteração do metabolismo ósseo, com lesões ósseas por aumento da reabsorção, tendo sido incriminados vários factores: um hiperparatiroidismo [91,95]; uma hipercalciúria [3,96-98]; uma hiperfosfatúria [99-100]; uma alteração no metabolismo da vitamina D [15,16,78,101-103]. Tais alterações do metabolismo

ósseo seriam também responsáveis pelas lesões de raquitismo ou osteoporose, associadas ao atraso de crescimento observado nas ATR [3-4,9,68-69,93,106-110].

— Gervais e Brazeau em 1971 [54] foram os primeiros autores, utilizando estudos experimentais *in vivo* no rato, a propor como principal causa do atraso de crescimento, uma alteração da regulação endócrina do crescimento, através duma resistência periférica à acção da hormona do crescimento (HC), sem alteração da secreção hipotalâmica do factor de libertação da HC, bem como da secreção da referida hormona pela adenohipófise.

Posteriormente em 1980, McSherry e col [112], estudando o efeito isolado da acidose, bem como da sua correcção com a terapêutica alcalina na secreção da HC em crianças com ATR_1, ATR tipo 4 e crianças normais testemunhas cuja AMC foi criada através da ingestão da NH_4Cl, encontraram uma redução significativa da secreção da HC após testes de estimulação farmacológica nos períodos com acidose, propondo estes factos como os responsáveis pelo atraso do crescimento. A partir deste estudo, os autores, e de acordo com o já anteriormente proposto

por Matteini e col em 1976 [113], sugerem que as concentrações plasmáticas de bicarbonato são um factor determinante na regulação da secreção da HC. De referir, no entanto, que uma secreção normal de HC, após provas de estimulação farmacológica, foi encontrada por outros autores, em crianças com AMC por ATR_2 [13,114].

— Chan em 1978 [115] refere um aumento significativo na excreção urinária de sulfatos em crianças com ATR_1. Esta perda urinária de sulfatos, originaria uma deficiência em sulfatos, a qual poderia contribuir para o atraso de crescimento observado nas crianças com ATR, dada a sua importância no metabolismo da cartilagem de crescimento.

No mesmo estudo, excluiu-se a malnutrição proteico-energética como responsável pelo atraso do crescimento, ao verificar-se ingestões proteico-energéticas idênticas nas crianças com ATR, às do grupo testemunha.

Da revisão bibliográfica, as principais conclusões que me parecem poder ser obtidas, e servindo como ponto de partida para o presente trabalho de investigação, foram as seguintes:

— Apesar dum sólido suporte científico quanto à existência dum atraso do crescimento nas crianças com ATR em AMC, bem como da sua possível recuperação com a terapêutica alcalinizante, não há o mínimo de informação quanto à evolução futura do crescimento, nomeadamente quanto à estatura final destes doentes.

— Quanto à possibilidade do mesmo fenómeno poder estar presente na AMC que acompanha a IRC, os dados disponíveis na literatura são muito mais escassos e controversos.

— Não obstante a existência de vários mecanismos fisiopatológicos propostos como responsáveis pelo atraso do crescimento destas crianças, a sua aceitação deverá ser fortemente questionada dado que, na maior parte dos casos, os dados disponíveis são insuficientes e inconsequentes. Mantém-se pois, actualmente por precisar com rigor, o mecanismo ou mecanismos implicados na génese deste atraso do crescimento.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

IV - MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Serviço de Nefrologia Pediátrica do Hospital Necker Enfants-Malades e na Unidade de Fisiopatologia e Genética das Nefropatias da Criança, INSERM-U-192, Paris, França, entre Janeiro de 1990 e Dezembro de 1991.

De acordo com os objectivos formulados, foram projectados e realizados 3 estudos diferentes, sendo dois clínicos (Estudo nº1 e nº2) e um experimental (Estudo nº3), caracterizando-se respectivamente:

- **ESTUDO Nº 1** - CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO PUBERTÁRIO E ESTATURA FINAL NA ACIDOSE TUBULAR DISTAL.

- **ESTUDO Nº 2** - SECREÇÃO DA HORMONA DE CRESCIMENTO NA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL.

- **ESTUDO nª 3** - INFILUÊNCIA DA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL NO CRESCIMENTO: EFEITO SOBRE O METABOLISMO FOSFOCÁLCICO, ÓSSEO E PROTEICO.

Este estudo experimental serviu para investigar os parâmetros incompatíveis com a utilização de estudos humanos.

Consistiu, por sua vez, em 3 experiências diferentes:

- **EXPERIÊNCIA I** - INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO ATRASO DO CRES-CIMENTO.

- **EXPERIÊNCIA II** - INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO METABO-LISMOS FOSFOCÁLCICO E ÓSSEO.

- **EXPERIÊNCIA III** - INFLUÊNCIA DA ACIDOSE NO METABO-LISMO PROTEICO.

Antes do início do estudo, obtivemos o consentimento dos serviços competentes, após termos apresentado o projecto de investigação que nos propusemos realizar, sendo este também aceite do ponto de vista ético.

Obtivemos igualmente o consentimento dos pais dos doentes nele envolvidos, após lhes serem explicados os objectivos do mesmo.

IV.1 ESTUDO Nº 1 — CRESCIMENTO, DESENVOLVIMENTO PUBERTÁRIO E ESTATURA FINAL NA ACIDOSE TUBULAR DISTAL.

1.1 - População

Foram estudadas todas as crianças com o diagnóstico ATR_1, seguidas na consulta, com pelo menos dois anos de evolução da doença e uma função renal normal, no início do estudo.

Foram divididas em dois grupos de acordo com a idade à data do início do tratamento. Grupo I era constituído pelas crianças até aos dois anos de idade e o Grupo II pelas crianças com mais de dois anos de idade.

O diagnóstico ATR_1 foi baseado nos seguintes critérios, após correcção da desidratação quando presente: 1) acidose metabólica persistente, com bicarbonatos plasmáticos inferiores a 17,5 mmol/l ; 2) incapacidade para diminuir o pH urinário abaixo de 5,5 ou de aumentar a excreção ácida total acima de 50 $\mu Eq/min/m^2$

em situações de acidose espontânea [120]; 3) função renal normal, após determinação do clearance da creatinina.

Um teste de acidificação utilizando cloreto de amónio foi utilizado em todos os pais, de acordo com o descrito anteriormente, em indivíduos normais [148].

1.2 - Investigação laboratorial

As determinações laboratoriais incluíam o pH urinário mínimo e a excreção urinária de ácido livre (determinada pela soma da acidez urinária titulável e da amoniúria menos o bicarbonato urinário), determinados durante uma acidose espontânea (HCO_3 < 17,5 mmol/l).

O pH urinário foi determinado na primeira urina da manhã, usando o "Radiómetro pH meter". A excreção urinária de ácido livre foi determinada segundo os métodos descritos por Chan e col [128--129].

As concentrações plasmáticas de sódio, potássio, cloro, creatinina, bicarbonato, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, foram determinadas num auto-analisador Hitachi 704 (Boehring Mannheim, França). A concentração plasmática de cálcio ionizado foi obtida

através dum microeléctrodo (Orion Biomedical Space Stat 20, Orion Research, Inc. Cambridge, Mass).

As concentrações urinárias de cálcio, fósforo e creatinina foram determinadas num auto-analisador (modelo SMA 12, Technicon, Tarrytown, New York, U.S.A.). O clearence de 24 horas foi calculado no início e anualmente durante o estudo a partir da creatinúria das 24 horas precedentes à do dia da determinação e da creatinémia doseada no dia da determinação.

Creatinúria e creatinémia foram determinadas utilizando-se o método calorimétrico Jaffe [149].

Todos os clearences eram posteriormente corrigidos, para uma superfície corporal de 1,73 m^2.

As concentrações plasmáticas de 25 (OH) D e 1,25 $(OH)_2$ D foram determinadas usando a técnica descrita por Shepard e col [130]. Os valores normais variavam entre 6-30 ng/ml para a 25 (OH) D e para 1,25 $(OH)_2$ D de 20-80 pg/ml, para as crianças com menos de 2 anos e 30-60 pg/ml para as crianças com idades superiores a 2 anos.

A concentração plasmática de paratormona, foi determinada pelo método de radioimunoensaio, usando o anticorpo 53-84do car-

neiro, descrito por Canterbury e Reiss [131]. O limite de detecção era de 10 pg/ml, variando os valores normais entre 15 a 60 pg/ml.

1.3 - Investigação radiológica

A idade óssea foi determinada pelo método de Greulich e Pyle [126] no início do tratamento e após 2 anos. Exames radiográficos do esqueleto (membros inferiores, superiores e punhos) eram realizados no início do tratamento, e a seguir anualmente, sempre que estivessem presentes lesões ósseas. Todos os exames eram observados quanto à presença ou não de raquitismo ou osteopenia. A designação de osteopenia era utilizada na presença duma desmineralização óssea generalizada, definida pela diminuição da espessura da cortical (relação entre a espessura da cortical e da medular tibial, inferior a 0,5) e perda da estrutura óssea trabecular secundária [127].

Raquitismo foi definido radiologicamente pela presença de alargamentos e irregularidades das junções epífiso-metafisárias ou pela evidência duma fragilidade óssea (deformidades ósseas) dos ossos longos. As lesões de osteopenia ou raquitismo foram graduadas independentemente numa escala de 0 a 4. A ausência de

lesões, constituia o grau 0. Classificavam--se em grau 1 quando duvidosas, 2 quando leves, 3 moderadas e 4 quando severas.

Todos os doentes com graus superiores ou iguais a 2, eram considerados como tendo lesões ósseas.

A presença de nefrocalcinose e de litíase renal foi determinada radiologicamente e por ultrassonografia.

1.4 - Crescimento

A avaliação do crescimento no início do tratamento incluiu a idade cronológica, idade óssea, e a velocidade de crescimento. A estatura foi avaliada através dum estadiómetro de parede de tipo Harpenden e o comprimento através dum pediómetro de mesa, fornecidos pela Holtein Ltd, Crosswell, Crymych Dyfed, UK, correspondendo um coeficiente de variação inferior a 1% entre cada medida. A estatura ou o comprimento eram avaliados cada 3 meses nos dois primeiros anos, após o início do tratamento e depois anualmente.

A velocidade de crescimento foi calculada após duas ou mais determinações estaturais, para períodos de 6 meses antes do

início do tratamento (inferior para as crianças com menos de 6 meses) e períodos de 12 e 48 meses após o início do tratamento.

Estatura e velocidade de crescimento foram analisados após transformação em (SDS), em que $SDS = \frac{X-X}{DP}$, onde X corresponde à média individual, X a média de crianças normais com a mesma idade cronológica e DP o desvio padrão para essa idade.

Estaturas e as velocidades de crescimento foram comparadas às das tabelas de referência francesa [121], o mesmo acontecendo com as crianças portuguesas ou norte-africanas, dado não existirem tabelas de referência para esses países.

Duas variáveis foram utilizadas para avaliar o crescimento após correcção da acidose: 1) ganho estatural (variação estatural após 2 anos de tratamento e até à última observação; e 2) velocidade de crescimento (variações da velocidade de crescimento ao fim do primeiro e segundo ano de tratamento).

Nos 12 doentes que atingiram a estatura definitiva, durante o período de estudo, foi possível avaliar o crescimento e desenvolvimento pubertário. Os estádios pubertários foram definidos de acordo com o proposto por Marshall e Tanner [122--123].

A estatura definitiva previsível dos doentes foi obtida após transformação da estatura média dos pais, de acordo com o método de Tanner [124].

A estatura final foi considerada ter sido atingida, quando o ganho estatural durante o ano precedente fosse inferior a 2 cm e idade óssea superior a 14 anos nas raparigas e 16 anos nos rapazes [125].

1.5 - Tratamento da acidose

Os doentes foram tratados com bicarbonato de sódio, sendo a correcção da acidose avaliada pela verificação de repetidas concentrações normais e bicarbonato plasmático em jejum e de calciúrias inferiores a 2 mg/kg/dia.

Se as necessidades em bicarbonato fossem iguais ou inferiores a 10 mmol/Kg/dia, era administrado em 4 tomas iguais; para necessidades superiores, introduzia-se uma 5ª toma ao deitar, numa dose uma vez e meia superior à das restantes tomas.

IV.2 - ESTUDO 2: SECREÇÃO DA HORMONA DE CRESCIMENTO NA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAUSA RENAL

2.1 - População

De um um total de 30 crianças pré-puberes com IRC e 28 com ATR_1, foram seleccionadas para estudo 12. Estas crianças, seguidas regularmente na consulta externa, foram divididas em 2 grupos, de acordo com os critérios clínicos abaixo indicados. As idades ósseas eram inferiores a 10 anos nas raparigas e a 12 nos rapazes, tendo todos uma ingestão proteico-energética adequada às normas recomendadas pela RDA [119].

O primeiro grupo era constituído por 6 crianças com ATR_1 diagnosticadas antes dos 2 anos de idade segundo os critérios indicados no Estudo 1 e tratadas exclusivamente com bicarbonato de sódio desde o início.

O segundo grupo incluía 6 crianças com IRC (clearences da creatinina inferiores a 25 ml/minuto /1,73m^2) determinados segundo os critérios indicados no Estudo 1, com duração de há pelo menos 1 ano, em tratamento conservador, incluindo correcção da acidose

com bicarbonato de sódio. Foram excluídas outras doenças crónicas ou orgânicas, para além da IRC. A função tiroideia era normal em todas as crianças. Todas tinham albuminúria inferior a 1 grama por dia. Nenhuma delas tinha osteodistrofia renal, nem recebeu tratamento com corticóides, imunossupressores, eritropoitina, ou HC.

O estudo foi iniciado após informação e autorização dos pais das crianças e do Comité de Ética.

2.2 - Estatura, desenvolvimento pubertário e idade óssea

A avaliação da estatura, do desenvolvimento pubertário e a idade óssea foi determinada de acordo com os métodos indicados para este efeito no Estudo 1.

2.3 - Protocolo de Estudo

As crianças dos grupos com ATR_1 e IRC, permaneciam no hospital durante dois períodos de 28 horas: um, sob terapêutica alcalinizante (período sem acidose) e o segundo após pelo menos 8

dias de interrupção da terapêutica alcalinizante (período com acidose).

O intervalo entre cada período era de pelo menos 1 mês, após sorteio do primeiro período de estudo em cada criança. A ingestão proteico-energética permanecia idêntica durante a semana que precedia cada período. As crianças movimentavam-se livremente durante o dia e recebiam as suas principais refeições às 8, 12 e 18 horas. A secreção espontânea de HC era avaliada durante um período de 24 horas que começava às 9 horas após o pequeno almoço.

Um catéter, heparinizado era colocado numa veia do antebraço, ligado permanentemente a uma bomba de aspiração de acordo com o método de Cormed-Kowarski [132] (amostras cada 20 minutos). A primeira amostra era utilizada para a determinação do factor de crescimento semelhante a insulina (IGF_1). Os perfis de secreção da HC nas 24 horas eram sub-divididos em dois períodos (diurno e nocturno). O perfil nocturno era determinado a partir dos valores da HC recolhidos durante o sono, enquanto o perfil diurno, obtinha-se das amostras recolhidas durante o período acordado.

Tendo completado o período de 24 horas da avaliação da secreção espontânea da HC, nas 4 horas seguintes, era realizado um

teste de provocação da secreção de HC com Arginina e Insulina na dose de 0,5 g Kg de Arginina, perfundida durante 30 minutos, seguida da administração de insulina na dose de 0,1 U/Kg. As amostras de sangue eram recolhidas durante 3 horas em intervalos de 15 minutos.

Todas as amostras de sangue eram guardadas em gelo por períodos inferiores a 3 horas. Após centrifugação do sangue total, recolhia-se o plasma e congelava-se a -20^{o}C até à realização das determinações hormonais 1 a 3 semanas mais tarde.

2.4 - Estudos hormonais e ácido-base

A determinação da HC de todas as amostras era feita em duplicado e no mesmo estudo. As concentrações plasmáticas de HC eram obtidas por radioimunoensaio, utilizando um duplo anticorpo (anti HC do coelho como primeiro anticorpo, e como segundo, uma globulina de cabra anti-coelho).

O coeficiente de variação para cada estudo era de 4,5%, 2% e 3,2% para concentrações de HC de 2,3, 6,5 e 25 µg/l, respectivamente. O coeficiente de variação entre os vários estudos era de 12%, 8%, 6%, 5% para concentrações de HC de 1, 2,5, 6,5 e

10 µg/l respectivamente. A sensibilidade do estudo era de 0,5 µg/l para amostras de 50 µl. A capacidade de ligação das amostras plasmáticas dos grupos de estudo, medidas após introdução de [^{125}I] HC, era idêntica à das amostras de controlo (média (DP) 7,8% (3,4), variando entre 2,0-16,7%).

Considerou-se como resposta normal à estimulação com Arginina/Insulina, concentrações de HC superiores a 10 µg/l [133] e como pico normal, da secreção espontânea diária de HC , quando superior a 10 µg/l [134] e concentrações médias superiores a 3,3 µg/l/h [134].

As concentrações plasmáticas de IGF_1 eram obtidas através dum teste de radioimunoensaio (Dr. Underwood e Van Wyk, Hormone distribution program of NIDDK), após separação e extracção das suas proteínas de ligação pelo método de extracção em ácido-etanol modificado pela crioprecipitação [135].

O pH plasmático e o bicarbonato eram medidos de imediato num analisador ácido-base ABL_3 (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

IV.3 - ESTUDO 3: INFLUÊNCIA DA ACIDOSE METABÓLICA CRÓNICA DE CAU-SA RENAL NO CRESCIMENTO: EFEITO SOBRE O METABOLISMO FOSFOCÁLCICO, ÓSSEO E PROTEICO

3.1 - Animais e cirurgia

Utilizou-se como modelo experimental o rato, dado ser a espécie animal utilizada nos estudos de crescimento, principalmente na urémia [118].

Nos três diferentes estudos, utilizamos ratos machos jovens em período de máximo crescimento, com 4 semanas de idade, pesando entre 50 a 60 gramas da raça Sprague-Dawley, fornecidos pelo Instituto Francês de Investigação Animal (INRA). Durante todo o período de estudo foram colocados em caixas individualizadas de plástico, próprias para estudos metabólicos não galvanizados, de abertura frontal, pavimento em rede para evitar a coprofagia.

A temperatura ambiente era controlada entre 21°C e 23°C, com ciclos luminosos normais, 12 horas por dia de luz (07h às 19h) e 12 horas de escuridão (19h às 07h).

De início, os ratos recebiam um regime alimentar estandardizado em pó contendo 14g/100g de caseína. Após 3 dias de adaptação ao local e ao regime alimentar, todos os ratos eram submetidos a um acto cirúrgico que consistia numa nefrectomia subtotal (ratos urémicos) e numa descapsulação renal (ratos testemunhas).

Nefrectomia

O modelo animal de IRC por nós utilizado, foi o da nefrectomia subtotal. O modelo animal habitualmente utilizado no estudo da IRC consiste na ligadura dos ramos da artéria renal. Este modelo não permite uma boa quantificação do parênquima renal excisado e provoca uma hipertensão arterial imediata e severa, induzida pela isquémia renal [199-200]. O modelo da excisão que utilizamos modifica pouco a pressão arterial, sendo pois o mais próximo das hipoplasias renais da criança.

Pelo controlo do acto cirúrgico e, alterando-o após determinação do peso do parênquima renal excisado, consegue-se precisar o nível de IRC. Experiências sucessivas por nós efectuadas, mostraram que para cada nível de nefrectomia corresponde uma redução reprodutível do clearance da inulina. Este modelo de redução nefrónica pura corresponde à principal causa de IRC da criança. Efectivamente 1/3 das causas de IRC na idade pediátrica são devidas a uma hipoplasia congénita ou a sequelas duma uropatia malformartiva [201].

O acto cirúrgico foi realizado em dois tempos para diminuir a mortalidade operatória: 1) Uma nefrectomia subtotal do rim esquerdo, sob anestesia geral, por injecção intra-peritoneal com fenobarbital de sódio (40mg/Kg). Para se quantificar com precisão a quantidade de parênquima renal esquerdo a retirar, utilizavam-se 5 ratos representativos, pelo peso, do grupo a operar. O seu rim esquerdo era retirado e pesado para se conhecer a média do peso do rim por 100 gramas de peso corporal. Isto permitiria, posteriormente para todo o grupo, calcular a quantidade de parênquima renal a retirar para se obter a percentagem de excisão desejada.

Os dois polos do rim esquerdo eram excisados com tesoura, seguido duma electrocoagulação com bisturi eléctrico para diminuir a hemorragia pós-operatória. 2) Quatro dias mais tarde procedia-se a uma nefrectomia total do rim direito sob anestesia com éter.

Os ratos com função renal conservada (testemunhas), eram submetidos a uma simulação operatória que consistia numa descapsulação renal, também efectuada em dois tempos: o primeiro sob anestesia com fenobarbital e o segundo com éter.

A segunda intervenção provocava uma insuficiência renal aguda transitória com anorexia severa, sendo os ratos submetidos a uma alimentação por entubação gástrica após recobro anestésico, administrando-se uma solução contendo lipídios e polidextrinas.

3.2 - Regimes alimentares

Uma semana após a segunda nefrectomia, os ratos urémicos eram distribuídos nos respectivos grupos. A acidose era obtida através duma dieta hiperproteica, fornecendo uma carga ácida muito importante, se se tiver em consideração que a IRC, acompanha-se duma diminuição da eliminação renal de iões H^+.

Todos os grupos recebiam um regime com a mesma carga proteica, energética e mineral (Quadro 1). Um regime alimentar com 30 g/100 g de caseína, permitia obter uma AMC nos ratos urémicos (dieta A).

A acidose era compensada nos grupos sem acidose, através dum suplemento em bicarbonato de sódio (dieta B).

A quantidade de sódio era mantida idêntica nos dois regimes alimentares, pela diminuição do cloreto de sódio na dieta B (Quadro 1).

Quadro 1. Composição dos regimes alimentares (g/100 g de regime)

REGIMES	Dieta A	Dieta B
Caseína	30,00	30,00
Amido do milho	17,50	17,5
Sacarose	32,00	32,00
Óleo de milho	10,00	10,00
Fosfato tricálcico	1,94	1,94
Bicarbonato de sódio	0,00	1,70
Cloreto de sódio	1,18	0,00
Compostos minerais	1,42	1,42
Mistura vitamínica	1,00	1,00
Celulose	4,96	4,96

Os dois regimes fornecem a mesma quantidade em g/100 g de sódio (0,46%), em cálcio (0,7%) e de fósforo (0,4%)

Nos ratos com função renal normal (testemunhas) a acidose era induzida pela adição de NH_4 Cl (1,4 g/100 ml) no aporte hídrico diário. Todos os ratos testemunhas (acidóticos e não acidóticos) recebiam a dieta A, não suplementada em bicarbonato de sódio.

Os regimes alimentares (fabrico da INRA/Joujen Josas) eram fornecidos na forma de pó seco, introduzidos em pequenos recipientes inoxidáveis, com uma tampa em rede que permitia a alimentação do animal, mas impedia o seu desperdício.

Quando existia uma diferença nos consumos alimentares entre os diferentes grupos de ratos e dada a necessidade de se manterem aportes nutritivos idênticos, um sistema de "pair feeding" era instituído. Consistia na restrição alimentar do grupo com ingestão superior, fornecendo-lhe quantidades iguais às ingeridas pelo grupo anoréxico na véspera.

Os ratos em restrição, eram colocados em caixas individuais munidas duma placa rotativa, com oito recipientes alimentares, onde se distribuía em cada um deles, de maneira uniforme, a quantidade total diária de comida, permitindo um acesso alimentar programado a cada um desses recipientes durante 14 horas (17h às 7h).

Os ratos sem qualquer restrição alimentar, recebiam também a sua comida, a partir das 17 horas até às 7 horas do dia seguinte. O ritmo alimentar foi decidido após estudos preliminares do comportamento alimentar dos animais, com registo do horário das suas refeições. Todos os animais tinham um livre acesso à água: água corrente canalizada na primeira e terceira experiências e água desmineralizada na segunda experiência.

3.3 Protocolo experimental

O protocolo experimental foi o mesmo nas três experiências (Fig. 1). As operações foram realizadas como anteriormente descritas. Na primeira e terceira experiência as nefrectomias foram mais severas (78% do parênquima renal total, na primeira experiência e de 85% na terceira experiência). Na segunda experiência, as nefrectomias foram mais moderadas, na ordem de 70%.

Os ratos com função renal normal, só foram utilizados na segunda e terceira experiências. Os ratos eram sacrificados 15 dias após a introdução dos regimes alimentares específicos.

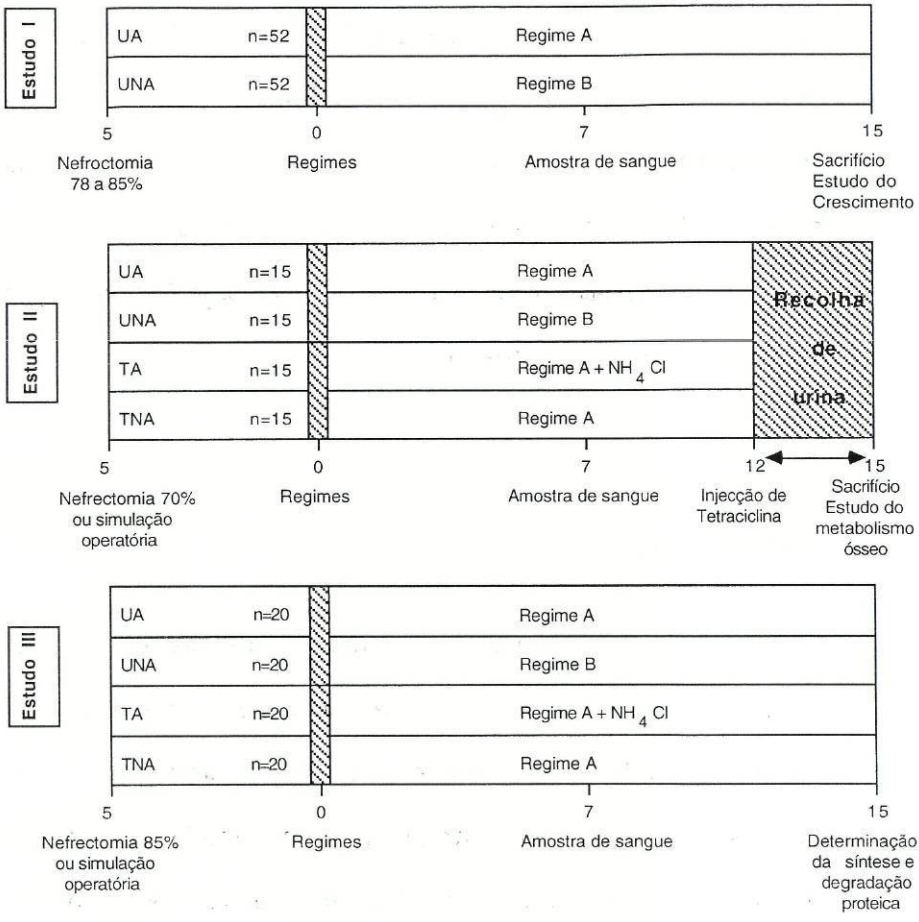


Figura 1: Protocolo experimental dos estudos I, II e III

UA: Urémicos Acidóticos; UNA: Urémicos Não Acidóticos

TA: Testemunhas Acidóticos; TNA: Testemunhas Não Acidóticos

Regime A: 30% caseína sem $NaHCO_3$; Regime B: 30% caseína com $NaHCO_3$

Os animais, bem como o seu consumo alimentar, eram pesados diariamente. O comprimento era medido na data da introdução do regime alimentar específico e 1 e 2 semanas depois, em situação de relaxamento completo (da extremidade da cauda ao focinho), após anestesia ligeira com éter.

Uma semana após a introdução do regime alimentar específico, é obtida uma amostra de sangue por punção da veia jugular sob anestesia com éter para determinação dos gases do sangue, cálcio ionizado, creatinina, ureia, bicarbonato, fósforo, cálcio total e ionograma. Os mesmos parâmetros eram determinados na altura do sacrifício.

Outras medidas complementares seriam efectuadas antes e no momento do sacrifício, dependentes do estudo em questão.

3.3.1 EXPERIÊNCIA I: Influência da acidose no atraso do crescimento

A finalidade deste estudo foi a de verificar a existência dum limiar de severidade da acidose em ratos urémicos acidóticos comparados a ratos com o mesmo grau de insuficiência renal mas com acidose corrigida, para além do qual o crescimento seria altera-

do. Pretendeu-se também avaliar da importância da anorexia neste atraso do crescimento. Com esta experiência, conseguiu-se determinar do efeito isolado da acidose, nas situações de IRC sobre o crescimento, pois como se viu anteriormente, não era possível o seu estudo através da investigação clínica.

Para isso utilizaram-se 120 ratos que foram submetidos a uma nefrectomia subtotal cuja intensidade variou entre 78% a 85%. No momento da introdução do regime específico, os ratos eram repartidos em dois grupos: 1) um grupo acidótico (UA) (52 ratos) recebiam o regime A (*ad libitum*), sem suplementação em bicarbonatos de sódio; 2) um grupo não acidótico (UNA) (52 ratos) recebiam o regime B (*ad libitum*), suplementado em bicarbonato de sódio. No fim do período de estudo, os 52 ratos UA foram subdivididos em 5 grupos de acordo com a severidade crescente da acidose, avaliada a partir do pH sanguíneo:

— Grupo 1: 7,30 < pH <7,35

— Grupo 2: 7,25 < pH <7,30

— Grupo 3: 7,20 < pH <7,25

— Grupo 4: 7,10 < pH <7,20

— Grupo 5: pH < 7,10

Dado neste modelo de IRC o deficite de excreção ácida depender da severidade da nefrectomia, cada rato UA era comparado retrospectivamente com um rato UNA com o mesmo grau de insuficiência renal, determinada a partir das concentrações plasmáticas de creatinina, obtida no fim do estudo. Cinco grupos de ratos UNA foram assim formados *a posteriori*, para se poder comparar os respectivos consumos alimentares e crescimentos (peso e comprimento) aos dos grupos de ratos correspondentes UA.

3.3.2 EXPERIÊNCIA II. Influência da acidose no metabolismo fosfocálcico e ósseo

A finalidade deste estudo foi a de determinar o efeito da AMC no renovamento ósseo, no metabolismo fosfocálcico e na sua relação com eventuais modificações hormonais, em ratos jovens urémicos e com função renal normal.

Quatro grupos de 15 animais foram comparados: dois grupos com insuficiência renal moderada (70% de excisão da massa renal total), onde um dos grupos era acidótico (UA), sendo no outro a acidose compensada com a suplementação do regime em bicarbo-

nato de sódio (UNA); dois outros grupos testemunhas com função renal normal, sendo num a acidose induzida pela adição de NH_4Cl a 1,4% no aporte hídrico diário (TA), enquanto que o outro grupo não acidótico (TNA) recebia uma restrição no seu aporte alimentar diário, correspondente à mesma quantidade de regime que o grupo TA, dada a presença de anorexia neste último.

Nos grupos acidóticos UA e TA, os ratos com acidose severa (pH<7,22) foram excluídos, por apresentarem um atraso do crescimento. Neste estudo um crescimento idêntico era necessário, dada a sua influência em alguns dos parâmetros a avaliar como a concentração plasmática do calcitriol e a formação óssea.

No dia da introdução do regime alimentar específico (dia 0 do protocolo experimental) e dois dias antes do fim do período de estudo (dia 12 do protocolo experimental) (Fig.1) era administrada em todos os ratos uma injecção de tetraciclina (20 mg/Kg de Tetraciclina Solu Retard®).

Uma recolha de urina e fezes foi efectuada durante os três dias que precederam o fim do estudo (Fig.1) para determinação do balanço fosfocálcico.

No momento do sacrifício, eram obtidos em todos os ratos, amostras de sangue por punção aórtica, centrifugados e congelados

a -40°C para determinação posterior da hormona paratiroideia (PTH), dos metabolitos activos da vitamina D [1,25 $(OH)_2$ D, 25 (OH) D] e da IGF_1.

A tíbia esquerda era retirada, dissecada, medida e guardada em álcool absoluto para estudo histomorfométrico posterior. Os dois fémures eram retirados e dissecados, pesados e congelados para posterior determinação do conteúdo ósseo mineral.

3.3.3 EXPERIÊNCIA III: Influência da acidose no metabolismo proteico

Neste estudo pretendemos examinar as consequências da acidose na síntese e degradação proteica a nível muscular, de início em ratos com IRC, e posteriormente em ratos com função renal normal.

O protocolo experimental foi o mesmo que o da experiência precedente (Fig.1), diferindo contudo na gravidade da urémia, visto esta ter sido induzida após ablacção de 85% da massa renal total, dada a necessidade de se obter insuficiências renais e acidoses severas.

No fim do estudo, a síntese e a degradação proteica foram determinadas *in vivo*.

Quatro grupos de 20 ratos foram investigados: 1) Urémicos acidóticos (UA); 2) Urémicos não acidóticos (UNA); 3) Testemunhas acidóticos (TA); 4) Testemunhas não acidóticos (TNA). Todos eram alimentados *ad libidum* à excepção dos ratos TNA que recebiam quantidades alimentares iguais às ingeridas pelos ratos TA na véspera, como foi anteriormente detalhado.

3.4 Medições e Técnicas

3.4.1 Determinações plasmáticas e urinárias

O pH plasmático e o bicarbonato eram medidos de imediato num analisador de gases de sangue ABL_3 (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

As concentrações plasmáticas de bicarbonato, ureia, creatinina, sódio, potássio, cloro, cálcio total, fósforo, fosfatase alcalina eram determinadas num analisador automático, multiparamétrico Hitachi 717 (Boehringer-Mannheim, França). O cálcio ionizado era medido no sangue total, através dum eléctrodo selectivo (Radiometer, Copenhagen, Denmark). As determinações

eram realizadas de imediato, após a colheita das amostras de sangue, principalmente as dos gases do sangue e dos bicarbonatos.

No sacrifício foi também doseada no plasma de todos os animais da Experiência II:

— A PTH - era determinada pela utilização dum teste comercial de radioimunoensaio, utilizando um anticorpo humano dirigido contra o fragmento N terminal 1-34 da PTH (Kit INS PTH Nichols Institute, San Juan, Capistrano, CA, USA). Este fragmento tem a particularidade de não se acumular nas situações de IRC, e o seu anticorpo é o único que actua contra a PTH do rato, tendo sido publicado recentemente a validação desta técnica no rato [136].

— A concentração de 25 (OH) D era determinada, a partir de amostras de 50 µl de plasma, quantificando-se por radiocompetição com proteína de ligação obtida a partir do soro do rato, técnica descrita por Preece e col [137] e posteriormente modificada por Shepard e col [130].

— A concentração plasmática de 1,25 $(OH)_2$ D era obtida através da modificação do método de Shepard e col [130]. Assim, a

partir duma amostra de 1 ml de plasma, era feita uma extracção lipídica com uma mistura de metileno-clorido: metanol. Os extractos obtidos após a referida extracção eram cromatografados numa coluna 1x20 cm de Sephadex LH20 (Pharmacia), usando como solvente o n-hexano: cloroforme: metanol (9:1:1 por vol.). A concentração de 1,25 $(OH)_2$ D nas amostras plasmáticas era quantificada por radiocompetição com cytosol intestinal do frango. O coeficiente de variação para 8 amostras diferentes purificadas de plasma no presente estudo, foi de 8,5%±2,0, sendo o limite inferior de detecção de 5 pg/ml.

— As concentrações de IGF_1 eram obtidas de acordo com a técnica descrita para este efeito no Estudo 2.

— A concentração urinária de cálcio era determinada por espectrofotometria de absorção atómica (Perkin Elmer 460) e a do fósforo e creatinina através dum autoanalisador Technicon (SMA 12, Bayer, Dublin, Irlande).

— O método nefelométrico de sulfato de bário era utilizado na quantificação do sulfato urinário [138].

— A concentração urinária de hidroxiprolina era obtida através da modificação do método de Kivirikko [140-141].

3.4.2 Metabolismo fosfocálcico e ósseo

3.4.2 - a) Balanço Fosfocálcico

Um balanço fosfocálcico foi efectuado em todos os ratos na Experiência II, com determinação das concentrações de cálcio e fósforo na urina e fezes dos últimos 3 dias do protocolo experimental. As fezes eram de imediato congeladas e guardadas para as determinações posteriores.

As amostras de fezes eram então pesadas e homogeneizadas com água dionizada (1/1 peso/volume). Entre 3 a 5 gramas do homogeneizado era posteriormente seco numa estufa a 130^{o}C durante 18 horas, pesado e incinerado num forno tipo 48000 Furnace (Thermolyne Sybron) a 600^{o}C durante 12 horas. As cinzas eram dissolvidas em 5 ml de HCL (1 mol/l) + 45 ml de água idionizada. O cálcio e o fósforo eram determindos segundo as técnicas anteriormente referidas, na sua determinação urinária.

3.4.2 - b) Conteúdo Mineral Ósseo

Os dois fémures eram retirados e pesados. Dado ambos terem peso similar, somente o fémur direito era utilizado para determinação do seu conteúdo mineral. O fémur era seco numa estufa durante 12 horas a uma temperatura de 100^{o}C, pesado e incinerado num forno como o anteriormente descrito, durante 24 horas a 600^{o}C e repesado.

O peso da componente orgânica óssea seria a diferença entre o peso seco do fémur e o peso após incineração.

Quer a dissolução das cinzas, quer a quantificação do seu conteúdo em cálcio e fósforo, eram determinados como o descrito anteriormente para as fezes.

3.4.2 - c) Histomorfometria

As metáfises proximais das tíbias eram fixadas segundo o plano frontal e fixadas numa solução de Karnowski's. Uma era descalcificada em 10% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e utilizado para a contagem de osteoclastos [139].

A outra metáfise era fixada em 40% (vol/vol) de etanol a + 4^{o}C durante 24 horas. Após desidratação em etanol a + 20^{o}C os

fragmentos ósseos eram embebidos em metilmetracrilato. Secções frontais de 4 μm eram obtidas com um micrótomo AO Spencer equipado com uma lâmina em tungsténio e fixados em azul de Toluidine (pH 6,4) [142], para estudos histomorfométricos em microscopia óptica [143-144].

As diáfises tibiais eram fixadas em álcool absoluto. Cortes perpendiculares ao eixo longitudinal, ao nível do segmento proximal da região fibular da tíbia, com espessuras de 35 μm, eram obtidos com utilização da máquina de corte (Buehler Isomat, Buehler Ldt, Evanston, IL).

Dois a quatro cortes eram utilizados para microscopia de imunofluorescência e óptica, após redução da espessura dos cortes por polimento manual em superfície de vidro poroso, para valores de 10 a 15 μm.

Os estudos histomorfométricos eram obtidos através da utilização dum método semi-automático, usando um microscópio de imunofluorescência (Zeiss), equipado com mesa digital, acopulado a um microcomputador (Zeiss Morphomat 10).

Todos os valores calculados por animal eram a média de 100 determinações por corte, feitas a intervalos regulares ao longo da circunferência da superfície periosteal para os estudos diafisários.

Uma ampliação de x250 era usada, excepto para as determinações da espessura da cartilagem de crescimento (x30) e do tecido osteoide (x400).

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

A — Ao nível da metáfise proximal da tíbia

- Espessura da cartilagem de crescimento (ECC) (μm)

Determinação da média das distâncias entre a margem distal do cortex epifisial, até junção metafisal da cartilagem de crescimento, obtida em 3 cortes por animal e em 6 sítios equidistantes por corte.

- Contagem de osteoclastos (CO) (mm^2)

Determina-se pela contagem de osteoclastos por mm^2.

B — Ao nível da diáfise tibial

- Velocidade de formação óssea (VFO)

(mm^3 /diax10^{-3})

Determina-se pela quantidade de osso mineralizado formado por dia. Obtém-se dividindo a superfície total entre as 2 marcas de tetraciclina no periósteo, pelo intervalo de tempo entre as duas injecções de tetraciclina, considerando que a diáfise tibial nas proximidades da junção fibular tem uma forma cilíndrica.

- Superfície de reabsorção óssea (SRO) (mm^2)

Determina-se pela medição da superfície endosteal não marcada pela tetraciclina.

- Espessura osteóide (EO) (μm)

Determina-se pela média da espessura em cortes corados com azul de Toluidine da banda ortocromática periosteal, em contacto com a matrix mineralizada metacromática.

3.4.3 - Metabolismo proteico

3.4.3 a) Velocidade de síntese proteica (VSP)

a_1) Princípios e cálculos

Três dias antes do fim do estudo, os ratos de cada grupo eram randomizados de acordo com o peso corporal e o comprimento em 3 sub-grupos (1 a 3). O primeiro sub-grupo (n=5) era imediatamente morto para determinação da massa proteica (massa tecidular x concentração proteica) inicial.

Os outros sub-grupos eram mortos no fim do período de estudo com determinação da massa proteica muscular final e da VSP ao nível do músculo gastrocnémico, o qual requer dois tempos diferentes de determinação, após injecção intravenosa duma dose de carga (150 mM) de fenilalanina marcada (L-ring-4-3H phenylalanine, CEA, Saclay, Gif sur Yvette), segundo a técnica descrita por Garlick e col [145]. A solução de fenilalanina injectada é preparada para ter uma actividade específica de 0,33 Ci/mole.

O músculo gastrocnémico era extraído após dois minutos no sub-grupo 2 (n=5) e após dez minutos no sub-grupo 3 (n=10). Os tecidos musculares eram imediatamente congelados em azoto líquido.

A VSP era calculada individualmente em cada rato através da determinação da actividade específica da fenilalanina intracelular libre (FIL) e da determinação da fenilalanina incorporada nas proteínas musculares (FIP) do gastrocnémico, usando-se a seguinte fórmula:

$$VSP = \frac{FIP}{FIL} \times \frac{1}{t} \times 1000$$

onde a FIL era a média de duas determinações (2 e 10 minutos) após injecção da fenilalanina e a FIP era a concentração obtida após 10 minutos da injecção.

O tempo de remoção do amino-ácido injectado no tecido muscular (t) foi quantificado em cada rato.

a_2) Técnica

Foi administrada a todos os ratos uma injecção de solução de fenilalanina marcada com trício (1 ml/100 g de peso corporal).

Os ratos eram em seguida decapitados, o sangue era armazenado em tubos heparinizados ou contendo EDTA, e o músculo gastrocnémico era extraído, pesado e congelado rapidamente em azoto líquido. O tecido era posteriormente pulverizado num triturador magnético (Spex 6700 Freezer / Mill,

Industries INC, Edison, NJ USA). O pó obtido era guardado a -115°C em azoto líquido.

Uma amostra de 0,1 a 0,15 g de pó tecidular era diluído em 3 ml de ácido perclorídrico 2% (m/v), sendo em seguida centrifugado, durante 20 minutos a + 4°C, de maneira a poder separar-se a fase proteica (sedimento) da fase contendo os AA libres (sobrenadante).

1) O sobrenadante era recuperado, adicionando-se 1,5 ml de citrato saturado de tripotássio originando uma precipitação de $KCLO_4$ e um pH de 6,0. Após centrifugação durante 15 minutos o sobrenadante (solução SL) era utilizado para a determinação da actividade específica da fenilalanina livre.

2) O sedimento, correspondente à fase proteica era lavado 3 vezes com 10 ml de ácido perclorídrico a 2%, sendo posteriormente suspenso em 10 ml de Na OH 0,3N e incubado durante 1 hora a 37°C para solubilizar as proteínas, as quais eram doseadas segundo a técnica de Lowry [146]. A solução proteica era de novo precipitada em 1 ml de ácido perclorídrico a 40%, centrifugada durante 20 minutos, de maneira a poder-se recuperar o

sobrenadante ácido solúvel, contendo o RNA, o qual era quantificado por medição espectrofotométrica de dois comprimentos de onda em UV [147] (espectrofotómetro Uvikon 930, Kontron Instruments, Suiça). O sedimento contendo as proteínas era lavado 3 vezes em ácido perclorídrico a 2%, sendo em seguida hidrolizado em 3 ml de HCL 6N durante 18 horas a 110^{o}C . O HCL era evaporado (Speed Vac Concentrator, Savant) e o hidrolisado, uma vez seco, era diluído em 3 ml de citrato de sódio pH=6 (solução SP).

A actividade específica da 3H fenilalanina era determinada nas soluções SL e SP, após conversão enzimática da fenilalanina num produto aminado, a B-feniletilamina: 1 ml de cada solução SL e SP era incubado durante a noite a 50^{o}C com 0,25 ou 0,5 ml respectivamente duma suspensão contendo 1,4 unidades de L-tirosina descarboxilase (Streptococcus fecalis tipo I) por ml de tampão de citrato de sódio 0,5 M pH 6,3 e 1 mg/ml de fosfatos de piridoxol. A β-feniletilamina era extraída, recuperando-se sucessiva-

mente a fase orgânica da mistura da amostra + Na OH 3N + n-heptano, seguida da fase aquosa da mistura: fase orgânica + H_2 SO_4 0,02N. A separação das fases era feita por congelação, após agitação da mistura.

Estas etapas permitiam a eliminação da tirosina que poderia interferir na determinação.

A concentração de B-feniletilamina que deriva da fenilalanina inicialmente presente, foi determinada por fluorimetria, após incubação a 60°C durante 1 hora, 1 ml da fracção livre SL ou 20 µl da fracção ligada na presença duma mistura contendo 0,5 ml de leucilalanina 2 mM, 1 ml de ninhidrina 50 mN e 2,5 ml dum tampão de fosfato de potássio 1M a pH 8,0. As amostras eram lidas em fluorescência relativa a 495 nm (excitação 390 nm) (Fluorimètre SFM 25, Kontron Instruments, Suiça), contra uma gama de B feniletilamina (0 a 20 mM). A reacção era sensível à luz, sendo pois necessário conservar os reactivos na escuridão.

A radioactividade (3 H) associada ao produto de derivação, foi medida através dum contador de cintilação líquido (Minaxi Tricarb 4000, Packard Instruments SA) na presença duma mistura de cintilação líquida (Instagel, Packard).

A actividade específica do AA (fenilalanina) é a relação entre a radioactividade sobre a concentração total do produto de derivação (B feniletilamina).

3.4.3 - b) Velocidade de crescimento e degradação proteica

A velocidade de crescimento proteico (VCP) foi determinada pelo aumento da massa proteica muscular, durante os últimos 3 dias da experiência.

Esta representa a diferença entre a massa proteica muscular (massa tecidular x concentração proteica) determinada no fim da experiência e a massa proteica muscular determinada 3 dias antes do fim da experiência. Esta última foi determinada em 5 a 6 animais de cada grupo, mortos 3 dias antes do fim do período de estudo e se-

leccionados tendo como base um peso corporal e um compri-memto idênticos ao dos outros animais mortos no fim da experiência.

A massa tecidular e a concentração proteica foram determinadas segundo as técnicas anteriormente referidas.

A velocidade de degradação proteica (VDP) representa a diferença entre a VSP (%/dia de proteínas sintetizadas) e a VCP (%/dia de proteínas depositadas para o crescimento do tecido muscular).

Todas as colheitas foram efectuadas 6 horas após a última refeição, para que todos os ratos estivessem em idênticas condições de jejum.

IV.3.5 - Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos, foi efectuada num computador Macintosh Classic e estudados estatisticamente pelo programa Stat View^{TM}II.

De acordo com os objectivos, utilizámos vários métodos estatísticos:

- "t-test - Para comparação de médias entre dois grupos;

- Análise de regressão linear - Para estudar a variação de uma grandeza em função de outra.

- Correlação - Para estudar a interdependência entre duas grandezas

Para todos os métodos consideramos como significativo $p \leq 0,05$. Os valores são apresentados em média ± DP no Estudo I e em média ± SEM nos Estudos II e III.

V - RESULTADOS

V - RESULTADOS

V.1 - ESTUDO - 1: Crescimento, desenvolvimento pubertário e estatura final na acidose tubular distal

1.1 - Caracterização da população, dados clínicos, laboratoriais e radiológicos

De acordo com as características da população na metodologia utilizada, dum total de 34 crianças, 6 foram excluídas dada a presença de IRC na altura do diagnóstico. As restantes 28 foram incluídas no estudo. O Grupo I era constituído por 16 crianças (10 rapazes e 6 raparigas) com idades compreendidas entre 2 semanas e 2 anos) e o Grupo II por 12 crianças (7 raparigas e 5 rapazes com idades compreendidas entre 3 e 11 anos). Representavam 24 famílias, todas eram caucasianas, sendo 14 de origem norte-africana, uma região com grande consanguinidade.

Dez tinham uma incidência familiar, com duas (2 famílias), três (2 famílias) e mesmo quatro (1 família) crianças afectadas. Não foi detectado qualquer sintoma aparente nos pais ou nos restantes familiares das gerações precedentes, sugerindo uma transmissão de tipo recessivo.

Todos os pais tinham testes de acidificação considerados normais.

A surdez estava associada a ATR_1 em 14 crianças pertencentes a 11 famílias. Estava presente desde o nascimento em 6 crianças, tendo-se desenvolvido progressivamente entre os 3 e 12 anos nas restantes oito.

Três crianças com ATR_1 da mesma família apresentavam uma surdez congénita. Pelo contrário, noutra família com 3 crianças com ATR_{-1}, uma tinha surdez congénita, enquanto as outras duas que eram gémeas, apresentavam audiogramas normais aos 3 anos de idade. Noutra família com 2 crianças com ATR_1, uma tinha uma surdez congénita, enquanto a outra apresentava um audiograma normal aos 18 anos de idade.

A idade à data do diagnóstico variou entre duas semanas e 11 anos, com valores médios de 0,51±0,15 anos no Grupo I e 7,10±0,90 no Grupo II.

Os sintomas iniciais incluíam vómitos e má progressão ponderal no Grupo I e atraso do crescimento no Grupo II (Quadro 2). As alterações laboratoriais características da ATR_1, estavam presentes em todos os doentes (Quadro 2): diminuição do bicarbonato plasmático (≤17,5 mmol/l); hiperclorémia (≥110 mmol/l); pH urinário alcalino (≥6) e uma diminuição na excreção ácida total pela urina (50 μEq/min/m^2). Uma diminuição do potássio sérico (≤3,5 mmol/l) estava presente em 18 doentes. O sódio plasmático era normal em 22 doentes, estando levemente aumentado (>145 mmol/l) em 6 doentes, situações que se acompanhavam de desidratação.

Relativamente ao metabolismo foscálcico, o cálcio total e o fósforo plasmático estavam normais em todos os doentes. Pelo contrário, o cálcio ionizado encontrava-se aumentado (≥1,30 mmol/l) em todos os doentes (Quadro 3). Quanto às outras concentrações plasmáticas, estavam dentro do normal à excepção das verificadas nos doentes nºs 5,14,15,16,19,23 e 26 que apresentavam concentrações plasmáticas baixas de 25 (OH) D (4 a 5 ng/ml) e 1,25 $(OH)_2$ D (12 a 21 pg/ml), associadamente com um aumento moderado da paratormona e da fosfatase alcalina e uma ligeira dimi-

Quadro 2. Alterações clínicas e laboratoriais à data do diagnóstico

Doente	Idade (meses)	Origem	Estatura (SDS)	Concentrações plasmáticas (mmol/l) Na	K	Cl	Ca	P	HCO_3	Cl creat (ml/min/1.73m2)	pH urinário mínimo	EAT (µEq/min/m2)	Calciúria (mg/kg/d)	Sintomas clínicos	Calcific. renais	Doença óssea	Surdez
1	0,5	NA	-1,0	144	3,0	114	2,33	2,09	17,5	80	7,04	21	6,1	V/H			Não
2	0,5	NA	-1,0	140	4,2	110	2,50	2,03	17,5	90	7,12	23	5,0	V/D/H			Não
3	1	NA	-0,5	145	4,0	115	2,35	1,96	17,0	110	7,01	28	5,7	V/H			Sim
4	1	P	-1,0	138	3,6	114	2,47	2,01	17,0	125	6,20	24	10,0	V/H			Não
5	2	NA	-3,5	138	2,5	115	2,46	1,65	10,0	130	6,30	25	7,5	V/H	N	R	Sim
6	2	NA	-1,5	145	2,6	120	2,60	1,67	14,0	105	7,50	36	2,0	V/H			Sim
7	2	P	-2,0	140	3,8	115	2,58	1,79	9,0	100	7,03	45	8,0	V/H			Sim
8	4	NA	-2,0	139	3,9	118	2,51	1,85	13,0	95	6,45	27	4,2	V/H	N/NL	OST	Sim
9	4	F	-4,25	142	2,8	110	2,52	1,75	9,0	104	6,12	20	8,0	V/H		OST	Sim
10	4	F	-0,5	137	3,0	112	2,51	1,80	14,3	115	6,18	23	7,0	V/D/H	N		Não
11	5	F	-2,5	138	3,2	116	2,48	1,77	13,0	85	6,10	29	4,0	AC/V/H		OST	Não
12	11	F	-4,0	147	3,2	113	2,51	1,79	10,0	93	6,08	28	10,0	V/D/H		OST	Sim
13	12	NA	-4,0	140	2,4	108	2,50	1,65	10,0	102	6,70	23	6,0	AC			Sim
14	12	F	-2,0	145	4,0	116	2,37	1,50	14,0	101	6,25	28	5,0	V/H		R	Sim
15	14	NA	-3,0	150	3,0	110	2,60	1,61	13,0	98	6,00	33	13,0	V/H		R	Sim
16	24	NA	-3,5	146	3,2	117	2,32	1,51	10,0	87	6,70	23	4,0	AC		R	Sim
17	36	F	-2,5	139	3,4	110	2,51	1,45	12,5	120	7,20	28	3,0		N/NL	OST	Não
18	42	NA	-3,5	142	3,2	113	2,55	1,45	12,0	111	6,50	34	11,0	AC	N	OST	Não
19	44	NA	-9,0	141	2,5	113	2,30	1,55	8,0	107	7,00	47	13,0	AC	N	R	Sim
20	48	F	-2,5	149	3,8	117	2,55	1,40	12,0	109	6,01	36	6,8	V/AC	N/NL	OST	Não
21	60	F	-3,75	136	3,5	126	2,51	1,44	15,0	89	6,15	23	6,0	AC	N/NL	OST	Não
22	91	F	-1,0	152	3,8	116	2,50	1,40	17,0	94	6,15	25	5,5		N/NL		Não
23	102	NA	-5,0	141	2,6	118	2,35	1,45	11,0	97	6,95	21	8,5	AC	N	R	Sim
24	108	F	-3,5	145	1,8	113	2,45	1,35	16,5	112	6,10	22	10,0	V/AC	N	OST	Não
25	108	F	-3,5	141	3,7	110	2,42	1,35	14,0	116	6,45	21	4,4	AC		OST	Não
26	114	NA	-8,0	142	2,0	116	2,31	1,32	8,0	95	7,00	30	4,0	AC	N/NL	R	Sim
27	132	NA	-2,5	139	1,8	111	2,48	1,32	16,0	110	6,30	25	10,0	AC	N/NL	OST	Não
28	132	F	-1,75	148	3,6	110	2,51	1,30	15,0	98	6,68	27	7,5		N	OST	Não

Abreviações: NA: Norte de África ; F: França ; P: Portugal ; V: Vómitos ; H: Hipotrofia ; D: Diarreia ; AC: Atraso de crescimento ; N: Nefrocalcinose ; NL: Nefrolitíase ; R: Raquitismo ; OST: Osteopenia ; Cl creat: Clearence da creatinina ; EAT: Excreção ácida total.

Quadro 3. Metabolismo fosfocálcico à data do diagnóstico

Doentes	CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS					
	Ca^{++} (mmol/l)	F.A. (U/L)	PTH (pg/ml)	$25(OH)D_3$ (ng/ml)	$1,25(OH)_2D$ (pg/ml)	T.R.F. (%)
1	1,38	65	32	9	32	87
2	1,39	100	36	11,5	28	87
3	1,43	130	18	15	26	84
4	1,35	190	38	10	38	85
5	1,40	250	68	5	16	60
6	1,41	180	30	10	25	85
7	1,36	150	35	15	60	89
8	1,37	160	25	18	55	90
9	1,35	140	29	20	40	86
10	1,34	180	40	28	38	84
11	1,33	120	45	26	45	88
12	1,31	130	30	22	75	89
13	1,39	110	60	20	70	90
14	1,43	230	69	4	15	75
15	1,40	280	72	5	14	78
16	1,39	260	78	4	12	73
17	1,35	100	28	15	36	89
18	1,37	120	25	10	40	88
19	1,38	220	70	5	20	78
20	1,31	140	30	13	50	91
21	1,32	98	35	18	55	90
22	1,33	110	30	20	40	88
23	1,40	240	65	4	19	79
24	1,42	120	40	25	40	87
25	1,40	98	35	20	50	88
26	1,37	230	67	5	21	75
27	1,38	150	50	10	35	86
28	1,35	170	45	15	40	90
Valores normais	1,19-1,30	90-200	15-60	6-30		84-91
<2 anos					20-80	
>2 anos					30-60	

T.R.F.: Taxa de reabsorção do fósforo; F.A.: Fosfatase alcalina; C^{++}: Cálcio ionizado; PTH: Hormona paratiroideia.

nuição da taxa de reabsorção tubular do fósforo e sinais radiológicos de raquitismo.

A excreção urinária de cálcio era superior a 4 mg/Kg/dia em 23 crianças, sendo superior a 8 mg/Kg/dia em oito (Quadro 2). A taxa de filtração glomerular, avaliada pelo clearence da creatinina, encontrava-se dentro dos valores normais (Quadro 2), permanecendo normal durante todo o seguimento.

A nefrocalcinose estava presente à data do diagnóstico em 14 crianças (3/16 no Grupo I e 11/12 no Grupo II) (Quadro 2). Em 4 crianças a nefrocalcinose apareceu somente durante o seguimento, havendo em duas delas uma má adesão ao tratamento.

Dezanove crianças tinham lesões ósseas diagnosticadas pelo estudo radiológico. Sete apresentavam raquitismo e doze osteopenia.

1.2 - Crescimento: estatura inicial, evolução estatural e da velocidade do crescimento após o início do tratamento, crescimento pubertário e estatura adulta

A estatura média à data do diagnóstico era inferior à média da população francesa de referência em todos os doentes, variando de -0,5 SDS a -4,25 SDS no Grupo I e de -1 SDS a -9 SDS no Grupo II (Quadro 2). A média estatural inicial no Grupo I, era de -2,3±0,3 SDS, sendo inferior a -2,5 SDS (Fig.2; Quadro 4) em 7 crianças.

Um atraso moderado no crescimento estava presente em 6 crianças, com estaturas iniciais variando entre -0,5 SDS e -1,5 SDS, tendo contudo idades inferiores a 4 meses à data do diagnóstico (Fig. 2; Quadro 2). A estatura média no Grupo II era muito baixa -3,9±0,7 SDS, sendo significativamente inferior à do Grupo I ($p<0,001$). À excepção de duas crianças, a estatura era nas restantes inferior a -2,5 SDS, sendo mesmo inferior a -5 SDS em três delas (Fig.2; Quadro 4).

Considerando todos os doentes, a estatura inicial expressa em "SDS", apresentava uma correlação significativa com a concentração plasmática de bicarbonato (Fig.6) ($r=0,74$; $p<0,0001$),

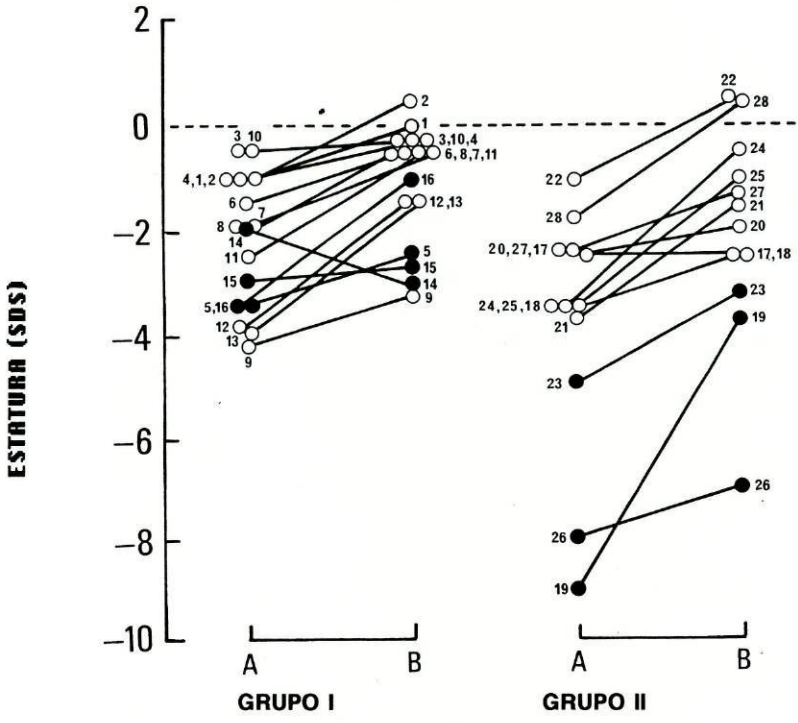


Figura 2 - Estatura no início do tratamento (A) e na última observação (B)

(●) doentes com raquitismo; (○) doentes sem raquitismo

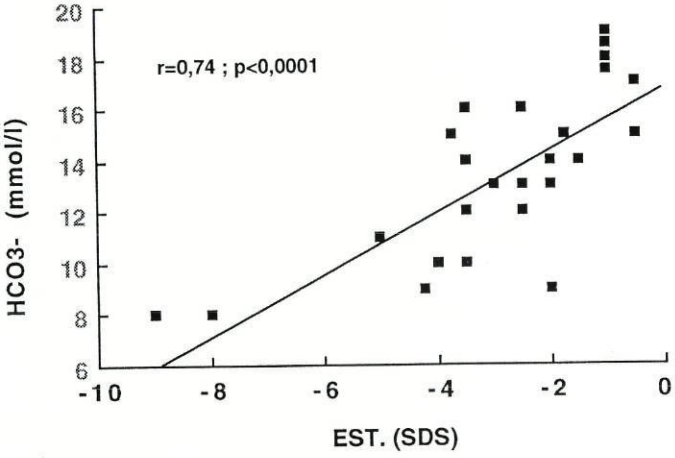


Figura 6: Correlação entre a concentração plasmática do bicarbonato e a estatura à data do diagnóstico.

Quadro 4: Dados sobre o crescimento no início e no fim do estudo

	Idade cronológica (anos)	Idade óssea (anos)	Estatura (SDS)	Velocidade de crescimento (SDS)	Ganho estatural (SDS)
No início					
grupo I	0,51 ± 0,15	0,34 ± 0,13	-2,30 ± 0,30	-2,37 ± 0,40	-
grupo II	7,10 ± 0,90	4.50 ± 0,80^{+}	-3,90 ± 0,70	-1,54 ± 0,23	-
+ 2 anos					
grupo I		2,40 ± 0,15	-1.07 ± 0.34^{+++}	+0,67 ± 0,27^{+++}	+1,08 ± 0,25
grupo II		6,50 ± 0,81	-2,70 ± 0,60	+1,80 ± 0,23^{+++}	+1,17 ± 0,30
Última observação					
grupo I	13,70 ± 0,51	-	-1,10 ± 0,30^{+++}	-	+1,09 ± 0,23
grupo II	14,20 ± 0,57	-	-2,00 ± 0,60^{+++}	-	+1,93 ± 0,50

$^{+}p < 0.05$: *vs* idade cronológica; $^{+++}p < 0,001$: *vs* dados no início

do potássio (Fig.7) ($r=0,53$; $p<0,01$), e com a velocidade do crescimento antes do início do tratamento (Fig.8) ($r=0,54$; $p<0,01$). A estatura inicial estava inversamente correlacionada com a idade à data do diagnóstico no Grupo I (Fig.9) ($r= -0,57$; $p<0,01$) mas não no Grupo II ($r=0,35$; $p<0,43$).Não se encontrou qualquer correlação entre a estatura inicial, expressa em "SDS", e a calciúria,apesar duma correlação inversamente significativa entre a calciúria e a acidose ($r= -0,62$; $p<0,001$).

As crianças com maior atraso estatural no Grupo II, eram as que apresentavam associadamente lesões de raquitismo (Fig.2).

A média das velocidades do crescimento no Grupo I (-2,37±0,40 SDS) não era estatisticamente diferente da do Grupo II (-1,54±0,23 SDS) (Quadro 4). A média das idades ósseas (0,34±0,13 anos) era sobreponível à média das idades cronológicas no Grupo I, enquanto um atraso na idade óssea estava presente no Grupo II (média das idades ósseas de 4,5±0,8 anos) $p<0,05$ *versus* idade cronológica (Quadro 4).

Somente as crianças do Grupo II, principalmente as que tinham raquitismo, apresentavam um atraso na idade óssea no início do tratamento.

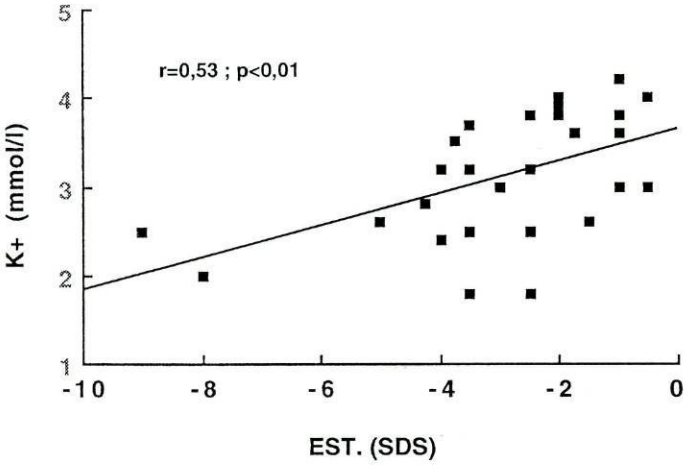


Figura 7: Correlação entre a concentração plasmática de potássio e a estatura à data do diagnóstico.

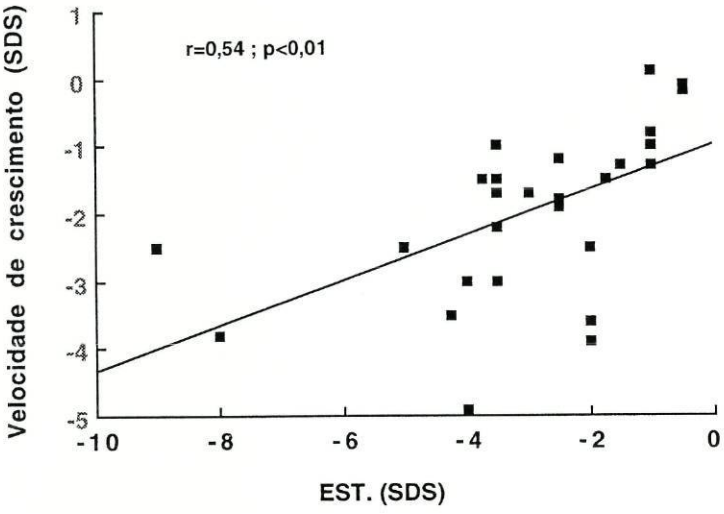


Figura 8: Correlação entre a velocidade de crescimento e a estatura à data do diagnóstico.

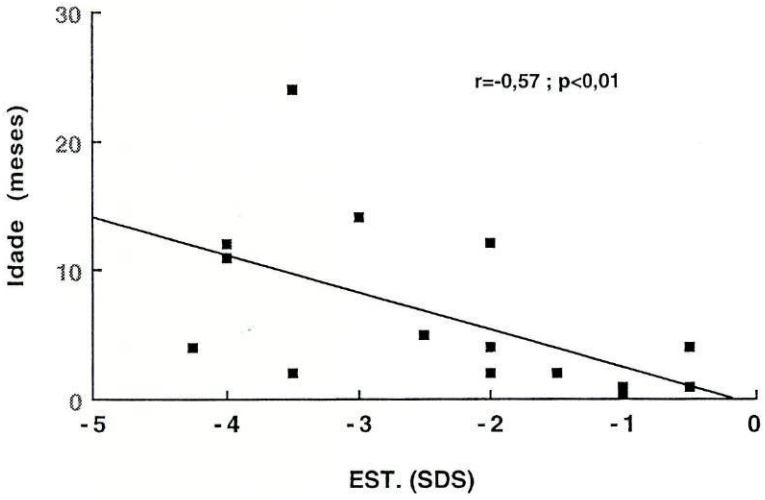


Figura 9: Correlação entre a idade nos doentes do Grupo I e a estatura no início do tratamento.

Evolução estatural e da velocidade do crescimento após início do tratamento

O tempo médio de seguimento foi de 13,20±0,36 anos no Grupo I e 7,1±0,3 anos no Grupo II. A recuperação do atraso estatural fez-se essencialmente durante os dois primeiros anos de tratamento.

A média do ganho estatural no Grupo I foi de +1,08±0,25 SDS, tendo ocorrido essencialmente nos dois primeiros anos. No Grupo II a média do ganho estatural foi de +1,17±0,30 SDS durante os dois primeiros anos, havendo contudo um ganho adicional de +0,7±0,2 SDS até ao fim do período de estudo (Quadro 4). Todos os doentes com ganho estatural apresentavam níveis médios de bicarbonato plasmático de 21 mmol/l, enquanto o doente (nº 15) que permaneceu no mesmo SDS, apresentava níveis médios de bicarbonato plasmático de 18 mmol/l sendo de 16 mmol/l, no único doente (nº 14) que agravou o atraso estatural (Fig.2).

Todas as crianças apresentavam um importante atraso na velocidade de crescimento durante o período de acidose metabólica, o que era revertido após correcção da acidose com o tratamento com bicarbonato, induzindo um aumento significativo da

velocidade de crescimento, excedendo na maioria dos doentes a média da população francesa de referência (Fig.3). A média das velocidades de crescimento foi de +0,70±0,09 SDS no primeiro ano de tratamento no Grupo I e de +2,80±0,28 SDS no Grupo II. A média das velocidades de crescimento, desceu ligeiramente durante o segundo ano de tratamento para +0,25±0,03 SDS no Grupo I e para +1,04±0,60 SDS no Grupo II, não sendo contudo estatisticamente diferente da verificada durante o primeiro ano da terapêutica.

Não houve aceleração da idade óssea após o início da terapêutica em nenhum dos doentes, mantendo-se uma idade óssea sobreponível à idade cronológica após os dois primeiros anos da terapêutica, nos doentes do Grupo I e nos doentes do Grupo II o atraso na idade óssea verificado no início da terapêutica era idêntico, após 2 anos de tratamento, apesar duma aceleração do crescimento nestas crianças (Quadro 4).

Na última observação a média das idades cronológicas eram de 13,70±0,51 no Grupo I e de 14,20±0,57 no Grupo II (Quadro 4).

A média estatural no Grupo I na última observação era de -1,1±0,3 SDS, correspondendo um ganho estatura l signficativo

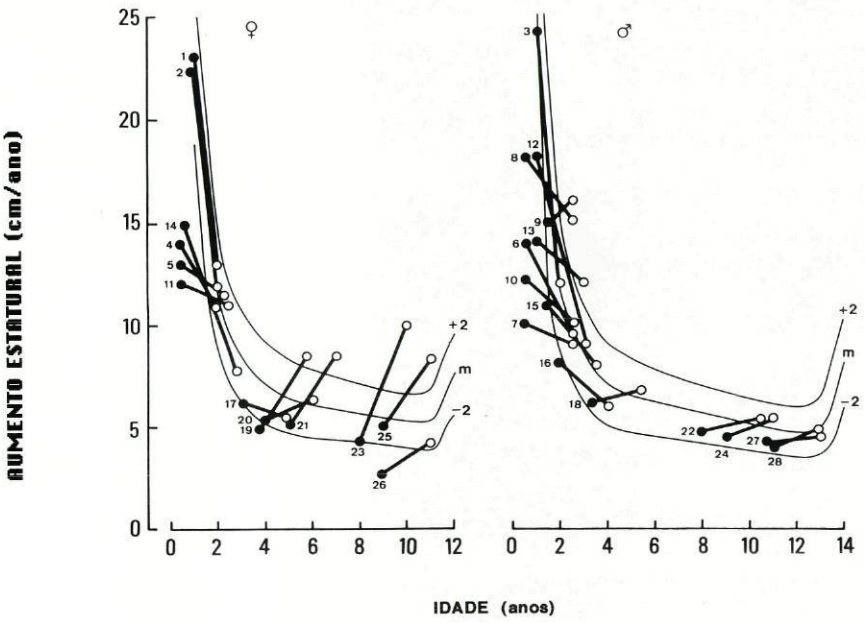


Figura 3 - Alterações na velocidade de crescimento

● **Velocidade de crescimento nos 6 meses anteriores ao início do tratamento**

○ **Velocidade de crescimento nos dois anos posteriores ao início do tratamento**

($p<0,001$), relativamente à média estatural inicial (+1,09±0,23 SDS) (Quadro 4).

A única criança (nº 14) que agravou o seu atraso estatural, apresentava uma má adesão ao tratamento, não atingindo concentrações plasmáticas normais de bicarbonato. A outra criança com má adesão à terapêutica (nº 15), permaneceu no mesmo SDS (Fig.2).

No Grupo II a média estatural na última observação era de -2±0,6 SDS, correspondendo também um ganho estatural significativo ($p<0,001$) relativamente à média estatural inicial (+1,93±0,50 SDS) (Quadro 4).

Como se pode ver pela figura 2, apesar das variações individuais nos ganhos estaturais, a estatura na última observação, dependia essencialmente da severidade do atraso de crescimento verificado na altura do diagnóstico. Assim as crianças com maior atraso estatural, no início do tratamento, correspondiam às crianças com atraso estatural mais grave durante o seguimento, mesmo quando um ganho estatural importante era observado (doentes nºs 19 e 23).

Crescimento pubertário

Dados relativamente ao crescimento durante a puberdade foram obtidos em 9 rapazes e 3 raparigas (Fig.4). Dois dos rapazes com má adesão ao tratamento, não apresentaram picos normais de crescimento pubertário, mantendo contudo um crescimento até à idade de 20 anos.

Os restantes 10 doentes tiveram uma maturação e crescimento normal durante a puberdade. Nestes a média das idades cronológicas no início da puberdade era de 10,3±1,1 anos nas raparigas e de 13,6±0,5 anos nos rapazes, com amplas variações individuais. A média das idades cronológicas no fim da puberdade era de 13,5±1,3 anos nas raparigas e de 16,3±0,5 anos nos rapazes.

A média dos ganhos estaturais durante o período pubertário foi de 19,3±0,5 cm nas raparigas e de 20,1±1,2 cm nos rapazes.

Estatura adulta

Nove rapazes e 3 raparigas atingiram a estatura definitiva durante o período de estudo. A fusão das epífises com paragem do

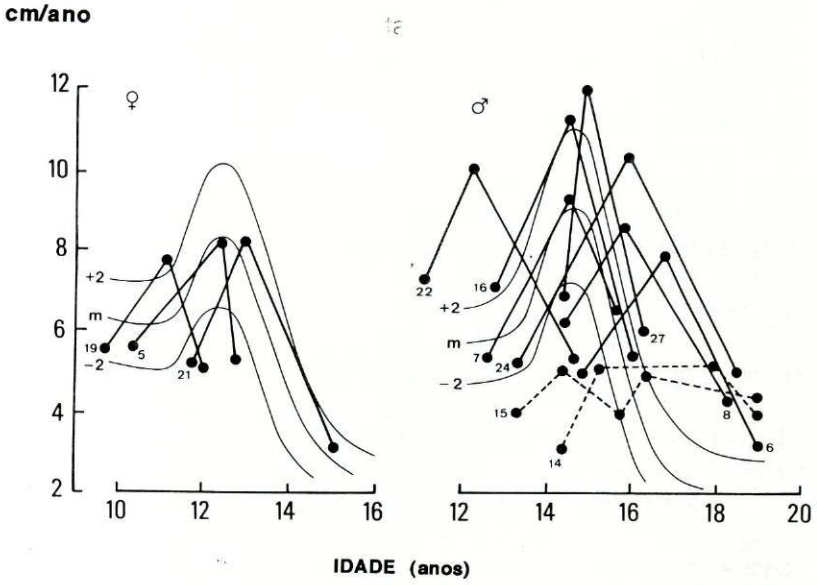


Figura 4 - Crescimento dos doentes durante o período pubertal (n=12)

—— Doentes com acidose controlada

--- Doentes com deficiente controlo da acidose

crescimento ocorreu entre os 17 e 18,5 anos nas raparigas e 18,5 e 22 anos nos rapazes. A estatura final foi de 170±2 cm nos rapazes e 155±2 cm nas raparigas, com estaturas médias de -1,4±0,4 SDS para ambos os sexos.

A estatura média adulta das 7 crianças sem lesões de raquitismo no início do tratamento (-0,6±0,2 SDS) era significativamente maior ($p<0,05$), relativamente às restantes 5 crianças com lesões de raquitismo no início do tratamento, apesar duma ausência de diferença no início do tratamento.

A estatura média adulta nestas 5 crianças com lesões ósseas de raquitismo no início do tratamento, era muito baixa em 4 delas (-3 SDS) (Fig.5).

A estatura média adulta após correcção pela estatura média dos pais era de -1,08±0,40 SDS (Fig.5).

Como se pode ver, esta correcção não mudou significativamente a estatura final, visto a estatura média dos pais estar dentro dos valores normais (-1,25 SDS a +0,75 SDS).

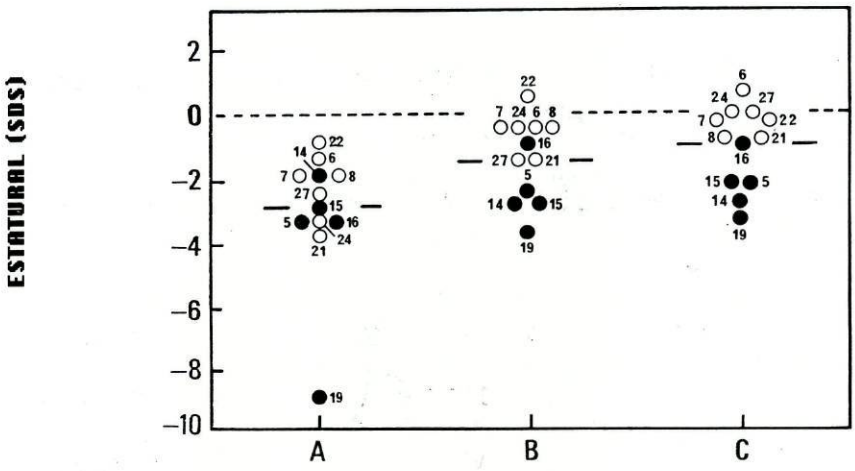


Figura 5 - Alterações estaturais nos doentes que atingiram a estatura adulta (n=12)

A: início do tratamento; B: estatura adulta; C: estatura adulta corrigida

1.3 - Tratamento

O tratamento consistiu em bicarbonato de sódio isoladamente em 10 doentes, associando-se nos restantes uma suplementação em potássio, dada a diminuição dos seus níveis plasmáticos.

A dose média em bicarbonato de sódio foi de 7,3±0,8 mmol/Kg/dia no Grupo I e 4,0±0,8 mmol/Kg/dia no Grupo II. Durante o seguimento, não foi possível suspender o bicarbonato de sódio em nenhum doente. Todos necessitavam aproximadamente de 2 mmol/Kg/dia na última observação. Uma má adesão ao tratamento esteve presente em duas crianças (nºs 14 e15) com valores de bicarbonato plasmático inferiores a 18 mmol/l durante o seguimento. Nas restantes 26, obteve-se uma normalização do bicarbonato plasmático, com concentrações superiores a 21 mmol/l, calciúrias inferiores a 2 mg/Kg/dia e cálcio ionizado inferior a 1,30 mmol/l, indicando uma adesão satisfatória.

Os sete doentes com raquitismo receberam 3 000 IU de vitamina D durante 6 semanas, seguido dos 400 IU de vitamina D posteriormente, com normalização biológica e radiológica ao fim de 3 meses.

V.2 - ESTUDO 2: Secreção da hormona de crescimento, na acidose metabólica crónica de causa renal

2.1 - Caracterização da população

De acordo com as características da população na metodologia utilizada, foram seleccionadas 12 crianças, que foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo era constituído por 6 crianças com ATR_1 (3 do sexo masculino e 3 do sexo feminino), com idade cronológica média de 8,5±2,3 anos (limites 5 a 12 anos), e estatura variando entre -1,3 e +1,5 SDS. O segundo grupo incluía 6 crianças com IRC (3 do sexo masculino e 3 do sexo feminino), com idade cronológica média de 8,2±2,2 anos (limites de 5 a 13 anos), e estatura variando entre -2,2 e -1,8 SDS.

2.2 - Equilíbrio ácido-base

As concentrações de bicarbonato no plasma e o pH nas crianças com ATR_1 e IRC, eram normais nos períodos sem acidose (Quadro 5).

Como esperado nos períodos com acidose, as concentrações de bicarbonato no plasma e o pH eram significativamente inferiores ($p<0,0001$), sendo idêntica a severidade da acidose nos dois grupos.

2.3 - Perfis de secreção de 24 h da hormona de crescimento

Os padrões da secreção espontânea da HC nos períodos sem acidose, eram idênticos nos dois grupos, e normais de acordo com o definido na metodologia (Quadro 6).

Foi observada uma maior secreção de HC durante a noite (Figuras 10,11). Os picos de secreção máxima de HC registados foram de 19,6±1,4 µg/l no grupo com IRC, e 15,7±0,9 µg/l no grupo com ATR_1 (Quadro 6). Nos dois períodos com acidose houve uma diminuição na secreção de HC (Figuras 10,11). Os picos de secreção máxima de HC eram significativamente inferiores aos

QUADRO 5 - EQUILÍBRIO ÁCIDO-BASE

GRUPO		pH	HCO_3
INSUFICIÊNCIA RENAL CRÓNICA	A	7,39±0,01 $^{++++}$	24,6±0,4 $^{++++}$
(n=6)	B	7,27±0.01	16,6±0.4
ACIDOSE TUBULAR RENAL	A	7,39±0.01 $^{++++}$	25,1±0,5 $^{++++}$
(n=6)	B	7,25±0,01	16,1±0,6

(A) - sem acidose ; (B) - com acidose

$^{++++}$ p<0.0001 ; vs B

QUADRO 6: CARACTERÍSTICAS DA SECREÇÃO DE HC E IGF1

GRUPO		Secreção espontânea nas 24 horas de HC (µg/L)				Teste de estimulação HC Arginina/Insulina (µg/L)	IGF1 (ng/ml)
		Concentração média HC	Pico máximo HC	Nº Picos	Concentração basal		
INSUFICIÊNCIA RENAL CRÓNICA (n=6)	A	5,2±0,3 $^{++++}$	19,6±1,4 *	5,0±0,4	1,4±0,2	20,5±1,5 $^{++++}$	330±21 $^{+++}$
	B	3,0±0,1	8,8±0,4	5,1±0,3	1,4±0,1	9,45±0,9	166±15
ACIDOSE TUBULAR RENAL (n=6)	A	4,8±0,2 $^{++++}$	15,7±0,9 $^{++++}$	5,1±0,3	1,2±0,1	17,1±1,7 $^{+++}$	271±19 $^{+}$
	B	2,7±0,2	7,2±0,9	5,0±0,4	1,2±0,1	7,9±0,8	156±17

(A) - sem acidose ; (B) - com acidose

$^{+}$p < 0.05 ; $^{+++}$ p < 0.001 ; $^{++++}$ p < 0.0001 ; vs B

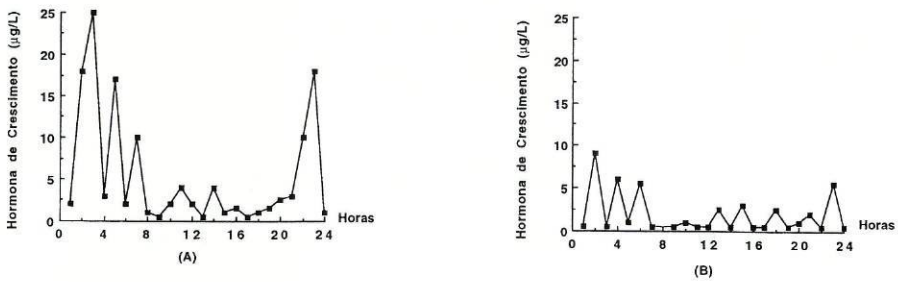


Figura 10: Secreção espontânea de HC nas 24 horas no grupo com IRC
(A) - Período sem acidose; (B) - Período com acidose

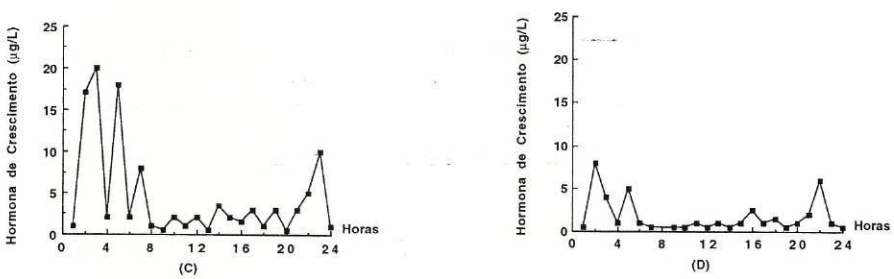


Figura 11: Secreção espontânea de HC nas 24 horas no grupo com ATR
(C) - Período sem acidose; (D) - Período com acidose

dos períodos sem acidose (8,9±0,4 µg/l; p<0,05) no grupo com IRC e (7,2±0,9 µg/l; p<0,0001) nos grupos com ATR_1 (Quadro 6).

As concentrações médias de HC nos períodos sem acidose (5,2±0,3 µg/l/h no grupo com IRC e 4,8±0,2 µg/l/h no grupo ATR_1) eram significativamente superiores (p<0,0001), às verificadas nos períodos com acidose (3,0±0,1µg/l/h no grupo com IRC e 2,7±0,1 µg/l/h no grupo com ATR_1). (Quadro 6).

As concentrações basais e o número de picos secretórios diários, não eram influenciáveis pela presença ou não de acidose, sendo idêntica nos dois grupos de estudo (Quadro 6).

Verificou-se uma correlação significativa (p<0,0001) entre a secreção de HC nas 24 horas e as concentrações de bicarbonato no plasma e com o pH nos períodos com e sem acidose(Figura 12).

2.4 - Testes de estimulação farmacológicos com hormona de crescimento

As concentrações máximas de HC após estimulação farmacológica com Arginina/Insulina era idêntica nos dois grupos nos períodos sem acidose (20,5±1,5 µg/l no grupo com IRC e

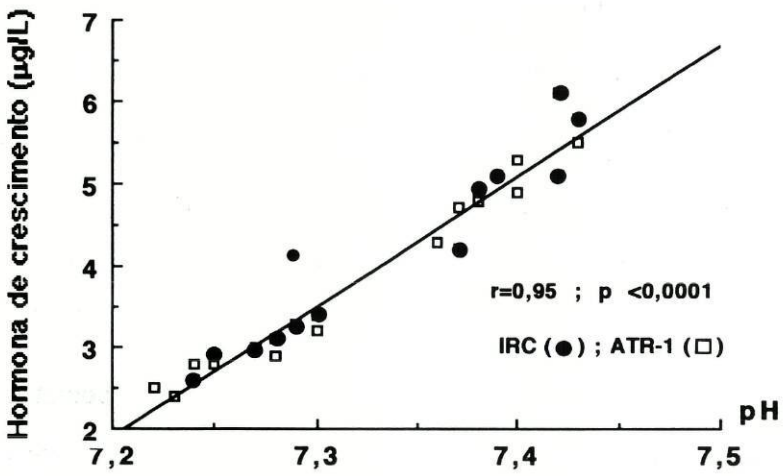


Figura 12 : Correlação entre a secreção expontânea de HC nas 24 h e o pH.

17,1±1,7 µg/l no grupo com ATR_1) e normais, de acordo com o definido na metodologia. Nos períodos com acidose a concentração máxima de HC era significativamente inferior (9,4±0,9 µg/l; p<0,0001 no grupo com IRC) e (7,9±0,9 µg/l; p<0,001 no grupo com ATR_1) (Quadro 6).

2.5 - Concentração plasmática do factor 1 do crescimento semelhante a insulina

Concentrações de IGF_1

As concentrações de IGF_1 eram idênticas nos dois grupos nos períodos sem acidose (330±21 ng/ml no grupo com IRC e 271±19 ng/ml no grupo com ATR_1) (Quadro 6). Durante o período com acidose houve uma baixa significativa nas concentrações plasmáticas de IGF_1 (166±15 ng/ml; p<0,001) no grupo com IRC e (156±17 ng/ml; p<0,05) no grupo com ATR_1.

Uma correlação significativa (p<0,0001) estava presente entre as concentrações plasmáticas de IGF_1 e as de bicarbonato no plasma e com o pH nos períodos com e sem acidose (Figura 13).

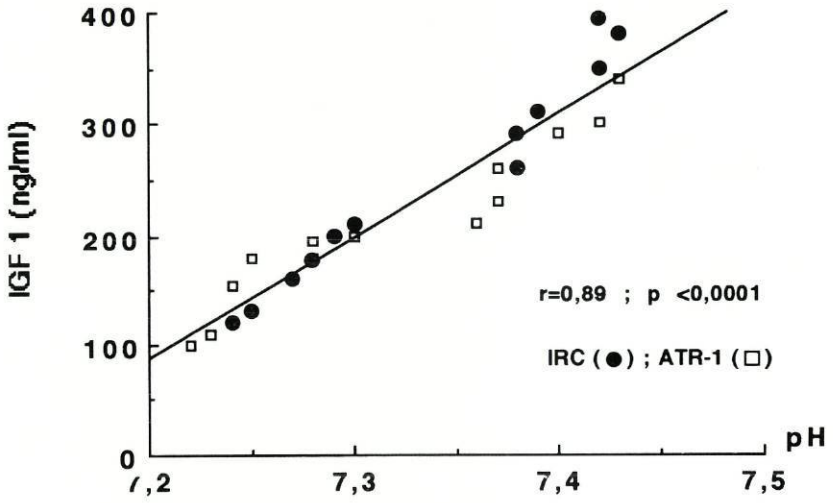


Figura 13 : Correlação entre a concentração plasmática de IGF1 e o pH.

Uma correlação significativa ($r=0,91$; $p<0,0001$) estava também presente entre a concentração média de HC nas 24 horas e as concentrações plasmáticas de IGF_1 em ambos os períodos.

V.3 - ESTUDO 3: Influência da acidose metabólica crónica de causa renal no crescimento: efeito sobre o metabolismo fosfocálcico, ósseo e proteico

V.3.1 - EXPERIÊNCIA I: Influência da acidose no atraso do crescimento

3.1.1 Equilíbrio ácido-básico e função renal

Os resultados biológicos estão resumidos no Quadro 7. Como previsto, a concentração plasmática de bicarbonato estava dependente do pH sanguíneo O pCO_2 era normal (média=38 Torr), excluindo-se uma acidose respiratória associada. As concentrações plasmáticas de bicarbonato variavam entre 6,2 e 21 mmol/l nos ratos UA. Em todos os grupos de ratos UNA, o equilíbrio ácido-básico era normal, com valores de pH sanguíneo variando entre 7,38 e 7,46 e as concentrações de bicarbonato no plasma entre 22 e 27 mmol/l.

QUADRO 7: Equilíbrio ácido-base e concentrações plasmáticas de creatinina nos diferentes grupos

	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5	
	UA	UNA	UA	UNA	UA	UNA	UA	UNA	UA	UNA
	n=7	n=7	n=16	n=16	n=13	n=13	n=9	n=9	n=6	n=6
pH sanguíneo	7,33±0,01	7,41±0,01	7,28±0,01	7,40±0,01	7,23±0,01	7,42±0,01	7,15±0,01	7,40±0,01	7,02±0,04	7,38±0,01
Bicarbonato plasmático (mmol/l)	20±1	25±1	18±1	26±1	15±1	24±1	11±1	24±1	8±1	24±1
Creatinina plasmática (µmol/l)	54±4	56±5	62±2	63±2	67±3	72±3	81±4	83±3	91±7	92±5

Concentrações plasmáticas normais de creatinina, em ratos da mesma idade, são geralmente de 25 µmol/l.

Nos ratos acidóticos a severidade da acidose variava de acordo com a severidade da função renal, apresentando uma correlação inversamente proporcional entre as concentrações de creatinina plasmática e o pH sanguíneo (Fig. 14).

Cada rato UA foi emparelhado retrospectivamente com um rato UNA, de acordo com o mesmo grau de influência renal. Foram em seguida constituídos 5 grupos de ratos, de acordo com o emparelhamento anteriormente referido, sendo a variação do grupo 1 ao grupo 5, dependente do aumento da gravidade da insuficiência renal.

Os valores médios da creatinina plasmática dos diferentes grupos estão assinalados no Quadro 7.

3.1.2 Consumo alimentar

Como se observa na Figura 15, o consumo alimentar diminuía de acordo com a severidade da IRC, quer nos ratos UA como nos UNA. A importância da acidose, dentro de cada nível de insuficiência renal, foi estimada pela comparação entre os ratos UA e UNA do mesmo grupo. Em qualquer dos níveis de insuficiência renal, o apetite não era afectado pela acidose, mesmo quando severa.

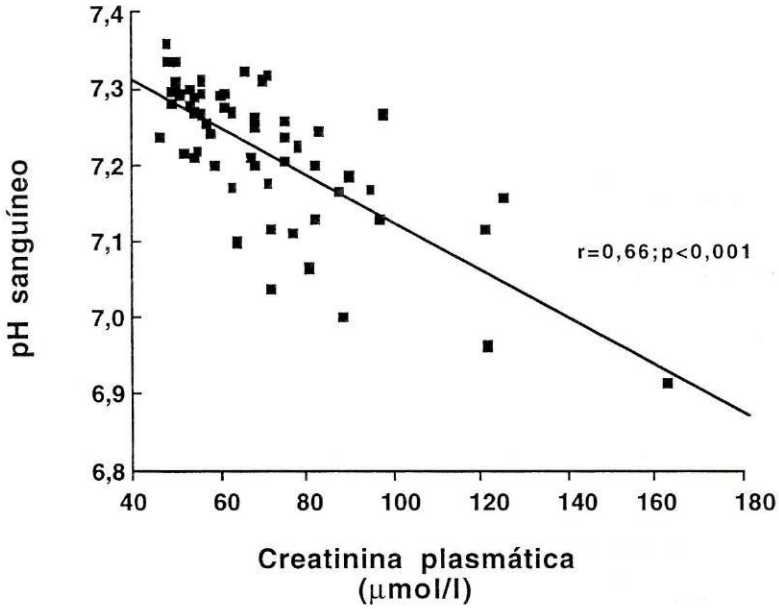


Figura 14:Correlação entre o pH sanguíneo e as concentrações plasmáticas de creatinina nos ratos urémicos acidóticos.

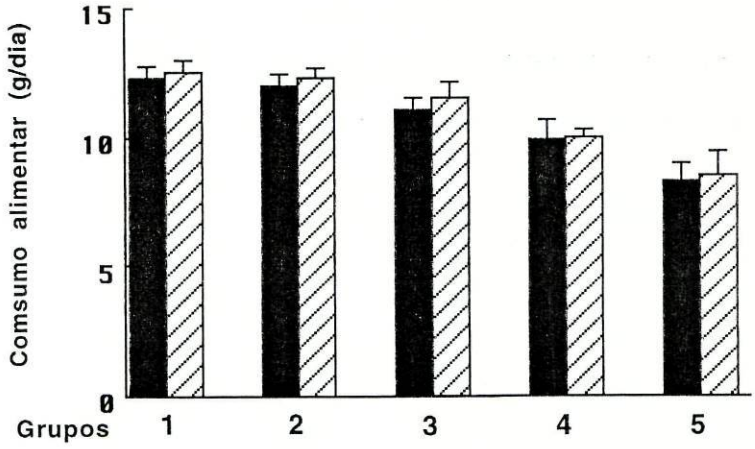


Figura 15: Consumo alimentar:Comparação entre ratos acidóticos UA e não acidóticos UNA com função renal idêntica.Os ratos UA foram subdivididos em 5 grupos (1 a 5) de acordo com a severidade crescente da acidose, que dependia da severidade da insuficiência renal. Cada rato UA foi comparado retrospectivamente com um rato UNA com concentrações plasmáticas de creatinina idênticas.

■ Urémicos acidóticos (UA) ▨ Urémicos não acidóticos (UNA)

3.1.3 Crescimento

Como se observa na Figura 16, os ganhos de peso e de comprimento dependiam também, dos níveis de insuficiência renal, diminuindo do grupo 1 ao grupo 5, nos ratos UA como nos ratos UNA.

Comparando os ratos UA e UNA do mesmo grupo, verificou-se que o crescimento ponderal só era afectado na presença de acidoses severas (pH < 7,20; HCO_3 < 15 mol/l), correspondendo aos grupos 4 e 5.

O crescimento em comprimento, pelo contrário, não era afectado nas acidoses ligeiras, sendo contudo mais sensível à acidose que o crescimento ponderal, visto estar diminuído na presença de acidoses menos intensas (pH < 7,25), grupo 3.

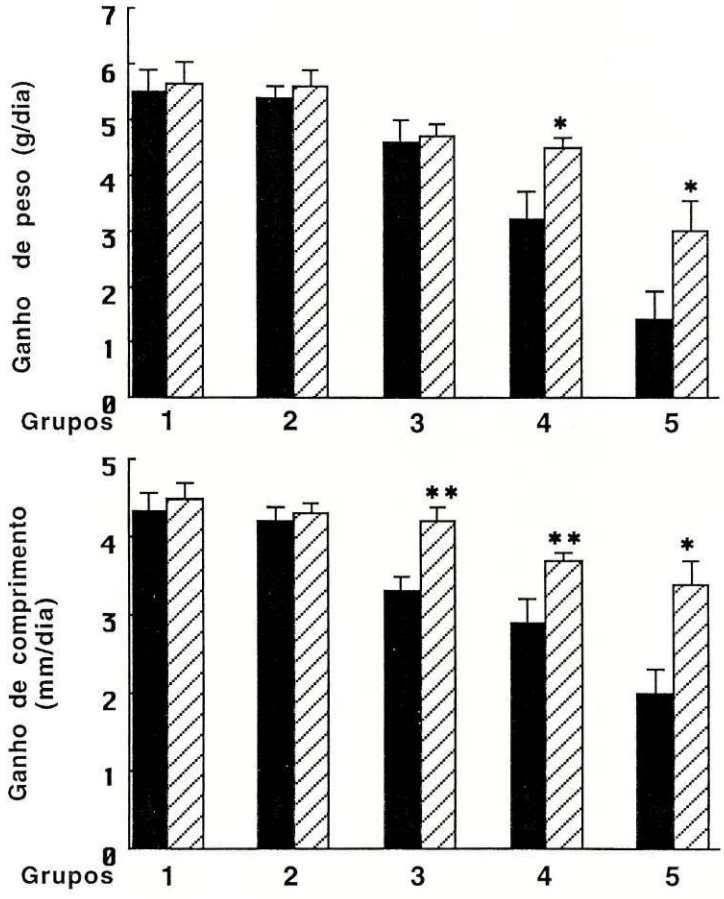


Figura 16: Ganhos de peso e comprimento: Comparaçãoentre ratos acidóticos (UA) e não acidóticos (UNA) com função renal idêntica.Os ratos UA foram subdivididos em 5 grupos (1 a 5) de acordo com a severidade crescente da acidose, quedependia da severidade da insuficiência renal. Cada rato UA foi comparado retrospectivamente com um rato UNA, com concentrações plasmáticas de creatinina idênticas. UA vsUNA : * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

■ Urémicos acidóticos (UA) ▨ Urémicos não acidóticos (UNA)

3.2 - EXPERIÊNCIA II: Influência da acidose no metabolismo fosfocálcico e ósseo

3.2.1 Dados nutricionais e plasmáticos

De acordo com o pretendido neste estudo, como foi detalhado na metodologia, não havia diferenças nos ganhos ponderais e do comprimento entre os grupos acidóticos e não acidóticos (TA *vs* TNA e UA *vs* UNA). O consumo alimentar foi também idêntico, nos ratos acidóticos e não acidóticos, espontaneamente nos ratos urémicos como na Experiência I e através dum "pair feeding" nos ratos com função renal normal (TA e TNA) (Quadro 8).

Um idêntico ganho de comprimento, era uma das condições do protocolo, o que foi dependente duma nefrectomia moderada (70% de excisão do parênquima renal), originando uma acidose ligeira, logo como anteriormente verificado, sem alteração do crescimento.

O pH sanguíneo e os bicarbonatos plasmáticos eram normais nos ratos UNA e TNA. Como esperado, estavam diminuídos nos grupos UA e TA.

QUADRO 8: Consumo alimentar e crescimento de ratos acidóticos e não acidóticos, com ou sem urémia

	TNA	TA	UNA	UA
Consuma alimentar (g/dia)	11,3±0,3	11,3±0,2	11,3±0,16	11,2±0,17
Ganho de peso (g/dia)	3,9±0,2	3,8±0,2	3,75±0,29	3,69±0,22
Ganho de comprimento (mm/dia)	3,8±0,2	3,6±0,3	3,7±0,2	3,6±0,2

Os ratos UA e UNA, tinham as mesmas concentrações plasmáticas de creatinina, com clearences da creatinina de cerca de 30% do dos ratos com função renal normal (Quadro 9).

As concentrações plasmáticas de cálcio total e fósforo, eram idênticas nos grupos acidóticos e não acidóticos, enquanto que o cálcio ionizado encontrava-se mais elevado nos grupos acidóticos, quer fossem urémicos ou não. A acidose diminuía também as concentrações de fosfatase alcalina (Quadro 9).

3.2.2 Dados urinários

Um aumento da excreção diária de cálcio pela urina (Quadro 10) estava presente em ambos os grupos acidóticos, sendo comparativamente inferior em ambos os grupos urémicos ($p<0,0001$).

As excreções urinárias diárias de sulfatos e fósforo não eram estatisticamente diferentes nos 4 grupos (Quadro 10).

A excreção urinária diária de hidroxiprolina estava aumentada na presença da acidose nos grupos com e sem urémia (Quadro 10).

QUADRO 9: Dados biológicos de ratos acidóticos e não acidóticos, com ou sem urémia

	TNA	TA	UNA	UA
pH sanguíneo	7,38±0,04	7,25±0,13^{+++}	7,38±0,09	7,25±0,11^{xxx}
HCO3- plasmático (mmol/l)	25,3±0,4	16±0,5 $^{+++}$	25,2±0,4	15,4±0,5^{xxx}
Clearance da creatinina (ml/mn)	1,73±0,01	1,70±0,01	0,58±0,02	0,43±0,01
Cálcio total plasmático (mmol/l)	2,76±0.02	2,74±0,02	2,70±0,04	2,76±0,05
Fósforo plasmático (mmol/l)	2,86±0.06	3,11±0,06	3,06±0,07	3,20±0,09
Cálcio ionizado (mmol/l)	1,38±0,01	1,51±0,01^{+++}	1,33±0,02	1,44±0,01^{xxx}
Fosfatase alcalina (UI/l)	317±19,9	268±14,1^{+}	322±17.8	266±12,7^{x}

TA *vs* TNA: $^{+}$ p<0.05; $^{+++}$ p<0.001; UA vs UNA: ^{x} p<0.05 ^{xxx} p<0.001

QUADRO 10: Dados urinários de ratos acidóticos e não acidóticos, com ou sem urémia

	TNA	TA	UNA	UA
Cálcio (mmol/dia)	0,136±0,020	0,269±0,030^{+++}	0,054±0,007	0,116±0,015
Fósforo (mmol/dia)	.0,181±0,010	0,207±0,020	0,215±0,006	0,215±0,016
Sulfatos (meq/dia)	0,48±0,03	0,43±0,04	0,42±0,03	0,35±0,03
Hidroxiprolina (µmol/mmol creatinia/ dia)	178±6	255±12^{+++}	199±13	309±3^{xx}

TA *vs* TNA: $^{+++}$ p<0,001; $^{+++}$ p<0.0001; UA *vs* UNA: ^{xx} p<0,001

3.2.3 Dados sobre o metabolismo fosfocálcico

Os ratos acidóticos apresentavam uma excreção urinária de cálcio mais elevada e uma diminuição na absorção intestinal de cálcio, originando um balanço cálcico diminuído (Fig.17).

Relativamente ao fósforo, nem a sua excreção urinária, nem a sua absorção intestinal eram afectadas significativamente pela acidose (Fig.17), pelo que o seu balanço permanecia inalterado.

A urémia, por si só, diminuía quer a absorção intestinal de cálcio, quer a sua excreção urinária, pelo que não modificava o balanço cálcico.

3.2.4 - Dados ósseos

A análise do fémur, após incineração, mostrou uma diminuição do seu conteúdo em cálcio, nos grupos acidóticos, comparativamente aos não acidóticos, enquanto o seu conteúdo em fósforo não era alterado pela acidose (Quadro 11).

O estudo histomorfométrico mostrou que a acidose, associada ou não a urémia, acompanhava-se duma diminuição de velocidade de formação óssea, enquanto a superfície de reabsorção óssea a nível diafisário e a contagem de osteoclastos a nível metafisário estavam aumentados.

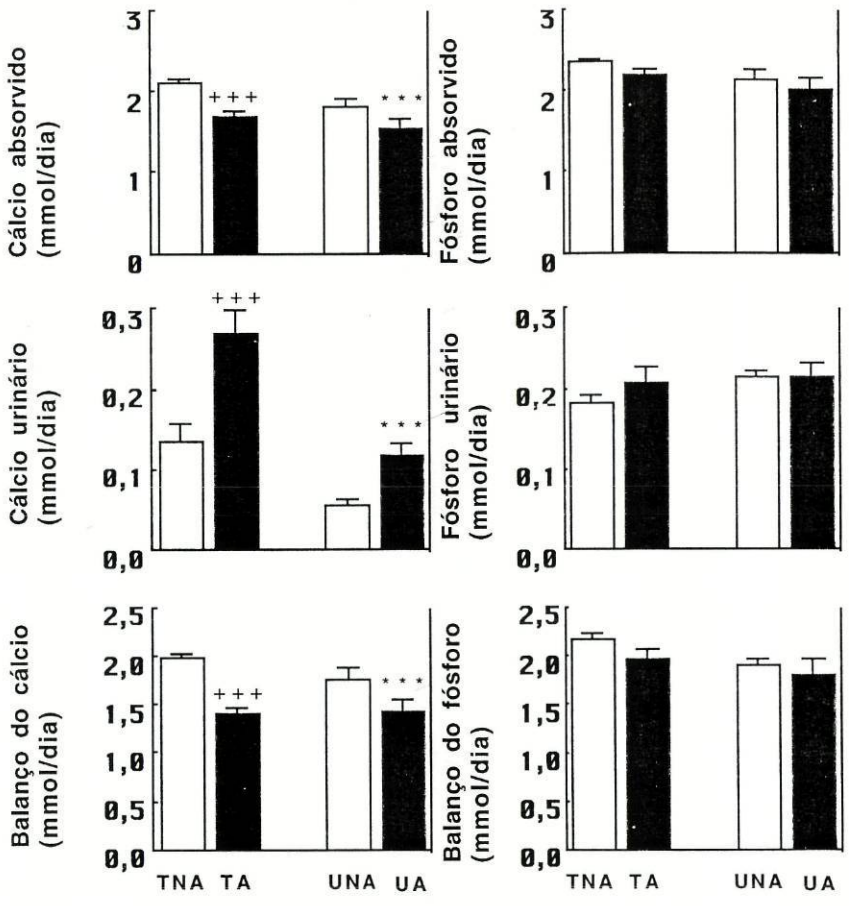


Figura 17 : Dados sobre o balanço fosfocálcico de ratos acidóticos e não acidóticos, com ou sem uremia. TA vs TNA : +++ p<0,001 ;UA vs UNA : *** p<0,001.

QUADRO 11: Peso seco, peso após incineração de fémur, seu conteúdo em cálcio e fósforo de ratos acidóticos, com ou sem urémia

	TNA	TA	UNA	UA
Peso seco (μg)	865±18	748±22^{+++}	818±13	726±29^{xxx}
Peso após incineração (% peso seco)	74,1±0,03	73,1±0,03^{++++}	72,1±0,02	71,2±0,03^{xxxx}
Cálcio (mmol/mg peso seco)	2,59±0,07	2,14±0,06^{++++}	2,38±0,06	2,12±0,05^{xxxx}
Fósforo (mmol/mg peso seco)	2,73±0,07	2,65±0,08	2,75±0,09	2,74±0,05

TA *vs* TNA: $^{+++}p<0,001$; $^{++++}p<0,0001$; UA *vs* UNA: $^{xxx}p<0,001$; $^{xxxx}p<0,0001$

Havia também uma diminuição da espessura osteoide, enquanto a espessura da cartilagem de crescimento não era influenciada pela acidose (Quadro 12). Note-se porém, que a urémia estava associada a um aumento conjunto da formação e da reabsorção óssea, ou seja a uma aceleração do renovamento ósseo, fenómeno bem conhecido na IRC.

3.2.5 - Dados hormonais

Como se observa no Quadro 13, as concentrações plasmáticas de PTH estavam mais elevadas nos ratos urémicos do que nos testemunhas, não havendo contudo, diferença entre os grupos com ou sem acidose (Ta *vs* TNA e UA *vs* UNA).

As concentrações plasmáticas de 25(OH) D eram idênticas em todos os grupos. As concentrações plasmáticas de $1,25(OH)_2$ D não eram influenciadas pela urémia, estando porém diminuídas nos grupos acidóticos. Uma correlação inversa estatisticamente significativa estava presente entre as concentrações plasmáticas de 1,25(OH) e as do cálcio ionizado por um lado e com absorção intestinal de cálcio por outro (Fig.18).

QUADRO 12: Dados histomorfométricos da tíbia de ratos acidóticos e não acidóticos, com ou sem urémia

	TNA	TA	UNA	UA
Velocidade de formação óssea (mm^3/dia x 10^3)	54±3	$19±1^{++++}$	69±6	$38±4^{xxx}$
Superfície de reabsorção óssea (mm^2)	1,53±0,07	1,83±0,04	1,59±0,05	$2,20±0,01^{xxxx}$
Espessura osteoide (µm)	7,13±0,02	$5,83±0,07^{+++}$	7,70±0,02	$5,67±0,02^{xxx}$
Espessura da cartilagem crescimento (µm)	551±15	514±18	656±8	$652±16^{xxxx}$
Contagem de osteoclastos (mm^2)	47,7±0,9	$69,1±0,5^{++++}$	63,4±0,5	$73,4±0,5^{xxx}$

TA *vs* TNA: $^{+++}$ p<0,001; $^{++++}$ p<0,0001; UA*vs* UNA: ^{xxx}p<0,001; ^{xxxx}p<0,0001

QUADRO 13: Dados hormonais no plasma de ratos acidóticos e não acidóticos, com ou sem urémia

	TNA	TA	UNA	UA
PTH (pg/ml))	25,4±1,3	25,3±1,0	32,2±1,5	30,7±1,7
1,25 (OH)2D (pg/ml)	67,9±7,1	46,6±5,9^{+}	56,5±5,2	38,8±3,8^{x}
25 (OH)D (ng/ml)	17,6±0,5	7,2±0,6	6,9±0,7	8,2±0,5
IGF1 (ng/ml)	675±37	467±31^{++}	761±48	614±65^{xx}

TA *vs* TNA: $^{+}$ p<0,05 e $^{++}$ p<0,01; UA*vs* UNA: ^{x}p<0,05 e ^{xx} p<0,01

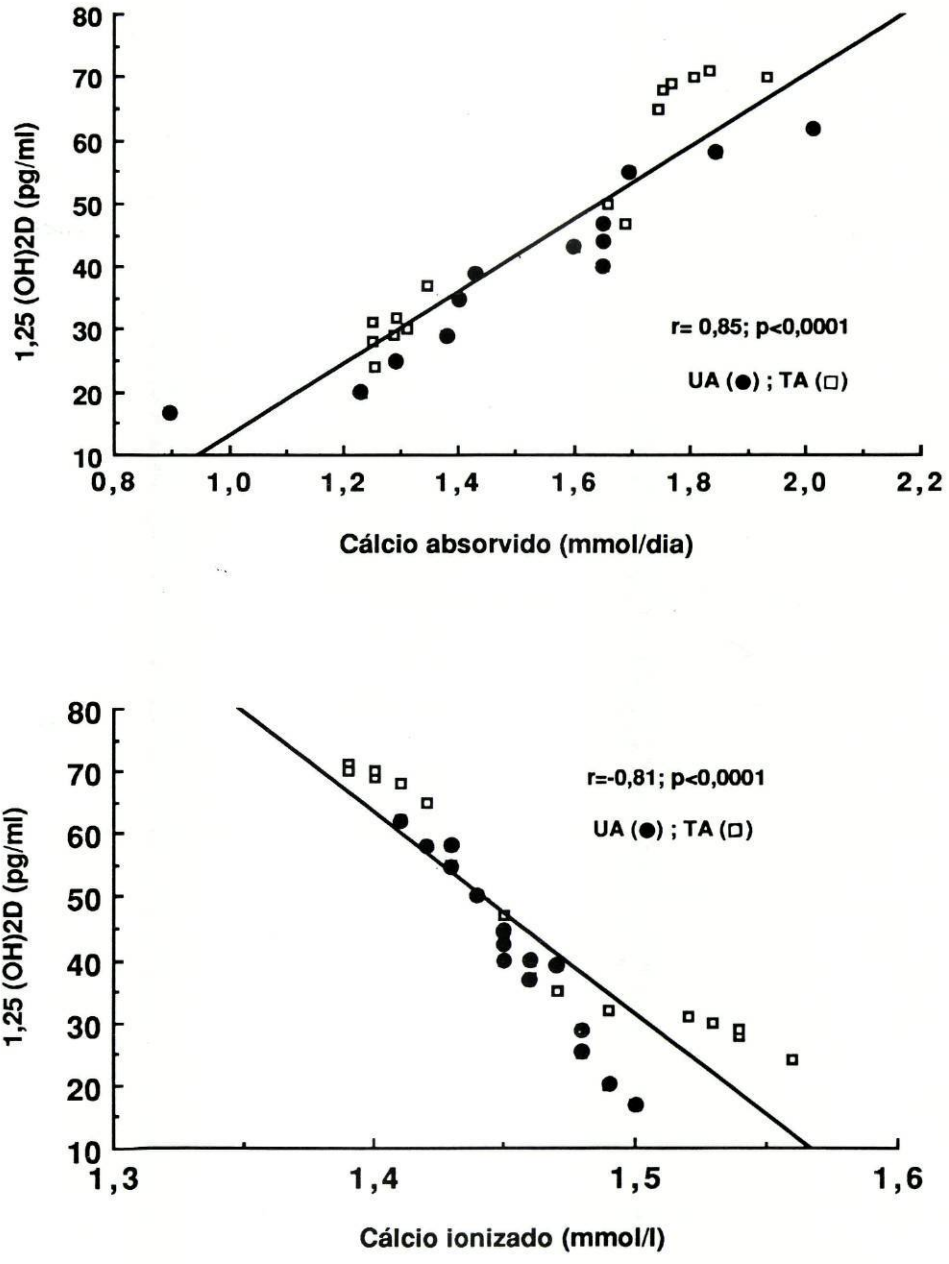


Figura 18: Correlações entre as concentrações plasmáticas de 1,25 (OH)2D e o cálcio absorvido (Figura superior) e o cálcio ionizado (Figura inferior)

As concentrações plasmáticas de IGF_1, determinadas após extracção, estavam significativamente diminuídas na presença da acidose. A IGF_1 encontrava-se ligeiramente aumentada, mas de maneira não significativa nos grupos urémicos (Quadro 13).

3.3 - EXPERIÊNCIA III: Influência da acidose no metabolismo proteico

3.3.1 - Dados plasmáticos

Como mostram os valores de pH sanguíneo e do bicarbonato plasmático (Quadro 14), os ratos UA apresentavam-se com uma acidose severa. O pO_2 e pCO_2 eram normais, como nos estudos anteriores, excluindo-se uma participação respiratória na diminuição do pH. A acidose foi perfeitamente corrigida nos ratos UNA com a suplementação de Na HCO_3.

Os ratos acidóticos UA e não acidóticos UNA apresentavam-se com função renal idêntica, avaliada através da creatinina plasmática, onde a sua concentração era cerca de 3 vezes superior à dos ratos com função renal normal.

QUADRO 14: Dados biológicos de ratos acidóticos e não acidóticos, com ou sem urémia

	TNA	TA	UNA	UA
pH sanguíneo	7,40±0,01	7,18±0,02^{+++}	7,41±0,01	7,22±0,01^{xxx}
HCO^{3-} plasmático (mmol/l)	23,1±0,3	12,5±0,6^{+++}	25,8±0,1	15,0±0,7^{xxx}
Creatinina plasmática (µmol/l)	25,1±0,8	25,4±0,5	69,5±2,3	70,3±3,8
Ureia plasmática (mmol/l)	7,5±0,7	12,1±0,4^{+++}	37,1±2,2	36,5±2,4

TA *vs* TNA: $^{+++}$ p<0,001; UA*vs* UNA: ^{xxx}p<0,001;

As concentrações de ureia plasmática eram idênticas nos grupos UA e UNA.

Os ratos TA recebiam NH_4Cl, desenvolvendo uma acidose severa, como mostram os valores do pH sanguíneo e dos bicarbonatos plasmáticos, enquanto que eram normais no grupo TNA. As concentrações de ureia plasmáticas eram signicativamente mais elevadas nos ratos TA do que nos ratos TNA (Quadro 14).

3.3.2 - Dados nutricionais

Os dados nutricionais estão resumidos no Quadro 15. Os ratos UA tinham o mesmo consumo alimentar que os ratos UNA. Apesar deste facto, os ratos acidóticos UA, tinham um ganho de peso e de comprimento significativamente inferior ao verificado nos ratos sem acidose UNA (Quadro 15). O peso dos dois músculos gastrocnémicos era inferior no grupo acidótico UA, representando porém, a mesma proporção relativamente ao peso corporal como no grupo UNA.

Nos ratos testemunhas a acidose era induzida pela adição de NH_4Cl no aporte hídrico diário, originando uma anorexia, sendo

QUADRO 15: Dados nutricionais, de ratos acidóticos e não acidóticos, com ou sem urémia

Nº de Ratos	TNA	TA	UNA	UA
Consumo alimentar (g/dia)	10,5±0,3	10,5±0,3	11,8±0,5	11,5±0,6
Ganho de peso (g/dia)	3,8±0,2	2,9±0,3	5,0±0,2	$4,0\pm0,4^{x}$
Ganho de comprimento (mm/dia)	4,4±0,2	3,4±0,2+++	4,2±00,2	3,1±0,2xxx
Gastrocnémico (g)	1,86±0,05	1,65±0,07+	2,23±0,13	2,01±0,13x
Gastrocémico (g/100g P.C.)	1,21±0,01	1,20±0,03	1,24±0,02	1,23±0,02

TA *vs* TNA: $^{+}p<0,05$; $^{+++}p<0,001$; P.C. - peso corporal; UA *vs* UNA: $^{x}p<0,05$; $^{xxx}p<0,001$

necessário um sistema de "pair feeding" para se manter um aporte alimentar idêntico entre o grupo acidótico TA e não acidótico TNA.

Apesar do "pair feeding" os ratos TA apresentavam um atraso do crescimento em peso e comprimento, comparativamente aos ratos TNA.

3.3.3 - Dados da síntese e da degradação proteica

Os valores médios da velocidade de síntese proteica (VSP), da velocidade de crescimento proteico (VCP) e da velocidade de degradação proteica (VDP), estão repesentados no (Quadro 16).

Não se encontraram diferenças na VSP entre os ratos UA e os ratos UNA (p=0,462), com mínimas variações de animal para animal. As variações intergrupo eram mais importantes para a VCP, estando porém significativamente diminuída nos ratos acidóticos. Assim, a VDP, diferença entre os dois parâmetros anteriores, era mais importante nos ratos UA do que nos ratos UNA.

A concentração em RNA era idêntica nos ratos UA e UNA (6,3±0,2 *vs* 6,2±0,2 mg/g de proteínas). A concentração em proteínas do músculo não era diferente nos dois grupos (19,8±0,3 *vs* 19,6±0,2 g/100 g).

QUADRO 16: Dados sobre a síntese, crescimento e degradação proteica de ratos acidóticos e não acidóticos, com ou sem urémia

	TNA	TA	UNA	UA
Velocidade de síntese proteica (% dia)	8,3±0,3	8,1±0,3	10,9±0,5	10,4±0,5
Velocidade de crescimento proteico (% dia)	5,2±0,8	3,6±0,7^{+}	5,9±0,6	3,9±0,8^{x}
Velocidade de degradação proteica (% dia)	3,1±0,7	4,5±0,8^{+}	5,1±0,7	6,3±0,9^{x}

TA *vs* TNA: $^{+}p<0,05$; UA *vs* TNA: $^{x}p<0,05$

No modelo de acidose com função renal conservada como na acidose associada a IRC, a acidose não modificava a síntese proteica muscular, uma vez que a VSP era idêntica nos ratos acidóticos TA e não acidóticos TNA (Quadro 16).

A VCP estava significativamente diminuída nos ratos TA, relativamente aos TNA, resultando numa maior VDP nos ratos TA do que nos ratos TNA.

A concentração em RNA era idêntica nos ratos TA e TNA (6,0±0,2 *vs* 6,1±0,2 mg/g proteínas). A concentração em proteínas do músculo não era diferente nos dois grupos testemunhas (19,3±0,2 *vs* 18,9±0,2 g/100 g).

VI - DISCUSSÃO

VI - DISCUSSÃO

VI.1 - ESTUDO 1: Crescimento, desenvolvimento pubertário e estatura final na acidose tubular distal

Os sintomas apresentados pelos doentes do presente estudo não se revelaram específicos, podendo-se assim explicar, o atraso no diagnóstico em metade dos doentes e na maioria dos casos publicados [6,11-12,67,78,150-151].

A nossa série incluía 10 casos familiares com 2 a 4 crianças afectadas. Uma transmissão dominante foi descrita, incluindo crianças com início precoce dos sintomas, não sendo contudo sempre evidente, que os pais e crianças tivessem a mesma doença [6].

A ausência de qualquer sintomatologia nas gerações precedentes na presente série, não é a favor duma transmissão de

tipo dominante, sugerindo um tipo recessivo, o que é apoiado pela enorme consanguinidade presente.

É particularmente interessante verificar que em todos os casos familiares a surdez estava presente, enquanto os doentes sem surdez eram sempre casos esporádicos.

Sete outras crianças apresentavam surdez, não se podendo identificar como esporádica visto terem somente um irmão.

A incidência duma história familiar com surdez era particularmente elevada nos doentes de origem norte-africana. Isto poderia ser devido a alta consanguinidade presente (11 em 14 crianças norte-africanas tinham pais consanguíneos), bem como a enormes fratrias nessas regiões.

A associação de surdez com ATR-1 foi notada pela primeira vez por Royer e Broyer [58], tendo-se publicado desde então 22 casos [60,152-160]. A análise das árvores genealógicas dessas famílias, sugere fortemente uma transmissão autossómica recessiva [161]. Na presente série o número de irmãos afectados (7/42) foi muito provavelmente subestimado, dada a existência de crianças mortas por desidratação de causa desconhecida, em muitas das fratrias norte-africanas. A associação poderia resultar duma ligação entre dois genes, ou depender dum só gene. Contudo, as duas

alterações eram independentes em algumas famílias da nossa série, havendo mesmo uma criança com ATR-1 cujo irmão era somente surdo. Um aparecimento tardio da surdez não pode ser excluído nas crianças diagnosticadas precocemente. Estas alterações não são a favor dum só gene. Até que ponto se está na presença duma associação entre dois genes, permanece por elucidar. A grande maioria dos casos com ATR-1 sem surdez são referenciados na literatura como esporádicos, o que é confirmado pelo presente estudo. Assim, uma causa hereditária para ATR-1 da criança na ausência duma surdez associada parece duvidosa. Aparentemente a existência duma surdez separaria dois tipos diferentes de doença renal, pelo menos no que respeita a hereditariedade.

Nefrocalcinose estava presente em metade dos doentes na presente série. Verificava-se nos dois grupos com ou sem surdez.

A litíase renal, quando presente, estava sempre associada a nefrocalcinose. Nefrocalcinose e litíase renal têm sido frequentemente descritas na ATR-1, sendo consideradas dependentes duma hipercalciúria prolongada [3-7], e duma hipocitratúria [99,151,162], a qual é corrigida pelo tratamento [11,93,163-164]. Outros autores não encontraram evidências de nefrocalcinose [10,165], sugerindo que um tratament o precoce,

poderia prevenir o seu aparecimento. Na presente série, 11 das 14 crianças com nefrocalcinose, tinham idades superiores a 2 anos no início do tratamento. Contudo, Bentur e col [60] publicaram dois irmãos com ATR-$_1$ e nefrocalcinose aos 1 e 4 meses de idade, o que estava também presente em 3 crianças da nossa série. Outros autores descrevem uma grande incidência de nefrocalcinose (63--83%) na ATR-$_1$ [78,150-151,166], tratando-se contudo, de séries em que predominam populações adultas, faltando informações para as idades de início da doença, bem como da sua incidência durante a infância. O risco de aparecimento e progressão duma nefrocalcinose torna imperativo o início precoce e uma não interrupção do tratamento.

Osteomalacia e raquitismo têm sido classicamente descritas como manifestações de ATR-$_1$, devido a acidose metabólica [9,109-110]. Contudo, esta relação deve ser questionada. Osteomalacia e raquitismo não foram encontradas em várias séries publicadas de doentes adultos [150] ou pediátricos [7,10,12], bem como nos estudos experimentais animais de acidose metabólica crónica [52,86], a qual induzia somente osteopenia.

A osteopenia foi um achado frequente na presente série, principalmente nos doentes do Grupo II (8/12). Era provavelmente

dependente dum balanço negativo de cálcio, não afectando porém a estatura definitiva.

Na grande maioria dos doentes, pelo contrário, não se observam lesões de raquitismo, mesmo naqueles com períodos prolongados de acidose metabólica não tratada.

Das sete crianças com raquitismo na altura do diagnóstico, este era muito provavelmente dependente duma carência em vitamina D: todas tinham uma origem norte-africana onde esta forma de raquitismo é frequente; nenhuma tinha recebido suplementação em vitamina D durante o primeiro ano de vida e todo o estudo hormonal e bioquímico era característico de tal deficiência. Assim, nas 21 crianças sem raquitismo antes do início do tratamento, as concentrações plasmáticas de paratormona e dos metabolítos da vitamina D eram normais, demonstrando que a acidose metabólica crónica por si só não origina alterações hormonais, apesar dum aumento das perdas em cálcio, afastando a hipótese do atraso do crescimento observado nas AMC, ser dependente de lesões ósseas secundárias a um hiperparatiroidismo [91-95] ou duma diminuição da síntese renal de 1,25 $(OH)_2$ D [101]. Não se pode,

contudo, excluir como mecanismo responsável por estas lesões ósseas, a existência duma resistência periférica a 1,25 $(OH)_2$ D [78,102], ou uma limitação da capacidade renal de resposta, perante estimulos fisiológicos de aumento da sua produção [103], como foi sugerido por alguns autores.

As 7 crianças com sinais radiológicos de raquitismo apresentavam níveis plasmáticos baixos de 25 (OH) e 1,25 $(OH)_2$ D, com aumento da fosfatase alcalina e paratormoma e uma diminuição da taxa de reabsorção renal do fósforo, o que é característico duma carência em vitamina D.

Vários autores sugeriram a possibilidade da acidose induzir uma perda excessiva de cálcio urinário com hopocalcemia, originando um hiperparatiroidismo [93-94,167], e associadamente um aumento das perdas urinárias em fósforo com hipofostatémia [18,93,99], determinando um raquitismo [4,93]. Contudo nem uma hipocalcemia nem uma hipofosfatemia puderam ser confirmados na presente série, o que afasta também a hipótese do atraso do crescimento observado nas AMC depender da existência de lesões ósseas secundárias a uma hipercalciúria [3,96-98] ou a uma hiperfosfatúria [99-100] como foi proposto por alguns autores. Assim não há

qualquer suporte, que possa correlacionar a acidose metabólica como causa directa do raquitismo, podendo contudo, ser um factor agravante adicional para uma alteração da mineralização da cartilagem de crescimento, principalmente em períodos de rápido crescimento.

É geralmente aceite, que a correcção da acidose com terapêutica alcalina induz um importante aumento nas velocidades de crescimento, com ganhos estaturais, sendo contudo na maior parte dos casos estudos de certa duração.

Dos 4 doentes referidos por Nash e col [12], somente em dois deles há dados quanto à evolução do crescimento. Apesar duma considerável aceleração do crescimento num deles, as estaturas na última observação estavam no percentil 3 e 10.

McSherry e Morris [11] descreveram uma recuperação mais satisfatória do atraso do crescimento com médias estaturais no fim do período de observação no percentil 37. Santos e Chan [10], descrevem a evolução do crescimento após tratamento em 13 doentes da sua série, com variações da estatura média entre o percentil 14 e 30. Três destes doentes permaneceram abaixo do percentil 5 e 3 atingiram o percentil 50. Há muito poucos dados detalhando a evolução da velocidade de crescimento, a qual parece ter uma grande variabilidade individual.

No presente estudo, no início do tratamento os doentes do Grupo II tinham um atraso estatural significativamente mais importante do que os do grupo I. Pelo contrário na última observação não havia diferença significativa entre os dois grupos. Nos dois grupos, os doentes com lesões ósseas, são os mais pequenos.No início do tratamento é de destacar uma correlação significativa entre as concentrações plasmáticas de bicarbonato, potássio e da velocidade de crescimento e a estatura apresentada. A concentração plasmática de bicarbonato, parece ser o principal factor influenciador da estatura apresentada por estas crianças, na altura do diagnóstico, o que é corroborado pela recuperação do atraso do crescimento inicial, bem como posteriormente, um normal crescimento até à idade adulta, estar intimamente ligado a ingestão contínua de bicarbo-nato,em dose suficiente para controlar a acidose. Inversamente, a concentração plasmática de potássio, não parece ser um factor muito importante no atraso do crescimento inicial, a avaliar pelo seu menor significado estatístico, bem como se tornar desnecessário um tratamento com suplementação em potássio, para além dos primeiros anos de tratamento.

Os doentes do Grupo I apresentavam para o mesmo atraso estatural, velocidades de crescimento significativamente mais redu-

zidas do que os do Grupo II. Isto parece estar dependente, com os diferentes períodos de tempo que antecedem o início do tratamento nos dois grupos, dado uma diminuição muito importante da velocidade de crescimento ser necessária, para se obter um atraso de crescimento, em curtos períodos de tempo.

Uma correlação inversa, estatisticamente significativa, estava presente entre a estatura inicial e a duração da acidose, somente nos doentes do Grupol. A ausência de correlação nos doentes do Grupo II é talvez devida a uma tentativa de adaptação destes doentes à acidose.

Não foi possível estabelecer nenhuma relação estatística no início do tratamento entre a estatura e a calciúria, apesar da existência duma correlação inversamente significativa entre o grau de acidose e a calciúria. Tal facto, como já anteriormente foi referido, afasta a hipótese da importância da perda mantida de catiões pela urina, na génese do atraso do crescimento associado a AMC, como proposto por Cooke e col [21] e por Bergstrom e col [49]. Parece pois evidente que a hipercalciúria seria secundária a acidose, e que a sua normalização dependeria do seu controlo.

As velocidades de crescimento que no início do tratamento estavam francamente diminuídas em todos os doentes, duplicavam e triplicavam, durante os seis primeiros meses de tratamento, nos doentes do Grupo I e durante o primeiro ano nos doentes do Grupo II.Esta diferença, explica o porquê da recuperação estatural se concretizar integralmente nos dois primeiros anos de tratamento no Grupo I, enquanto que no Grupo II, persiste até mais tarde.

Há uma ausência de informação sobre a evolução a longo prazo do crescimento, principalmente durante a puberdade, bem como da estatura definitiva atingida.

Na presente série para além do enorme período de seguimento obtido na grande maioria dos doentes, pode-se avaliar o crescimento pubertário e a estatura final em 12 deles. Todos os doentes correctamente tratados tiveram um crescimento pubertário normal, de (7 a 12 cm/ano) nos rapazes e (6 a 11 cm/ano) nas raparigas.Pelo contrário nos dois doentes com má adesão á terapêutica, com períodos de acidose prolongados, o pico de crescimento pubertário esteve ausente, e um crescimento de tipo pré-pubertário persistiu até a idade de 20 anos, o que lhes permitiu ainda recuperar algum do seu atraso estatural.

A estatura adulta atingida foi sobreponível à previsível tendo-se em consideração a estatura dos pais, à excepção dos 4 doentes com raquitismo inicial severo, que alcançaram uma baixa estatura final.

VI.2 - ESTUDO 2: Secreção da hormona de crescimento, na acidose metabólica crónica de causa renal

O perfil de secreção da HC, bem como as concentrações de IGF_1, parecem ter uma importância fundamental no controlo do crescimento. Uma secreção de HC pulsátil, com picos secretórios ao longo do dia, com níveis de secreção mais altos após o início do sono, foi descrito por vários autores [190-192].

Parker e col [192[sugeriram que o efeito regulador da HC no crescimento seria mediato através desses picos secretórios. Dada a HC ser de tipo pulsátil, uma determinação esporádica ao longo do dia, correlaciona-se mal com os níveis de IGF_1. Existe porém, uma correlação significativa entre as quantidades de HC segregadas ao longo do dia, com os níveis plasmáticos de IGF_1, [134], como a verificada no presente trabalho e com a velocidade de crescimento [193].

A análise dos perfis de secreção diária da HC deste estudo, bem como a sua concentração após provas de estimulação farmacológica, sugerem que AMC independentemente da exis-

tência duma IRC, origina uma interferência no eixo hipotálamo-hipofisário, afectando significativamente a secreção de HC, com diminuição da amplitude dos picos de secreção máxima, bem como das suas concentrações médias, sem alteração das concentrações basais da HC, nem do número de picos secretórios.

Os resultados deste estudo corroboram os dados preliminares, publicados por MC Sherry e col [112], que encontraram uma diminuição da secreção da HC, após provas de estimulação farmacológica com Arginina e L-dopa, em crianças com ATR_1, ATR tipo 4 não tratadas e crianças normais testemunhas cuja AMC foi criada com ingestão da NH_4 Cl.

Relativamente à avaliação da secreção espontânea da HC nas situações da AMC, não existe descrito na literatura nenhum outro trabalho efectuado no homem. Confirmando os nossos resultados, apareceu muito recentemente [202] um estudo de investigação *in vivo*, sobre os padrões de secreção da HC, em situações de AMC, verificando-se uma diminuição significativa da amplitude dos picos e da área de secreção da HC. Posteriormente os mesmos autores publicaram outro estudo [203], tendo como

principal objectivo responder à questão levantada pelo estudo anterior, ou seja, se existia para além duma desregulação da secreção espontânea da HC, uma alteração nos outros factores reguladores do crescimento. Neste sentido, utilizando o mesmo modelo experimental animal de AMC, avaliaram as concentrações plasmáticas de IGF_1 e IGF_2 e das suas proteínas de transporte, bem como determinaram o RNA mensageiro da IGF_1 e o RNA mensageiro do receptor da HC a nível hepático. Como principal conclusão deste interessante estudo, foi a inibição da expressão do RNA mensageiro da IGF_1 e do RNA mensageiro do receptor da HC a nível hepático, nos ratos com AMC. Contudo, essa inibição parecia estar de algum modo dependente do aporte nutricional, dado os ratos em restrição alimentar apresentarem resultados idênticos. Associadamente, a IGF_1 circulante encontrava- -se diminuída nos ratos acidóticos, o que está de acordo com os nossos resultados na criança.

O nosso estudo, bem como os de Challa e col [202-203], contrariam a existência duma possível resistência periférica à acção da HC, como foi sugerido pelo trabalho experimental *in vivo* de Gervais e Brazeau [54].

Parece-nos importante realçar da existência dum perfil normal da secreção da HC em todas as crianças com ATR_1 e IRC sob terapêutica alcalinizante, o que sugere uma regulação normal da secreção da HC. Nestas circunstâncias, a presença de picos secretórios bem definidos, de normal amplitude, retomando valores basais de HC entre cada pico, sugere uma degradação plasmática normal da HC nestas crianças. Inversamente, nos períodos com acidose, todos os doentes apresentavam alterações nos perfis de secreção diários da HC. Estas alterações eram essencialmente dependentes duma significativa redução da amplitude dos picos secretórios nocturnos, bem como duma diminuição da sua concentração média.

Associadamente a AMC origina uma diminuição significativa nos níveis plasmáticos de IGF_1. Todas estas alterações seriam rapidamente revertidas, após correcção da acidose com a terapêutica alcalinizante.

Este estudo, permite também realçar a ausência de interferência da urémia isoladamente, na secreção da HC e da IGF_1. Uma desregulação do eixo hipotálamo-hipofisário pela urémia, foi proposta por El Bishti e c ol [204] e por Ramirez e col [205]. Os

nossos resultados estão de acordo com os publicados recentemente por Hokken-Koelega e col [206], apesar de se tratarem, nesse estudo, de crianças com formas muito mais graves de insuficiência renal.

A existência duma correlação significativa entre a secreção da HC nas 24 horas e os níveis plasmáticos de IGF_1, com o pH plasmático e com a concentração de bicarbonato, faz sugerir uma interferência directa da acidose na secreção da HC, o que é apoiado pelo verificado no Estudo 1, onde uma correlação significativa à data do diagnóstico estava presente, entre o atraso estatural e o grau da acidose, bem como da normalização do referido atraso, após correcção da acidose com terapêutica alcalina.

VI.3 - ESTUDO 3: Influência da acidose metabólica crónica de causa renal no crescimento: efeito sobre o metabolismo fosfocálcico, ósseo e proteico

3.1 - EXPERIÊNCIA I: Influência da acidose no atraso do crescimento

Apesar de vários trabalhos descreverem uma importante interligação entre o atraso do crescimento e a AMC [23,41,67], nenhum procurou determinar o nível de acidose a partir do qual tal repercussão estaria presente, bem como só raramente foram analisados os mecanismos envolvidos.

O presente estudo refere-se à acidose associada a IRC, resultando duma limitação da eliminação urinária de iões H^+. Neste modelo pode-se fazer variar o grau de acidose de várias maneiras: 1)

modificando a carga ácida através de variações das concentrações protídicas da dieta (porém, as modificações das concentrações protídicas da dieta originam uma alteração no crescimento, mesmo na ausência de modificações no consumo alimentar); 2) modificando a quantidade de alcalinizante ($NaHCO_3$) na dieta, sendo contudo as quantidades necessárias difíceis de precisar; 3) modifi-cando a capacidade de excreção urinária de iões H^+, através da variação do grau de insuficiência renal. Uma acidose severa associada a uma IRC, poder-se-á obter através duma carga ácida relativamente moderada com uma dieta contendo 30% de proteínas em vez dos 20 a 24% habituais. Esta carga é significativamente inferior à utilizada noutros trabalhos, que apresentavam concentrações supra-fisiológicas de protídeos (46%) [51,194] ou de NH_4Cl [52]. Isto foi possível, pela utilização do modelo experimental da excisão renal, compatível com insuficiências renais mais severas do que as obtidas com o modelo geralmente empregue em todos os trabalhos (laqueação dos ramos da artéria renal). Estudando-se a filtração glomerular (pela determinação do clearence da inulina) correspondente a diferentes níveis de excisão parenquimatosa renal, observou-se que nefrectomias de 80 a 85% reduziam a função renal entre 10 a 15% dos valores normais (dados pessoais).

Nas condições do presente estudo, o grau da acidose dependia de dois factores: a função renal e a carga ácida ingerida (quantidade de protídeos). O consumo alimentar diminuía quando a IRC era mais severa, sendo porém contrabalançado pelo agravamento do defeito na eliminação renal. Assim a acidose mantinha-se bem correlacionada com a função renal. Em todos os grupos que recebiam bicarbonato, a acidose era perfeitamente corrigida. A comparação de ratos com ou sem acidose, mas com o mesmo grau de insuficiência renal e consumos alimentares idênticos, diferindo somente pela presença ou ausência duma AMC, permitia esclarecer da importância da acidose.

Uma observação inesperada é que na IRC a acidose por si só, mesmo quando severa não modificava o consumo alimentar, o qual permanecia idêntico nos ratos com ou sem acidose e com uma função renal idêntica. O mesmo não se verifica nos modelos experimentais de acidose secundária à utilização duma carga ácida excessiva, particularmente em animais com função renal normal [195-196], onde uma anorexia acompanha geralmente a acidose. Tal facto, sugere uma maior dependência da anorexia das substâncias utilizadas na sua indução (NH_4Cl, HCl...), do que da acidose por si só. As causas desta anorexia são porém desconhecidas. Problemas

do paladar da água quer com a utilização de NH_4Cl quer com o HCL, bem como as características físico-químicas da carga ácida utilizada, podem ser evocados. Poder-se-á também aceitar, que a anorexia associada a IRC presente nos ratos urémicos, não permitia diminuir ainda mais o consumo alimentar na presença de acidose, dada a existência dum limiar de sensibilidade.

Enquanto as diferenças do consumo alimentar são essencialmente dependentes da IRC, o ganho ponderal é influenciado pela severidade da IRC, mas também pela acidose, desde que suficientemente severa. Tendo em conta a duração do presente estudo, não parecia ser necessária uma completa correcção da acidose, para a obtenção dum crescimento normal, o qual se verificava na presença de concentrações plasmáticas de bicarbonato de 18 mmol/l, sugerindo que nas crianças com acidoses ligeiras, o crescimento é pouco afectado. Tal facto não está em contradição com os estudos que mostram um atraso do crescimento associado a acidose, visto tratarem-se na maior parte dos casos de acidoses severas [22,48,67,195].

Um outro facto importante é a existênciia de uma discordância entre o crescimento ponderal e o crescimento em comprimento. O ganho de peso era relativamente preservado

vado relativamente ao comprimento, nas acidoses com pH entre 7,20 e 7,25 ou com concentrações de bicarbonato plasmático de cerca de 15 mmol/l. Esta discordância entre o crescimento ponderal e em comprimento foi também assinalado por outros autores [197]. A importância duma retenção hídrica podia ser excluída, visto o aporte em sódio ter sido idêntico nos ratos com ou sem acidose. Também a análise do músculo gastrocnémico não mostrava uma retenção hídrica, dada a concentração protídica, bem como a relação gastrocnémico/peso corporal serem idênticas nos ratos com ou sem acidose. Estes resultados, sugerem sobretudo uma maior sensibilidade do tecido ósseo à acidose, do que a massa proteica, da qual depende a maior parte do peso corporal.

3.2 - EXPERIÊNCIA II: Influência da acidose no metabolismo fosfocálcico e ósseo

Existem muitos dados disponíveis na literatura relativamente às consequências da acidose sobre o metabolismo fosfocálcico e ósseo. A análise dos trabalhos publicados, sugere que uma carga ácida prolongada é tamponada essencialmente através da libertação de carbonato de cálcio ósseo, que constitui a maior reserva de tampões do organismo [1]. Porém, uma observação pormenorizada mostra contradições em inúmeros dados. Tais diferenças poder-se-iam explicar para além dos problemas metodológicos, pelas variações na severidade da acidose (os bicarbonatos plasmáticos variavam de 10 a 21 mmol/l), na sua duração (de horas a meses), nas variações do regime alimentar em cálcio e fósforo, bem como na ausência de consumos alimentares idênticos.

Pretendemos examinar as consequências da AMC a nível ósseo e do metabolismo fosfocálcico, em condições tais, que a acidose isoladamente, podia interferir. Optamos, na realização deste

trabalho, pela criação de acidoses ligeiras, que como se viu na experiência anterior não interferia com o crescimento. Neste estudo, um crescimento idêntico era necessário, dada a sua influência em alguns dos parâmetros a avaliar, nomeadamente no balanço mineral e principalmente na síntese de calcitriol e na formação óssea. No mesmo sentido, optou-se por um grau de nefrectomia que provocasse uma insufiência renal moderada, o que impedia, *a priori*, uma retenção de fósforo, bem como uma interferência na síntese de calcitriol [198].

Comparam-se ratos em AMC por IRC ou devida a uma carga ácida por NH_4Cl a ratos não acidóticos com e sem IRC. Todos tinham o mesmo consumo alimentar, sem variações no aporte diário em sódio e um crescimento idêntico.

As diferenças observadas devidas essencialmente a urémia eram uma diminuição de calciúria, um aumento da PTH plasmática e um aumento na reabsorção óssea nos ratos urémicos com ou sem acidose, quando comparados com os testemunhas. Estas alterações estão de acordo com os dados disponíveis na literatura. Nas condições deste estudo como se pretendia, não havia alterações significativas nas concentrações plasmáticas de fósforo e da 1,25 $(OH)_2$ D.

O efeito da acidose nos parâmetros avaliados foi o mesmo quer houvesse ou não IRC. Observamos enormes alterações no metabolismo do cálcio, e que estava de acordo com os dados da literatura. Se os vários autores encontraram uma elevação do cálcio ionizado plasmático nas situações de acidose [48,73,111], cuja magnitude era inversamente proporcional ao pH plasmático [168-169], já os dados publicados sobre o cálcio total eram contraditórios: assim foi referido como normal [48,73,170], elevado [52,111,195] ou diminuído [18,167,171]. Os nosso resultados estão de acordo com os apresentados pela maioria dos autores, ou seja, havia uma elevação do cálcio ionizado, sem modificação do cálcio total. Isto parece estar essencialmente dependente dum efeito directo da acidose na ligação do cálcio às proteínas. Efectivamente, os doseamentos plasmáticos de cálcio ionizado após normalização do pH, apresentavam valores normais.

Um aumento notável da calciúria devido à acidose foi descrita por quase todos os autores [18,48,53,96,167-171], sendo menos evidente na IRC [172]. Inúmeros estudos feitos em várias espécies animais mostraram que a hipercalciúria era dependente duma diminuição da reabsorção tubular de cálcio [96,173]. Esta

reabsorção tornava-se normal com a administração de bicarbonato de sódio, mas não após paratiroidectomia [86], o que demonstra uma independência da alteração tubular da PTH, sugerindo um efeito directo da acidose no túbulo renal [86,96,174]. Podemos eliminar pelos nossos resultados, um aumento da absorção intestinal de cálcio, como responsável pela hipercalciúria. O mais provável, é que esta esteja dependente duma libertação excessiva de cálcio ósseo. A hipercalcemia ionizada provocaria também um aumento da quantidade de cálcio filtrado a nível glomerular, que na presença duma diminuição da reabsorção tubular do cálcio, induziria uma hipercalciúria.

Os dados disponíveis sobre a absorção intestinal de cálcio nas situações de acidose são contraditórias, visto ter sido descrito como estando diminuída [53,172], aumentada [167,171,175] ou inalterada [195,174], originando um balanço do cálcio diminuído [53,167,172,174,195] ou inalterado [175]. A absorção intestinal de cálcio no nosso estudo, está claramente diminuída pela acidose, o que associadamente com a hipercalciúria, originava uma diminuição do balanço do cálcio. O balanço mantinha-se porém positivo, e

dadas as condições e duração do presente estudo, foi compatível com um crescimento ósseo normal. A diminuição do balanço do cálcio, era porém um factor agravante do defeito da mineralização óssea, fenómeno encontrado no nosso estudo, dado o teor ósseo em cálcio estar diminuído nos ratos acidóticos. Esta diminuição do teor ósseo em cálcio durante a acidose, é um fenómeno encontrado na literatura [22,176], à excepção dum estudo de insuficiência renal experimental com acidose moderada [52].

O nosso estudo fornece argumentos quanto à importância da vitamina D na diminuição da absorção intestinal de cálcio observada na acidose. Os dados disponíveis na literatura relativamente às consequências da AMC sobre o metabolismo da vitamina D são contraditórios e pouco concludentes. Alguns autores realçaram a frequência duma osteomalácia ou dum raquitismo no homem ou na criança nas situações de acidose crónica, bem como da sua cura com a terapêutica alcalina isoladamente [177,180]. Nos animais com carência em vitamina D (ratos [101,181], frangos [182]), foi demonstrado que após uma dose de carga de vitamina D, a acidose induzia uma inibição da 1,25 hidroxilase e uma diminuição da concentração de 1,25 $(OH)_2$ D no plasma e nos diferentes tecidos,

quer com uma dieta pobre ou normal em cálcio. É possível que o atraso do crescimento devido a acidose, ou as modificações do fósforo plasmático [182], estejam em parte dependentes do defeito da síntese da 1,25 $(OH)_2$ D. Pelo contrário, Cunningham e col [111], encontraram uma diminuição da 1,25 hidroxilase durante o primeiro dia de sobrecarga ácida, tornando-se normal ao 6º dia de acidose. Em animais não carenciados em vitamina D, com função renal normal ou urémicos, em acidose por ingestão de NH_4Cl, Gafter e col [195] e Chan e col [52], encontraram uma concentração plasmática normal de 1,25 $(OH)_2$ D. Por outro lado, um aumento de eficácia do transporte intestinal, após administração exógena de 1,25 $(OH)_2$ D foi demonstrado em ratos acidóticos [23]. Bushinsky e col, [169] também não encontraram uma diminuição significativa da 1,25 $(OH)_2$ D em animais acidóticos, com uma dieta normal em cálcio, verificando-se porém, uma supressão do aumento da 1,25 $(OH)_2$ D, com a utilização de dietas estimulantes da sua produção (pobres em cálcio), desde que a carga ácida fosse importante. Nestas condições, há efectivamente uma diminuição da 1,25 hidroxilase ao nível do túbulo renal, que é independente da PTH [183]. A resposta

da 1,25 hidroxilase a um deficite em fósforo, não foi pelo contrário, modificada pela presença de acidose, sendo esta porém, de menor intensidade do que a do estudo precedente [184]. Os estudos realizados no homem após uma carga prolongada em NH_4Cl, ou em acidose espontânea, não encontraram nenhuma diminuição das concentrações de 25 (OH) D e 1,25 $(OH)_2$ D, mesmo se uma osteomalácia estava presente [185]. Também no nosso estudo clínico de crianças com ATR_1, para além de alguns casos com carência em vitamina D, as concentrações plasmáticas de 1,25 $(OH)_2$ D eram próximas dos limites inferiores do normal.

Os nossos resultados são pois diferentes dos publicados na literatura, visto a AMC diminuir significativamente a concentração de 1,25 $(OH)_2$ D, apesar dum aporte vitamínico normal e na ausência duma retenção de fósforo. Este diminuição estava correlacionada com o cálcio ionizado por um lado e com a absorção intestinal do cálcio por outro. Note-se que Bushinsky e col [169] encontraram a mesma correlação, mas somente na presença dum regime pobre em cálcio. Assim, a nossa proposta é a de que a baixa do pH aumentava o cálcio ionizado, que tinha como efeito directo uma diminuição da absorção intestinal do cálcio, como tentativa de manter a homeostasia, mas agravando a redução do cálcio ósseo. Não pode-

mos excluir totalmente uma acção directa do pH, contudo, Bushinsky e col demonstraram que a diminuição da concentração plasmática de 1,25 $(OH)_2$ D estava directamente correlacionada com aumento do cálcio ionizado independentemente do pH ou PTH [186]. Os mesmo autores demonstraram que, na presença duma acidose as concentrações plasmáticas de 1,25 $(OH)_2$ D dependiam mais das concentrações do cálcio ionizado do que do pH [169], mesmo se estivesse correlacionada com os dois. Estes factos sugerem que a acidose pode favorecer o desenvolvimento dum raquitismo, ao aumentar as necessidades em vitamina D, o que não está em contradição com os dados clínicos.

Em contraste com a existência de importantes anomalias no metabolismo do cálcio, não encontramos qualquer alteração no metabolismo do fósforo. Assim a sua concentração era normal no plasma e na urina, e a sua absorção intestinal não era modificada pela acidose. Do mesmo modo a sua concentração óssea mantinha-se inalterada, enquanto que a do cálcio e do zinco [187] encontravam-se consideravelmente reduzidas, sugerindo a existência de profundas modificações da estrutura óssea mineral na acidose.

Os dados disponíveis na literatura sobre o metabolismo do fósforo na acidose, são menos numerosos do que sobre o metabolismo do cálcio. As variações são geralmente pouco importantes e inconstantes. Alguns autores incriminaram uma hipofosfatémia como responsável pelo raquitismo [179-180,183], outros uma hiperfosfatémia como causa dum hiperparatiroidismo [188-189]. Se excluirmos os síndromes tubulares proximais e a IRC, o fósforo plasmático não parece estar muito modificado. As modificações no fósforo urinário e do fósforo intestinal absorvido são também variáveis, mas para a maior parte dos autores o balanço do fósforo, à excepção de curtos períodos transitórios, encontra-se pouco modificado [18].

Se o conteúdo ósseo em cálcio na acidose foi encontrado diminuído por todos os autores, não existem dados disponíveis na literatura, sobre o teor ósseo em fósforo, à excepção dum estudo de autópsias de indivíduos mortos por insuficiência renal, com longos períodos de acidose, que mostrava teores de fósforo, sódio e potássio normais enquanto os do cálcio se encontravam diminuídos [207].

A excreção urinária de sulfatos não era influenciada pela acidose, contrariamente ao verificado por Chan [115] em crianças com ATR_1, onde um aumento da excreção urinária de sulfato estava presente.

A nível ósseo, os ratos com acidose apresentavam na morfometria, um aumento da reabsorção óssea e uma diminuição da formação óssea, com diminuição da espessura osteóide e uma idêntica espessura da cartilagem de crescimento.

Os métodos utilizados para avaliar a reabsorção óssea (contagem de osteoclastos e superfície de reabsorção óssea) mostravam a existência dum aumento da reabsorção óssea nos ratos em AMC, facto bem estabelecido na literatura. Os trabalhos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a AMC provocava uma dissolução do carbonato de cálcio, permitindo tamponar grandes quantidades de iões ácidos [1]. O modelo experimental *in vitro* de cultura de calotes craneanas, mostrou uma grande dependência entre o pH do meio de cultura e a saída de cálcio. Uma libertação do cálcio para o meio de cultura, parece estar presente para pH muito baixos, mesmo na presença de células ósseas mortas [19,208-210], implicando uma dissolução físico-química dos sais minerais, pelo menos nas situações de acidose aguda. A saída de cálcio é muito mais sensível e amplificada

na pesença de células ósseas vivas [81,210], realçando a importância da actividade celular neste fenómeno. Com efeito, a importância das células é prioritária nas acidoses crónicas. Isto é confirmado pelo efeito supressor de certas substâncias (acetazolamida, indometacina e calcitonia) [81,210]. A saída de cálcio *in vitro* parece ser paralela à libertação do hidroxiprolina, devido à destruição da matriz óssea [22,81]. Este facto, sugere um aumento de reabsorção óssea, facilmente detectável em histologia [81]. Nos estudos *in vivo* todos os autores encontraram um aumento da reabsorção óssea, e do número de osteoclastos, nas situações de função renal normal ou de IRC [22,52,170]. Alguns trabalhos utilizando osteoclastos "desagregados", ou seja, com perda do normal contacto entre os osteoclastos [82], mostraram que a acidose aumentava a actividade dos osteoclastos. Isto sugere um efeito directo da acidose nas células, efeito esse que era independente da PTH. Uma estimulação osteoclástica pela acidose, por intermédio dos osteoblastos era também possível, como mostram os estudos *in vitro*, do efeito dos factores estimulantes da actividade osteoblástica (PTH) ou pelo efeito inibidor da indometacina [210]. Parece pois, que AMC teria uma acção directa no osso, talvez em parte dependente dum efeito físico-químico de dissolução dos sais mine-

rais, mas sobretudo pela estimulação das células ósseas. Ignora-se da existência de mediadores ou de outros factores implicados neste processo.

Note-se que a acidose respiratória não provoca hipercalciúria nem libertação de cálcio do osso [1,211] e que na acidose metabólica aguda, o tamponamento só muito raramente depende da dissolução de carbonato de cálcio ósseo [1]. Com efeito, nas acidoses respiratórias agudas, o tamponamento faz-se essencialmente com a utilização de tampões plasmáticos, intersticiais e celulares. Estes últimos são sobretudo de origem muscular e óssea e actuam através da dissolução de sais de sódio.

Relativamente à formação óssea nas situações de acidose, há poucos dados disponíveis na literatura. Barzel e Jowsey [22], não encontraram qualquer modificação na formação óssea em ratos em acidose, após ingestão da NH_4Cl durante 10 meses, quer com a utilização de regimes alimentares normocálcicos ou hipocálcicos. A alcalose pelo contrário aumentava a formação óssea. Kraut e col [170] encontraram-na diminuída em ratos acidóticos com função renal conservada paratiroidectomizados. Chan e col [52], utilizando

ratos urémicos em acidose não encontraram qualquer modificação, tratando-se porém de acidoses modestas. Lembremo-nos que Krieger e col [212] verificaram com a utilização de modelos experimentais de acidose *in vitro* uma inibição da actividade osteoblástica. Uma ligação com o que se passa nas AMC *in vivo* mantinha-se por estabelecer, pelo que a diminuição da formação óssea verificada no nosso estudo, sugere uma acção idêntica.

Conjuntamente com os resultados histológicos do nosso estudo, a acidose acompanhava-se de uma diminuição da concentração plasmática de fosfatase alcalina e de um aumento da excreção urinária de hidroxiprolina e cálcio. Assim, pela análise dos dados histológicos e bioquímicos pode afirmar-se que AMC se acompanha de uma diminuição da formação óssea e dum aumento da sua reabsorção, contribuindo para o desenvolvimento de uma osteopenia.

No estudo experimental, a espessura da cartilagem de crescimento não é influenciada pela acidose e a espessura do tecido osteóide estava diminuída, e não aumentada como seria de prever

pela diminuição do calcitriol plasmático e das lesões de raquitismo e osteomalácia descritos nas observações clínicas. Com efeito, nenhum dos trabalhos experimentais sobre as consequências ósseas da AMC, detectou qualquer aumento do tecido osteóide ou da cartilagem de crescimento nos ratos acidóticos [52,86]. No estudo clínico, o raquitismos observado nas crianças com ATR, parecia estar essencialmente dependente duma carência em vitamina D. Até que ponto poderia ser favorecido por um ligeiro deficite em 1,25 $(OH)_2D$ está por determinar, sendo porém possível que a acidose aumente significativamente as necessidades em vitamina D.

Relativamente aos dados hormonais, nas condições do nosso estudo, encontramos uma PTH mais elevada nos ratos urémicos do que nos não urémicos, não sendo, porém modificada pela presença da acidose. A manutenção de concentrações plasmáticas de PTH relativamente elevada, apesar dum aumento do cálcio ionizado, sugere uma modificação da regulação da sua secreção pelas paratiroides. A responsabilização da PTH na reabsorção óssea da acidose e a sua alteração devida a modificações do metabolismo fosfocálcico, mantém-se actualmente como tema de

discussão. No estudos *in vitro*, a presença de PTH aumentava a reabsorção óssea, não sendo porém necessária para que esta tenha lugar [81,210]. Num outro estudo, a perfusão de osso isolado com PTH, mostrou um aumento da sua extracção pelo osso nas situações de acidose, bem como um aumento da formação de AMP cíclico [213]. Outros autores mostraram a importância da secreção de PTH na capacidade de tamponamento dos iões ácidos [213-214], facto negado por outros [215]. Todas estas experiências, foram porém efectuadas com a utilização de modelos experimentais de acidose aguda, bem diferentes dos da acidose crónica. Nas acidoses crónicas tanto no homem como no animal, a maioria dos autores não encontraram modificações da PTH devido a acidose [48,52,169-171,174], e a mobilização cálcica por reabsorção óssea estava presente mesmo na ausência de paratiroides [86,96].

As concentrações plasmáticas de IGF_1, determinadas após extracção, de modo a permitir separá-las das suas proteínas de transporte, foram encontradas diminuídas nos grupos com AMC com ou sem insuficiência renal, apesar dum igual crescimento e consumo alimentar. Seria difícil de se saber se isto traduziria uma diminuição da sua síntese hepática, eventualmente dependente da acção da AMC sobre a síntese de HC ou se a sua concentração plasmática reflecte

também, a produção local de IGF_1, principalmente a nível ósseo. No estudo clínico, a análise dos perfis de secreção diária da HC, bem como a sua concentração após provas de estimulação farmacológica, mostra que a AMC, independentemente da existência duma IRC, diminui significativamente a secreção da HC bem como a concentração plasmática de IGF_1. Associadamente a existência duma correlação significativa entre a secreção de HC nas 24 horas e os níveis plasmáticos de IGF_1 com o pH plasmático e as concentrações plasmáticas de bicarbonato, sugere uma acção directa da acidose na secreção diária de HC, originando uma diminuição da síntese hepática da IGF_1. Quanto à possibilidade das concentrações plasmáticas de IGF_1, poderem também reflectir a sua produção local, nomeadamente a nível ósseo, não pode é respondido pelo presente estudo. Na nossa opinião, a AMC é capaz de interferir directamente com a síntese local de IGF_1 e com a sua expressão genética como factor de crescimento, o que parece ser corroborado pelo recente estudo *in vivo* de Challa e col [203], onde esse efeito foi observado a nível hepático, hipótese que nos propusemos estudar num futuro próximo, dando continuidade a este projecto de investigação. A diminuição da IGF_1 pode estar asssciada à diminuição da formação óssea, observada neste estudo.

Sabe-se que a IGF_1 tem um efeito estimulante sobre os osteoblastos. Uma ligação entre a concentração plasmática de IGF_1 e a formação óssea foi observada em doentes com hiperparatiroidismo e insuficiência renal severa [216]. A perfusão local de IGF_1 estimulava a formação óssea a nível cortical em ratos com 5 ou 6 meses de idade, mas não em ratos mais jovens, como os que foram utilizados no nosso estudo [217]. Trata- -se porém, de resultados preliminares, necessitando de confirmação. Os nossos resultados sugerem contudo, a intervenção de factores de crescimento nos fenómenos observados na AMC. Esta hipótese nunca tinha sido observada até ao presente momento.

3.3 - EXPERIÊNCIA III: Influência da acidose no metabolismo proteico

Vários autores descreveram na insuficiência renal uma diminuição da massa magra [218-220], e uma alteração no metabolismo proteico [221-222]. Utilizando modelos experimentais de incubação *in vitro* de músculo de ratos, Garber [223] mostrou um aumento da libertação de alanina e da glutamina na urémia, que atribui a um aumento da proteólise. Com o mesmo modelo experimental, mas estudando a libertação da tirosina e da fenilalanina (dois ácidos aminados que não são utilizados nem metabolizados no músculo) Harter e col [224] observaram também a existência de uma degradação proteica muscular mais elevada nos ratos urémicos. Holliday e col [225], medindo a incorporação *in vivo* da ^{14}C-leucina nas proteínas musculares, após jejum de 18 a 24 horas, verificaram uma diminuição da síntese e um aumento da produção de azoto ureico nos ratos urémicos, quando comparado ao verificado nos ratos não urémicos. Estes mesmos fenómenos não se observaram após alimentação dos animais. O hipercatabolismo do jejum foi confirmado por Li e col [226] que, medindo a velocidade de escre-

ção da 3 metilhistina, tomada como indicador do catabolismo muscular, verificaram que após 48 horas de jejum, esta excreção aumentava mais nos ratos urémicos do que nos testemunhas. Os mesmos autores, trabalhando no modelo do hemicorpo, observaram que nas situações de jejum (24 a 48 horas), a síntese proteica era mais baixa e a degradação mais elevada nos ratos urémicos do que nos não urémicos. Após alimentação dos animais, não se observaram porém, diferenças na síntese nem na degradação proteica [227]. Ireland e col [197], encontraram também, uma síntese proteica muscular mais baixa nos ratos urémicos do que nos testemunhas, apesar de consumos alimentares idênticos. Neste estudo, não foram contudo especificadas as condições da determinação, nomeadamente o estado de jejum dos animais. A hipersensibilidade ao jejum observada na insuficiência renal, foi atribuída à diminuição das reservas energéticas na urémia [227]. Com efeito, uma diminuição da massa gorda foi descrita na insuficiência renal [228-229].

Na maior parte destes estudos o equilíbrio ácido-básico não era quantificado. Contudo, alguns autores utilizaram regimes alimentares ricos em proteínas [225,227], os quais são capazes de, na presença duma insuficiência renal severa, induzir uma acidose.

Assim, um dos principais factores que poderia explicar o hipercatabolismo presente na IRC seria a AMC. Trabalhos antigos e recentes mostraram que a correcção da acidose diminuía a concentração plasmática de ureia [230-231] e melhorava o balanço azotado [232] de doentes em insuficiência renal. Os mesmos resultados foram também verificados na ausência duma IRC. Assim, o simples facto de se corrigir a acidose associada ao jejum prolongado com bicarbonato, melhorava o balanço azotado [233], o que sugere tratar-se dum mecanismo não específico da IRC.

Tizianello [234] mostrou um aumento da libertação de glutamina a nível do antebraço em doentes em IRC com acidose ($pH \leq 7,333$) e em voluntários com função renal conservada, colocados em acidose através da sugestão de NH_4Cl ($pH \leq 7,291$).

Estes diferentes dados baseiam-se numa análise global, que não incide sobre os mecanismos em causa. Porém, as modificações da massa proteica corporal resultam dum balanço entre a actividade de síntese e de degradação permanente das proteínas

tecidulares. Assim, um balanço negativo podia ser devido a uma diminuição da síntese e/ou a um aumento da degradação proteica. O estudo destes aspectos dinâmicos do metabolismo proteico tornou-se possível com a utilização de marcadores radioactivos.

Na terceira experiência do Estudo 3, avaliou-se o efeito da acidose severa no metabolismo proteico e nível muscular na presença e na ausência duma IRC no rato. O músculo esquelético foi o escolhido para as determinações da síntese e da degradação proteica, visto nos mamíferos o conjunto dos músculos estriados representa a principal reserva proteica do organismo [235]. Mesmo se a velocidade de renovação proteica é relativamente baixa, quando comparada à verificada ao nível dos outros tecidos, como por exemplo o fígado [236], o músculo representa pela sua massa, a actividade mais importante do metabolismo proteico. Assim, pequenas modificações de uma ou de outra das componentes responsáveis pela renovação proteica, podem originar numa perda da massa magra corporal ou num atraso do crescimento.

O gastrocnémico foi escolhido, dado ser um músculo bem definido em estrutura e em massa, para além de ter um acesso relativamente fácil. No músculo a actividade de síntese proteica é influenciada pela idade [237], tornando-se necessário efectuar estas determinações em animais com a mesma idade.

A maior parte dos estudos sobre a importância da urémia ou acidose no metabolismo proteico, utilizaram modelos experimentais *in vitro*, que não têm em consideração os factores de regulação fisiológicos. Estas condições podem tornar mais difícil a extrapolação dos resultados para o organismo inteiro. No nosso estudo as determinações da síntese e da degradação proteica foram realizadas *in vivo*. A velocidade de síntese proteica foi determinada através da técnica da injecção intravenosa duma dose de carga de fenilalanina marcada, descrita por Garlick [145]. Esta técnica permite determinações rápidas (entre 10 a 15 minutos após a injecção do marcador), evitando assim ter-se em consideração a reciclagem do marcador, que podia ser incorporado e em seguida libertado pelas proteínas com semi-vida muito curta. A rapidez deste método permite também o estudo de fenómenos agudos e da não utilização da anestesia. A escolha da utilização de fenilalanina como ácido aminado para o estudo da renovação proteica muscular é explicada de acordo

com três razões: 1) a fenilalanina não é nem sintetiza nem catabolisada a nível muscular, logo na determinação da sua actividade específica é só necessário uma quantificação da radioactividade e da concentração deste ácido aminado; 2) a elevada concentração de fenilalanina não altera a velocidade de síntese proteica [238]; 3) a fenilalanina pode ser doseada especificamente através duma técnica de fluorimetria simples e sensível.

Dado ter sido demonstrado, que as variações da síntese proteica estavam associadas com as variações do RNA [239], associamos à determinação da síntese proteica a determinação das proteínas e do RNA total, sabendo-se que 80% deste RNA representa o RNA ribossómico. Assim, podíamos determinar, se uma variação da síntese estava associada ou não a uma variação do teor do RNA, indicando quer uma variação da capacidade de síntese (síntese e RNA variavam proporcionalmente), quer uma variação da actividade de síntese (sem alteração no RNA).

Nos estudos *in vivo* não existe um método directo que possibilite quantificar a degradação proteica muscular. A excreção de 3-metilhistidina, frequentemente utilizada na determinação da degradação proteica muscular [240], tem sido amplamente criticada [241]. A velocidade da sua eliminação urinária é nitidamente afectada

pela insuficiência renal [226]. No nosso estudo quantificamos a degradação proteica através da utilização dum método indirecto. Com efeito, dado o crescimento da massa proteica muscular resultar do equilíbrio entre a actividade de síntese e de degradação, a determinação da síntese e do crescimento permite calcular a degradação (síntese - crescimento = degradação). O crescimento da massa proteica foi estimado a partir de grupos de animais mortos em dois tempos diferentes. Isto por si só poderá interferir na precisão deste método, sobretudo na presença de situações instáveis. Note-se também que a determinação do crescimento da massa proteica muscular corresponde a um período de 2 dias, enquanto a da síntese baseia-se num período de 15 minutos. Assim, no cálculo da degradação admite-se que a determinação pontual da síntese proteica reflecte a síntese de um período de 24 horas. Isto foi confirmado por Reeds e col [242] em ratos normalmente alimentados.

O metabolismo proteico é influenciado pelo consumo alimentar [237,243]. Neste sentido, torna-se indispensável na interpretação do efeito da acidose na síntese e degradação proteica, a existência de consumos alimentares idênticos entre os vários grupos de animais comparados. De igual modo, ao verificado no estu-

do precedente, não se encontraram diferenças relativamente ao consumo alimentar dos ratos urémicos acidóticos e não acidóticos. Todavia, nos ratos com função renal conservada, eram necessárias ingestões alimentares idênticas, sistema de ("pairfeeding"), dada a anorexia observada nos ratos que recebiam NH_4Cl. A importância da ingestão alimentar no metabolismo proteico foi recentemente realçada na urémia (dados pessoais não publicados). Efectivamente os resultados por nós obtidos num estudo preliminar de preparação da presente experiência, mostraram que em ratos com função renal normal, o consumo alimentar era mais elevado do que nos ratos urémicos, e tinham uma síntese proteica muscular proporcionalmente superior. Esta diferença desaparecia quando as ingestões alimentares se tornavam idênticas ("pairfeeding").

Por outro lado, as velocidades de síntese e de degradação proteica muscular são influenciadas pela duração do jejum [225,227,244-245]. Recorde-se também, que o ritmo alimentar (frequência das refeições) influencia a utilização metabólica das ingestões e consequentemente, os fluxos energéticos dentro do organismo [246]. Dada a importância destes factores, o protocolo da investigação do presente estudo (Experiência 3) previa um mesmo tempo de jejum dos animais dos diferentes grupos na altura do sacri-

fício. Associadamente, como os ratos em "pairfeeding" logo com restrições alimentares podiam ingerir toda a sua ração diária duma só vez, foi-lhes imposto um ritmo alimentar próximo do verificado nos ratos sem restrições, ou seja, de 8 refeições com uma refeição cada 2 horas. Assim, no momento do sacrifício todos os animais tinham tempos de jejum e ritmos alimentares comparáveis.

Apesar dum consumo alimentar idêntico, os ratos acidóticos apresentavam-se com pesos e comprimentos inferiores aos verificados nos ratos não acidóticos. Este atraso do crescimento permitia admitir da existência de alterações no metabolismo proteico. Verificou-se que os dois tipos de acidose (associada ou não com IRC) não originavam qualquer alteração na síntese proteica muscular. A ausência de diferenças na síntese proteica estava, como previsto, associada a uma ausência de diferenças nas concentrações de RNA muscular entre os ratos acidóticos e não acidóticos. Porém, os ratos acidóticos apresentavam uma diminuição do crescimento proteico muscular, o que podia ser explicado pelo aumento da sua degradação proteica. Este facto, por si só, era um importante argumento na justificação do atraso do crescimento observado nas acidoses severas.

Os resultados deste estudo mostraram também que a síntese proteica muscular nos ratos testemunhas, diferia pouco da verificada nos ratos urémicos. Ela era mesmo ligeiramente superior nos ratos urémicos, provavelmente associada a um consumo alimentar um pouco superior.

Os nossos resultados sobre a acidose estão de acordo com os obtidos por outros grupos de investigação com a utilização de modelos experimentais *in vitro*. May e col, utilizando quer o músculo isolado perfundido quer o músculo incubado, não encontraram nenhuma modificação na síntese, mas sim um aumento da degradação proteica nos animais com acidose quando comparados aos animais sem acidose, na presença [194] ou na ausência [247] duma insuficiência renal. England e col [248] utilizando culturas de células musculares, descreveram uma aceleração da degradação proteica, determinada através da libertação de finelalanina marcada, quando o pH do meio de cultura baixava de 7,4 a 7,1. Outros estudos *in vitro* utilizando músculos incubados, mostravam que a acidose secundária a uma IRC [51], ou a uma carga ácida [249], provocava um hipercatabolismo muscular dos amino-ácidos remificados, devido a um aumento da actividade enzimática destes amino-ácidos [51,249].

De acordo com estes resultados *in vitro*, os estudos *in vivo* evidenciavam também um hipercatabolismo na acidose. Assim, May e col [250], utilizando uma perfusão de leucina marcada em ratos acidóticos, encontraram uma aceleração do renovamento proteico com aumento da degradação proteica e aceleração da oxidação dos ácidos aminados ramificados. No estudo anterior foi também observado um aumento da síntese proteica global. Este facto parecia estar dependente da participação de outros tecidos para além do músculo, a avaliar pelos resultados do nosso estudo, onde a síntese proteica muscular foi determinada *in vivo*, bem como dos outros estudos experimentais *in vitro* publicados na literatura [194,247], onde a síntese proteica muscular não era modificada pela acidose. Outros estudos mostraram um aumento da eliminação da 3-metilhistidina, índice do catabolismo muscular, em ratos acidóticos com função renal normal [251]., bem como no homem em IRC após suspensão da terapêutica alcalina [252].

Os mecanismos deste hipercatabolismo, devido a acidose, não estão completamente elucidados. A importância dos glucocorticóides neste fenómeno foi exaustivamente investigado pela equipa de Mitch. Estes, parecem ser indispensáveis na génese

deste efeito da acidose. O hipercatabolismo devido a acidose desaparecia após adrenelectomia [247] e não estava presente nas linhas celulares que não possuíam receptores para os glucorticóides [253]. Juskovitz e col [253], mostraram que o hipercatabolismo reaparecia nessas linhas celulares, após transferência do gene que codifica o receptor.

Isto não exclui a importância neste fenómeno de outros factores, nomeadamente a PTH, a 1,25 $(OH)_2D$ e IGF_1 que, como se sabe, estão geralmente alterados na IRC. Já as suas variações nas situações de acidose não são claras. O efeito da PTH na degradação proteica muscular foi sugerido por Garber [254] que mostrou um aumento da libertação da alanina e glutamina pela PTH, em músculo incubado de ratos com função renal normal. Contudo, vários trabalhos mostraram que as alterações na libertação da alanina e glutamina pelo músculo esquelético podiam ocorrer independentemente da existência de alterações na velocidade do catabolismo proteico muscular [255-257]. Wassner e col [258], trabalhando no modelo experimental do hemicorpo perfundido, não encontraram qualquer influência da PTH na síntese e na degradação proteica muscular. Na nossa experiência precedente (Experiência 2), não se encontraram modificações nas concentrações plasmáticas de

PTH entre os grupos acidóticos e não acidóticos. Porém, a presente experiência (Experiência 3), foi realizada na presença duma acidose mais severa, mas na maior parte dos trabalhos publicados sobre a AMC, não há referência a aumentos significativos da PTH. É pois muito pouco provável que esta hormona possa ter influência neste fenómeno.

Foi demonstrado em ratos com função renal conservada, que um deficite em vitamina D podia estimular a degradação proteica muscular, desde que uma hipocalcemia estivesse presente [259]. A calcemia permaneceu normal no nosso estudo (Experiência 2) e era pouco provável que a pequena diminuição da 1,25 $(OH)_2D$ fosse responsável pelo hipercatabolismos observado.

Finalmente, será de recordar que as concentrações plasmáticas da IGF_1 nesta mesma experiência se encontram diminuídas nos grupos acidóticos. Uma influência na degradação proteica muscular não pode ser excluída. Efectivamente, Jacob e col [260] descreveram em ratos com função renal normal e em jejum superior a 24 horas uma redução da proteólise após perfusão de IGF_1. Também Martin e col [261] referiram uma diminuição do catabolismo proteico muscular expresso pela excreção urinária de 3-

-metilhistidina, após tratamento crónico com IGF_1 em ratos com insufiência renal moderada.

VII - CONCLUSÕES

VII - CONCLUSÕES

CONCLUSÕES GENÉRICAS

Apesar dum sólido suporte científico quanto à existência dum atraso do crescimento nas crianças com ATR em AMC, bem como da sua possível recuperação com a terapêutica alcalinizante, não há qualquer informação quanto à evolução futura do crescimento, nomeadamente quanto à estatura final destes doentes.

Quanto à possibilidade do mesmo fenómeno poder estar presente na AMC que acompanha a IRC, os dados disponíveis na literatura são muito escassos e controversos.

Não obstante a existência de vários mecanismos fisiopatológicos propostos como responsáveis pelo atraso do crescimento destas crianças, a sua aceitação deverá ser fortemente questionada dado que, na maior parte dos casos, os dados disponíveis são insuficientes e inconsequentes. Mantém-se pois, actualmente por precisar com rigor, o mecanismo ou mecanismos implicados na génese deste atraso do crescimento.

Neste sentido, e tendo como objectivos os referidos no início deste trabalho, pensamos que o presente estudo contribui para a sua identificação.

CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

Da investigação que realizamos podemos concluir:

Relativamente ao Estudo nº 1. Crescimento, desenvolvimento pubertário e estatura final na acidose tubular renal distal.

1.1 - Na população estudada, o diagnóstico e tratamento precoces, permitiu a todas as crianças normalizar o crescimento.

1.2 - No início do tratamento, existe uma correlação entre a estatura e as concentrações plasmáticas do bicarbonato e do potássio.

1.3 - As concentrações de bicarbonato, são o principal factor com influência na estatura à data do diagnóstico.

1.4 - Nas crianças com menos de 2 anos de idade, há uma correlação entre a estatura no início do tratamento e a duração prévia da acidose.

1.5 - Todas as crianças cuja acidose foi correcta e ininterruptamente corrigida, tiveram um crescimento, desenvolvimento pubertário e estatura adulta normal.

1.6 - Uma manutenção terapêutica, é indispensável até se atingir a estatura definitiva.

Relativamente ao Estudo nº 2. Secreção da Hormona de Crescimento na acidose metabólica crónica de causa renal.

2.1 - A análise dos perfis de secreção diária da HC mostra que a AMC origina uma redução da amplitude dos picos secretórios, e da concentração média de HC, através de uma interferência no eixo hipotálamo-hipofisário.

2.2 - O pH plasmático e a concentração de bicarbonato, são factores limitantes da secreção de HC e IGF_1.

2.3 - A presença de uma correlação entre a secreção de HC nas 24 horas e dos níveis plasmáticos de IGF_1 com o pH plasmático e a concentração de bicarbonato, indica a existência duma acção directa da acidose na secreção da HC.

2.4 - A diminuição da secreção de HC, bem como das concentrações plasmáticas de IGF_1, são o principal mecanismo responsável pelo atraso de crescimento observado nas crianças com AMC de causa renal.

Relativamente ao Estudo nº 3. Influência da acidose metabólica crónica de causa renal no crescimento: efeito sobre o metabolismo fosfocálcico, ósseo e proteico

Experiência I. Influência da acidose no atraso do crescimento

3.1.1 - Existe um limiar de sensibilidade a partir do qual a acidose altera o crescimento.

3.1.2 - Na presença de acidoses mínimas, não há qualquer repercussão sobre o crescimento.

3.1.3 - O crescimento em comprimento é mais precocemente influenciado pela acidose, do que o crescimento ponderal.

3.1.4 - Esta dissociação entre os crescimentos ponderal e em comprimento, mostra uma maior sensibilidade do tecido ósseo à acidose, do que a massa proteica da qual depende a maior parte do peso corporal.

Experiência II. Influência da acidose no metabolismo fosfocálcico e ósseo

3.2.1 - A AMC aumenta o cálcio ionizado, que deprime o calcitriol plasmático, provocando uma diminuição da absorção intestinal de cálcio, dificultando desta maneira a calcificação óssea.

3.2.2 - As alterações ósseas estão dependentes quer dum aumento da reabsorção óssea, quer duma diminuição da formação óssea, na ausência dum aumento do tecido osteóide.

Experiência III. Influência da acidose no metabolismo proteico

3.3.1 - A AMC, mesmo quando severa, não afecta a síntese proteica.

3.3.2 - A AMC origina uma aceleração da degradação proteica.

CONCLUSÃO GLOBAL

A análise global das conclusões dos 3 estudos, permite-nos afirmar:

— A AMC com ou sem IRC, acompanha-se de um importante atraso do crescimento.

— O crescimento estatural é mais sensível à acidose que o crescimento ponderal.

— Existe um limiar de sensibildiade, a partir do qual a acidose altera o crescimento.

— Na presença de acidoses mínimas, não há qualquer repercussão sobre o crescimento.

— Após correcção da acidose, observa-se uma rápida recuperação do atraso estatural.

— A acidose deve ser continuamente corrigida, para a manutenção dum crescimento normal.

Quanto aos mecanismos fisiopatológicos implicados neste atraso do crescimento pode-se concluir como sendo fundamentalmente os seguintes:

- Uma alteração da regulação endócrina do crescimento, através duma interferência no eixo hipotálamo-hipofisário, com diminuição da secreção da HC.

- Uma alteração do metabolismo fosfocálcico, com uma diminuição do balanço do cálcio.

- Uma alteração do metabolismo ósseo, com descalcificação óssea e diminuição da massa óssea por aumento da reabsorção óssea e diminuição da sua formação.

- Uma alteração do metabolismo proteico, com aumento da degradação proteica.

Este conjunto de alterações seriam conjuntamente responsáveis pelo atraso do crescimento presente na AMC de causa renal.

VIII - SUGESTÕES

VIII - SUGESTÕES

Pensamos que, com o presente trabalho de investigação, se conseguiu um avanço no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no atraso de crescimento associado a AMC de origem renal. Contudo, admitimos que esta questão não se encontra esgotada, sendo necessário mantermos esta linha de investigação. Neste sentido, e de acordo com os resultados anteriores, propomo-nos a continuar com este projecto, privilegiando os dois seguintes estudos:

I - Estudo da utilização da hormona de crescimento na IRC experimental e na AMC de origem renal

Sabe-se que a HC permite uma recuperação do atraso estatural, habitualmente observado na IRC [262], apesar da presença de concentrações plasmáticas normais da HC [263]. Ignora-se, ainda actualmente, se a aceleração da velocidade de crescimento permanece ou não ao longo do tempo, e quais as consequências sob a estatura definitiva. Este tratamento utiliza doses supra-fisiológicas de

HC. Os efeitos secundários, principalmente a longo termo, estão ainda insuficientemente descritos, e os seus mecanismos de acção pouco claros. Ignora-se, principalmente qual o seu efeito sobre o metabolismo proteico e ósseo, parâmetros essenciais, conjuntamente com a proliferação dos condrócitos, no crescimento.

1.a - Efeito sobre o metabolismo

Melhorias no balanço azotado após utilização da HC foram descritos em situações de enorme catabolismo [264-265]. Em animais tratados com HC, uma melhoria na eficácia alimentar foi descrita [104,266]. Uma alteração do crescimento, sem aumento do consumo alimentar, principalmente de proteínas, seria particularmente interessante na IRC, dada a aceleração da deterioração da função renal com ingestões proteicas aumentadas.

1.b - Efeito sobre a renovação óssea

A proliferação dos condrócitos sob a acção da HC deve acompanhar-se duma formação óssea adequada, dependente duma adaptação dos diferentes elementos do metabolismo cálcico e da acti-

vidade das células ósseas. Na sua ausência, poder-se-ia assistir a um defeito progressivo da mineralização óssea.

1.c - Efeitos endócrinos

A acção sob o metabolismo proteico e sobre a formação óssea, exige uma adaptação endócrina. Algumas modificações hormonais, uma vez iniciado o tratamento com HC, seriam estudadas, como as concentração plasmáticas de PTH, de 25 e 1,25 $(OH)_2D$, IGF1 e insulina.

1.1 - Finalidade do estudo

A finalidade deste estudo seria de ver o efeito da HC no modelo da AMC associada ou não a IRC, sobre a síntese proteica e sobre o metabolismo fosfocálcico. Trata-se efectivamente de dois importantes parâmetros, com influência sobre o crescimento.

Não temos conhecimento que tenha sido realizado qualquer estudo cinético sobre o metabolismo proteico na IRC clínica ou experimental,sob tratamento com HC. Um tal trabalho permitiria explicar

o efeito benéfico deste tratamento e de melhor compreender os mecanismos implicados.

Estudar o efeito da HC sobre o metabolismo fosfocálcico e ósseo na AMC associada ou não a IRC, mantém-se um projecto original. Dado o efeito da acidose sobre o osso como foi observado no nosso trabalho de investigação, persistir ao longo de todo o período de estudo, seria importante determinar se a HC contrabalançaria ou não, os efeitos da acidose sobre a formação e reabsorção óssea, ou se agia a outro nível, com risco de persistência ou mesmo de agravamento das alterações ósseas.

II - Estudo da expressão genética da IGF_1 a nível ósseo

Estudos recentes mostraram a importância da acção da IGF_1 de origem tecidular, como factor autocrínico ou parocrínico do crescimento ósseo [250]. Assim, em ratos hipofisectomizados, após adminsitração de HC, há uma subida coordenada de IGF_1 plasmática, do RNA mensageiro de IGF_1 tecidular [105] e da imunorreactividade tecidular da IGF_1 [250].

Dado grande parte da IGF_1 a circular no plasma se encontrar ligada a proteínas de transporte, que por sua vez estão dependentes dum complexo controlo hormonal, o qual poderá ser afectado pela AMC, torna importante verificar se as concentrações plasmáticas da IGF_1, reflectem ou não as suas concentrações tecidulares.

II.1 - Finalidade do estudo

A finalidade do estudo teria como principal objectivo verificar se a alteração do crescimento associado a AMC, com ou sem IRC, se acompanha também duma diminuição da síntese tecidular de IGF_1, tornando-se num dos mecanismos responsáveis pelo atraso do crescimento.

Neste sentido seria avaliada a expressão genética da IGF_1 a nível ósseo, através da determinação do seu RNA mensageiro.

IX - RESUMO

IX- RESUMO

A AMC acompanha-se geralmente de um importante atraso do crescimento. Uma relação causal tem sido, quer documentada quer sugerida, em diversos estudos experimentais e clínicos com ou sem IRC.

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo atraso do crescimento associado a AMC continuam por elucidar, apesar deste assunto ter motivado várias investigações.

Neste trabalho procuramos investigar a existência de um atraso de crescimento e da sua correlação com AMC de origem renal, bem como identificar o mecanismo ou os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas alterações do crescimento.

De acordo com os objectivos formulados, foram projectados e executados 3 estudos diferentes, sendo dois clínicos realizados no Serviço de Nefrologia Pediátrica do Hospital Necker Enfants-Malades e um experimental, realizado na Unidade de Fisiopatologia e Genética das Nefropatias da Criança, INSERM-U-192, Paris, França, entre Janeiro de 1990 e Dezembro de 1991.

- **Crescimento, desenvolvimento pubertário e estatura final na acidose tubular renal distal. Estudo nº 1**

Foram estudadas 28 crianças com o diagnóstico de ATR_1, com pelo menos dois anos de evolução da doença e uma função renal normal no início do tratamento. Foram divididas em dois grupos, de acordo com a idade à data do diagnóstico. O Grupo I era constituído por 16 crianças com idades compreendidas entre 2 semanas e 2 anos, e o Grupo II por 12 crianças, com idades compreendidas entre 3 e 11 anos.

A acidose foi corrigida com a introdução de bicarbonato de sódio. A estatura média inicial era de -2,30±0,30 SDS no Grupo I e -3,9±0,7 SDS no Grupo II. No início do tratamento e considerando todos os doentes, a estatura expressa em SDS, apresentava uma correlação significativa com a concentração plasmática de bicarbonato ($r=0,74$; $p<0,0001$), de potássio ($r=0,53$; $p<0,01$) e com a velocidade de crescimento ($r=0,54$; $p<0,01$). Uma correlação inversamente significativa estava também presente, entre a estatura inicial e a idade à data do diagnóstico no Grupo I ($r= -0,57$; $p<0,01$) mas não no Grupo II ($r=0,35$; n.s.). A média da velocidade de crescimento no Grupo I (-2,37±0,40 SDS) não era estatisticamente diferente do do Grupo II (-1,54±0,23 SDS). O tempo médio de seguimento foi de 13,2±0,36 no Grupo I e 7,1±0,3 anos no Grupo II. Após início do tratamento e até à última observação, a média do ganho estatural foi de +1,09±0,23 SDS no Grupo I e de +1,93±0,50 SDS no Grupo II. A média da velocidade de crescimento foi de +0,70±0,09 SDS no primeiro ano de tratamento no Grupo I e de +2,80±2,28 SDS no Grupo II. Esta média desceu ligeiramente durante o segundo ano de tratamento para +0,25±0,03 SDS no Grupo I e para +1,04±0,60 SDS no Grupo II. No Grupo I a média estatural na última observa-

ção era de -1,1±0,3 SDS, correspondendo um ganho estatural significativo ($p<0,001$), relativamente à média estatural inicial. No Grupo II, a média estatural na última observação era de -2±0,6 SDS, correspondendo um ganho estatural significativo ($p<0,001$), relativamente à média estatural inicial. Das 12 crianças que atingiram a puberdade, duas delas não apresentaram picos normais do crescimento pubertário, visto terem tido uma má adesão à terapêutica. As restantes 10 que mantiveram uma correcta correcção da acidose, apresentaram uma maturação e crescimento normal durante a puberdade. Nove rapazes e 3 raparigas atingiram a estatura definitiva durante o período de estudo. A estatura final era de 170±2 cm nos rapazes e 155±2 cm nas raparigas, com estaturas médias de -1,4±0,4 SDS em ambos os sexos. A estatura média adulta, após correcção pela estatura média dos pais era de -1,08±0,4 SDS.

Em conclusão, o diagnóstico e tratamento precoce da ATR_1, permite a todas as crianças a normalização do crescimento. As baixas concentrações de bicarbonato, são o principal factor influenciador da estatura à data do diagnóstico. Após uma adequada correcção da acidose as velocidades de crescimento duplicavam e triplicavam. Uma indicação terapêutica permanece inquestionável até se atingir a estatura definitiva, permitindo deste modo, uma estatura adulta normal.

- **Secreção da Homona de Crescimento na acidose metabólica crónica de causa renal. Estudo nº 2**

Neste estudo avaliamos o efeito da AMC na secreção da HC. Os padrões de secreção espontânea nas 24 horas da HC, a secreção da HC após teste de estimulação com Arginina e Insulina e as concentrações plasmáticas de IGF_1 foram avaliadas em dois grupos de crianças pré- pube-

res. O primeiro grupo era constituído por 6 crianças com ATR_1, com idades compreendidas entre os 5 e 12 anos. O segundo grupo incluía 6 crianças com IRC, com idades compreendidas entre os 5 e os 13 anos. O estudo foi realizado em dois períodos diferentes: sob terapêutica alcalinizante (período sem acidose) e o segundo após pelo menos 8 dias de interrupção da terapêutica alcalina (período com acidose). Como esperado nos períodos com acidose, as concentrações de bicarbonato no plasma e o pH eram significativamente inferiores ($p<0,0001$), sendo idêntica a severidade da acidose nos dois grupos. Os padrões de secreção espontânea da HC nos períodos sem acidose, eram idênticos nos dois grupos. Foi observada uma maior secreção de HC durante a noite, com picos de secreção máxima de HC de 19,6±1,4 µg/l no grupo com IRC e 15,7±0,9 µg/l no grupo com ATR_1. Nos dois períodos com acidose houve uma diminuição na secreção de HC. Os picos de secreção máxima de HC eram significativamente inferiores aos verificados nos períodos sem acidose (8,9±0,4 µg/l; $p<0,05$) no grupo com IRC e (7,2±0,9 µg/l; $p<0,0001$) nos grupos com ATR_1. As concentrações médias de HC nos períodos sem acidose (5,2±0,3 µg/l/h no grupo com IRC e 4,8±0,2 µg/l/h no grupo com ATR_1) eram significativamente superiores ($p<0,0001$), às verificadas nos períodos com acidose (3,0±0,1 µg/l/h no gurpo com IRC e 2,7±0,1 µg/l/h no grupo com ATR_1). Verificou-se uma correlação significativa ($p<0,0001$) entre a secreção de HC nas 24 horas e as concentrações de bicarbonato no plasma e com o pH nos períodos com e sem acidose.

As concentrações máximas de HC após estimulação farmacológica com Arginina/Insulina eram idênticas nos dois grupos nos períodos sem acidose (20,5±1,5 µg/l no grupo com IRC e 17,1±1,7 µg/l no grupo com ATR_1). Nos períodos com acidose a concentração máxima de HC era signifi-

cativamente inferior (9,4±0,9 µg/l; p<0,0001 no grupo com IRC) e (7,9±0,9 µg/l; p<0,001 no grupo com ATR_1).

As concentrações plasmáticas de IGF_1 eram idênticas nos dois grupos nos períodos sem acidose (330±21 ng/ml no grupo com IRC e 271±19 ng/ml no grupo com ATR_1). Durante o período com acidose, houve uma baixa significativa nas concentrações plasmáticas de IGF_1 (166±15 ng/ml; p<0,001) no grupo com IRC e (156±17 ng/ml; p<0,05) no grupo com ATR_1. Uma correlação significativa (p<0,0001) estava presente entre as concentrações plasmáticas de IGF_1 e as concentrações de bicarbonato no plasma e com o pH nos períodos com e sem acidose.

Em conclusão, a análise dos perfis de secreção diária da HC, mostra que a AMC origina uma interferência no eixo hipotálamo-hipofisário, através duma redução da amplitude dos picos secretórios, bem como da concentração média de HC. O pH plasmático e a concentração de bicarbonato, são os factores determinantes na secreção de HC e IGF_1. A diminuição da secreção da HC, bem como das concentrações plasmáticas de IGF_1, são o principal mecanismo responsável pelo atraso do crescimento observado nas crianças com AMC de origem renal.

- **Influência da acidose metabólica crónica de causa renal no crescimento: efeito sobre o metabolismo fosfocálcico, ósseo e proteico**

Com a finalidade de separar os diferentes factores associados a IRC e incriminados no atraso do crescimento, realizamos uma série de 3 experiências no rato, incidindo sobre as consequências da AMC no crescimento, no metabolismo fosfocálcico, ósseo e proteico.

Em todos os estudos os ratos em IRC desenvolviam uma acidose. Foram comparados a ratos com a mesma função renal, mas cuja acidose era corrigida pela adição de $NaHCO_3$ na dieta. Na 2ª e 3ª experiências o efeito da acidose era igualmente estudado em ratos com função renal normal, comparando-se ratos que recebiam ou não NH_4Cl no aporte hídrico diário.

A primeira experiência procurou precisar o grau de acidose necessário para interferir com o crescimento. De 104 ratos urémicos, metade permaciam em acidose, sendo agrupados retrospectivamente em cinco grupos de acordo com a severidade crescente da acidose, escalonando-se a partir dum pH de 7,35 a um pH inferior a 7,10. A severidade da acidose estava dependente da função renal, sendo os ratos acidóticos comparados a ratos com o mesmo grau de insuficiência renal mas com acidose corrigida. O ganho de peso só era reduzido nas acidoses severas ($pH<7,20$), enquanto o ganho de comprimento era afectado já na presença de acidoses menos severas ($7,20>pH<7,25$). Assim a acidose da IRC, só originava uma alteração no crescimento, na presença de acidoses graves, sendo porém o crescimento em comprimento mais sensível à acidose que o ponderal. Tal facto sugere, uma interferência muito mais precoce da acidose no osso, do que na massa corporal.

A segunda experiência avaliou as consequências de AMC sobre o metabolismo fosfocálcico, ósseo e sobre algumas hormonas implicadas nestes fenómenos. A IRC foi relativamente pouco severa neste estudo, para permitir a obtenção de uma acidose modesta, sem repercussão sobre o crescimento e para não originar qualquer redução na síntese renal de calcitriol. A acidose isoladamente tinha as mesmas consequências quer houvesse ou não IRC. Originava uma hipercalciúria, uma diminuição da absorção intestinal de cálcio, uma redução do balanço do cálcio, um aumento do cálcio ionizado, sem alteração no cálcio total e uma diminuição do teor ósseo em cálcio. Pelo contrário, o metabolismo do fósforo, incluindo o teor ósseo em fósforo, não se encontrava alterado. Este trabalho mostrou também que a acidose origina uma diminuição da formação óssea, provavelmente dependente da baixa de IGF_1 plasmática, de uma diminuição do calcitriol plasmático directamente ligado ao aumento do cálcio ionizado, e de uma diminuição da absorção intestinal de cálcio, na ausência de modificações das concentrações plasmáticas de PTH.

Na terceira experiência, a questão que se colocou foi a da repercussão da AMC severa, na presença ou ausência duma IRC, sobre o metabolismo proteico muscular. A velocidade de síntese proteica muscular foi determinada *in vivo* através de incorporação da fenilalanina marcada com trício em ratos acordados. A degradação proteica foi calculada como a diferença entre a síntese e o crescimento proteico. Nas condições deste estudo, a acidose acompanhava-se de um atraso do crescimento ponderal e em comprimento, mesmo na presença de consumos alimentares idênticos entre os ratos acidóticos e não acidóticos. A velocidade de síntese proteica não era alterada pela acidose. Pelo contrário, a velocidae de degradação proteica muscular estava acelerada nos ratos acidóticos. Este excesso de

degradação proteica muscular, poderia explicar o atraso do crescimento observado nas AMC.

Analisando globalmente este trabalho, concluímos pois que a AMC com ou sem IRC, acompanha-se de um importante atraso do crescimento, sendo o crescimento estatural mais sensível à acidose que o ponderal. Parece existir um limiar de sensibilidade, a partir do qual a acidose altera o crescimento. Assim, na presença de acidoses mínimas, não havia qualquer repercussão sobre o crescimento. Após correcção da acidose com a terapêutica alcalinizante, uma recuperação do atraso estatural foi observada. Uma correcção ininterrupta da acidose é necessária, para que padrões normais de crescimento se mantenham.

Quanto aos mecanismos fisiopatológicos implicados neste atraso do crescimento pode concluir-se como sendo fundamentalmente os seguintes:

- Uma alteração da regulação endócrina do crescimento, através de uma interferência no eixo hopotálamo-hipofisário, com diminuição da secreção da HC.

- Uma alteração do metabolismo fosfocálcico, com uma diminuição do balanço do cálcio.

- Uma alteração do metabolismo ósseo, com descalcificação óssea e diminuição da massa óssea por aumento da reabsorção óssea e dimimuição da sua formação.

- Uma alteração do metabolismo proteico, com aumento do catabolismo proteico.

Este conjunto de alterações seriam conjuntamente responsáveis pelo atraso do crescimento presente na AMC de causa renal.

X -SUMMARY

X - SUMMARY

Chronic metabolic acidosis (CMA) is generally associated with important growth delay. A causative relationship has either been proved or suggested in a number of experimental and clinical studies with or without CRF.

Pathophysiological mechanisms responsible for the growth delay remain to be established, despite many ongoing research projects.

The aim of the present study was to investigate the relationship between CMA and growth failure of renal origin, and to identify the possible pathophysiological aspects involved in the growth disturbance.

From January 1990 to December 1991 three different studies were performed, two being clinical at the Department of Pediatric Nephrology of the Hôpital Necker Enfants-Malades, and one was experimental, at the Institut National sur la Recherche Medical - INSERM-U-192, in Paris, France.

- **Growth, pubertal development and final height in ATR_1. - Study nº 1**

  Twenty-eight children with ATR_1, with a follow-up of at least 2 years, and normal renal function at the beginning of therapy, were studied. Patients were divided into two groups according to the age at diagnosis. Group I included 15 children aged two weeks to 24 months and Group II 12 children aged 3 to 11 years.

Sodium citrate or bicarbonate was the only treatment used. Mean height at the begining was -2.3±0.3 SDS in Group I and -3.9±0.7 SDS in Group II.

Considering all patients, the initial height, expressed as SDS, showed a significant correlation with initial plasma bicarbonate ($r=0.74$; $p<0.0001$) plasma potassium ($r=0.53$; $p<0.01$) and growth velocity ($r=0.54$; $p<0.01$). A negative correlation between initial height and age at diagnosis was present in Group I ($r= -0.57$; $p<0.01$) but not in Group II ($r=0.35$; n.s.). Mean growth velocity before treatment was -2.37±0.40 SDS and -1.54±0.23 SDS in Group I and Group II respectively. Mean follow-up was 13.2±0.36 years in Group I and 7.1±0.3 years in Group II.During follow-up the mean height gain was +1.09±0.23 SDS in Group I and +1.93±0.50 SDS in Group II. Mean growth velocity reached +0.70±0.09 SDS during the first year under treatment in Group I and +2.80±0.28 SDS in Group II. Mean growth velocity decreased slightly during the second year of treatment, to +0.25±0.03 SDS in Group I and +1.04±0.60 SDS in Group II. At the end of the study mean height of Group I was -1.1±0.3 SDS, showing a marked improvement over their initial height ($p<0.001$). Group II also showed an improvement of height for age. Mean height at the end of the study was -2±0.6 SDS, corresponding to significant height gain *versus* initial mean height ($p<0.001$).Twelve of the 28 children reached puberty; two of them were poorly controlled and showed no pubertal spurt. The other 10 patients had a normal pubertal spurt. Nine boys and three girls, reached adulthood and final height which was 170±2 cm in boys and 155±2 cm in girls, with a mean height of -1.4±0.4 SDS for

Iboth sexes.Taking into account the mean parental height SDS, the mean adult height was -1.08±0.4 SDS.

n conclusion, early diagnosis and treatment of RTA-$_1$, allow normal growth and pubertal development in children. Low bicarbonate plasma concentration is the main determinant factor of the height observed at diagnosis.

After adequate correction of acidosis growth velocity increased twice or three times higher. Treatment remains mandatory after puberty in order to achieve normal adult height.

- **Growth hormone secretion in CMA of renal aetiology. Study nº 2.**

The purpose of this study was to evaluate the effect of CMA in GH secretion. Spontaneous GH secretion (24 h profile), GH secretion in arginine-insulin tolerance test (AITT) and plasma IGF_1 were evaluated in two groups of prepubertal children.

The first group included six children with RTA-$_1$, aged 5 to 12 years. The second group was composed of 6 children with CRF, aged 5 to 13 years. The study was performed in two distinct periods: *a)* under alkalinizing therapy (period without acidosis) and *b)* at least 8 days after interruption of the alkalinizing therapy (period with acidosis). During the periods of acidosis, plasma pH and bicarbonate concentration were significantly lower ($p<0.0001$), and the degree of acidosis was identical in both groups, as expected. Patterns of spontaneous GH secretion in the period without acidosis were similar in the two groups. A greater secretion of GH was observed at night with GH peaks of maximum GH secretion of 19.6±1.4 µg/l in

the CRF Group, and 15.7±0.9 µg/l in the RTA-$_1$ Group. In the period of acidosis there was a decrease in GH secretion. Maximum GH secretion levels were significantly lower than the period without acidosis (8.9±0.4 µg/l; $p<0.05$) in the CRF Group and (7.2±0.9 µg/l; $p<0.0001$) in the RTA-$_1$ Group. The average concentrations of GH in the period without acidosis (5.2±0.3 µg/l/h in the CRF Group and 4.8±0.2 µg/l/h in the ATR-$_1$ Group) were significantly greater ($p<0.0001$) than those during acidosis (3.0±0.1 µg/l/h in the CRF Group and 2.7±0.1 µg/l/h in the RTA$_1$ Group). A significant correlation was noted ($p<0.0001$) between 24 hr GH level plasma bicarbonate concentrations and pH in the periods with or without acidosis. Maximum GH concentrations after pharmacological provocation test with arginine/insulin were identical in the two groups without acidosis (20.5±1.5 µg/l in the CRF Group and 17.1±1.7 µg/l in the ATR-$_1$ Group). In the period with acidosis, maximum GH concentration was significantly lower (9.4±0.9 µg/l; $p<0.0001$ in the CRF Group and 7.9±0.9 µg/l; $p<0.001$ in the ATR-$_1$ Group). IGF$_1$ plasma concentrations were identical in the two groups without acidosis (330±21 ng/ml in the CRF Group and 271±19 ng/ml in the ATR$_1$ Group). During the period with acidosis there was a significant drop in plasma IGF$_1$ concentrations (166±15 ng/ml; $p<0.001$) in the CRF Group and (156±17 ng/ml; $p<0.05$) in the RTA-$_1$ Group. There was a significant correlation ($p<0.0001$) between plasma concentrations of IGF$_1$, plasma bicarbonate concentrations and pH in the periods with or without acidosis.

In conclusion, analysis of the daily GH secretion profiles shows that CMA interferes in the hypothalamic-pituitary axis, with blunting of

spontaneous pulsatility of GH, as well as of mean GH concentration.

Plasma pH and bicarbonate levels are the main factors in GH and IGF_1 secretion. Decrease of GH secretion and low IGF_1 plasma levels may be major mechanisms involved in growth retardation observed in children with renal CMA.

- **Influence of renal CMA in growth: effect upon Ca and P, bone and protein metabolism.Study nº3**

In order to analyse the different factors associated with CRF and implicated in growth delay, three experiments were performed in rats, directed to the consequences of CMA upon growth, Ca, P, bone and protein metabolism. In all the studies rats with CRF developed acidosis. These were compared to rats with similar renal function but in which acidosis was corrected by the adittion of sodium bicarbonate to the diet. In the 2nd and 3rd experiments the effect of acidosis was also studied in rats with normal renal function compared with rats on or off NH_4Cl supplements in the daily drinking water.

In the first experiment, the degree of acidosis required to interfere with growth was investigated. Of 104 uremic rats, fifty percent remained acidotic, being retrospectively matched in 5 groups according to the pH values from 7.35 to less than 7.10. The severity of acidosis was dependent on the renal function, and acidotic rats were matched to non acidotic rats having similar renal function. The weight gain was reduced only in the severe acidosis ($pH < 7.20$), whereas the length gain was affected at lower degrees of acidosis

(7.20>pH<7.25). Therefore acidosis of CRF only interfered with weight increment in the presence of severe acidosis. However length gain was affected earlier. This finding suggests that longitudinal growth of bone is more sensitive to acidosis than other factors such as corporal mass which influence body weight.

The second experiment addressed the consequences of CMA on the Ca, P, and bone metabolism as well as some of the hormones implicated in these phenomena. CRF was relatively mild causing neither marked growth delay nor suppression of calcitriol synthesis. Acidosis itself had the same consequences regardless of the uremia. Hypercalciuria was present with a decreased Ca gut absorption, Ca balance and bone Ca. However ionized Ca was elevated without alteration of the total Ca plasma level. On the contrary, CMA didn't modify either P metabolism, or P bone content. This study also showed that acidosis lowers bone formation rate, probably related to the decrease of plasma IGF_1 and calcitriol, which is directly related to a rise in ionized Ca and to reduction of Ca gut absorption, regardless of plasma PTH concentrations.

In the third study, the aim was to evaluate the consequences of severe CMA in the presence or absence of uremia on protein muscle metabolism.Protein synthesis rate was studied *in vivo* by the incorporation of labelled H3 phenylalanine in awake rats. Protein degradation rate was calculated as the difference between synthesis and protein tissue growth. In this study acidosis was associated with weight and length delay compared to non acidotic rats despite identical food intake. Protein synthesis rate was not

affected by acidosis. On the contrary the rate of muscle protein degradation was increased in acidotic rats. The accelarated muscle protein degradation could explain growth retardation observed in CMA.

Considering all the 3 studies of the present work, we may conclude that CMA with or without CRF is accompanied by an important growth delay. However, height seems to be more dependent on acidosis than weight. A threshold appears to exist above which acidosis interferes with growth. Accordingly, in the presence of moderate or minimal acidosis, growth was not affected. After acidosis was corrected catch up growth occurred. A permanent correction of acidosis is necessary in order to maintain normal growth standards. From the reported experiments we suggest that the following pathophysiological mechanisms may be relevant in CMA growth retardation:

— A disturbance of the endocrine regulation of growth, through the hypothalamic-pituitary axis with blunting of GH secretion.

— An abnormal Ca and P metabolism with reduction of Ca balance.

— A disturbed bone metabolism with bone decalcification and bone mass reduction due to increased bone reabsorption and reduced bone formation.

— A raised protein catabolism.

These factors acting together are responsible for the growth delay observed in renal CMA.

Os dados individuais relativos ao presente estudo, encontram-se informatizados, no computador da Unidade de Fisiopatologia e Genética das Nefropatias da Criança, INSERM-U-192, podendo se necessário ser solicitados.

X -BIBLIOGRAFIA

X - BIBLIOGRAFIA

[1] Green J, Kleeman CR. Role of bone in regulation of systemic acid-base balance. *Kidney Int* 1991; 39:9-26.

[2] Lightwood R. Calcium infarction of the kidneys. *Arch Dis Child* 1935; 10:205-6.

[3] Albright F, Burnett CH, Parson W, Reifenstein EC Jr, Roos A. Osteomalacia and late rickets. *Medicine* 1946; 25:399-479.

[4] Wrong O, Davis HEF. The excretion of acid in renal diseases. *Q J Med* 1959; 28:259-313.

[5] Elkinton JR, Huth EJ, Webster GD Jr, et al. The renal excretion of hydrogen ion in renal tubular acidosis. *Am J Med* 1960; 29:554-75.

[6] Morris RC Jr, Ives HE. Inherited disorders of the renal tubule. In: Brenner, Rector, eds. The Kidney 4th ed. (Saunders Company), 1991; 1596-656.

[7] Rodriguez-Soriano J, Vallo A, Castillo G, Oliveros R. Natural history of primary distal renal tubular acidosis treated since infancy. *J Pediatr* 1982; 101:669-76.

[8] Seldin DW, Wilson JD. Renal tubular acidosis. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS eds. The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill Book Company, New York 3 ed, 1972; 1548-66.

[9] Donckerwolcke RA. Diagnosis and treatment of renal tubular disorders in children. *Pediat Clins N Am* 1982; 29:895-906.

[10] Santos F, Chan JCM. Renal tubular acidosis in children. *Am J Nephrol* 1986; 6:289-95.

[11] McSherry E, Morris RC Jr. Attainment and maintenance of normal stature with alkali therapy in infants and children with classic renal tubular acidosis. *J Clin Invest* 1978; 61:509-27.

[12] Nash MA, Torrado AD, Greifer I, Spitzer A, Edelmann CM Jr. Renal tubular acidosis in infants and children. *J Pediatr* 1972; 80:738-48.

[13] Donckerwolcke R. Renal tubular acidosis. Theorical and clinical aspects. *Thesis*, University of Utrecht, 1983; 54-6.

[14] McSherry E. Renal tubular acidosis in childhood. *Kidney Int* 1981; 20:799-809.

[15] Chan JCM. Acid-base and mineral disorders in children: a review. *The Intern Jour of Pediatr Nephrol* 1980; 1:54-63.

[16] Chan JCM. Acid-base disorders and the kidney. Year Book Medical Publishers Inc 1984; 401-471.

[17] Donckerwolcke R, Win-Ni-Jang, Chan JCM. Growth failure in children with renal tubular acidosis. *Seminars in Nephrology* 1989; 9:72-74.

[18] Lemann J Jr, Litzow JR and Lennon EJ. The effects of chronic acid loads in normal man: Further evidence for participation of bone mineral in the defense against chronic metabolic acidosis. *J Clin Invest* 1966; 45:1608-1614.

[19] Bushinsky DA, Krieger NS, Geisser DI, Grossman EB, Coe FE: Effects of pH on bone calcium and proton fluxes *in vitro. Am J Phisiol* 1983; 245:204-209.

[20] Holliday MA, Chantler C, Potter DE. Metabolism and growth in children with kidney insufficiency. Kidney Int 1978; 14:211-230.

[21] Cooke RE, Boyden DG, Haller E. The relationship of acidosis and growth retardation. *J Pediatr* 1960; 57:326-337.

[22] Barzel US, Jowsey J. The effects of chronic acid and alkali administration on bone turnover in adult rats. *Clin Sci* 1969; 36:517--524.

[23] Gafter U, Edelstein S, Hirsh J, Levi J. Metabolic acidosis enhances 1,25(OH)2D3- induced intestinal absorption of calcium and phosphorus in rats. *Miner Electrolyte Metab* 1986; 12:213-217.

[24] Mehls O, Ritz E, Gilli G, Kreusser W. Growth in renal failure. *Nephron* 1978; 21:237-247.

[25] Kleinknecht C, Broyer M, Gagnadoux MF, Marti-Henneberg L, Dartois AM, Kermanach C, Pouliquen M, Degoulet P, Usberti M, Roy MP. Growth in children treated with long term dialysis. A study of 76 patients; in Hamburger J, Crosnier J, Grünfeld JP, Maxwell MH (eds): Advances in Nephrology. New York, Year Book Medical Publishers, 1980; 9:133-163.

[26] Potter DE, Greiffer I. Statural growth of children with renal disease. Kidney Int 1978; 14:334-339.

[27] Schärer K. Growth in children with chronic renal failure. Kidney Int 1978; 13 (suppl 8):68-71.

[28] Stickler GB. Growth failure in renal disease. *Pediatr Clin North Am* 1976; 23(4):885-894.

[29] Lewy JE, New MI. Growth in children with renal failure. *Am J Med* 1975; 58:65-68.

[30] Broyer M, Kleinknecht C, Gagnadoux MF. Growth in uremic children in Pediatric Nephrology, edited by Garland JS, New York, STPM Press 1977; 4:185-194.

[31] Kleinknecht C, Broyer M, Huot D, Marti-Henneberg L, Dartois AM. Growth and development of nondialyzed children with chronic renal failure. Kidney Int 1983; 24: (suppl 15) S40-S47.

[32] Rizzoni G, Basso T, Setari M. Growth in children with chronic renal failure on conservative treatment. Kidney Int 1984; 26:52-58.

[33] Chesney RW, Mehls O, Anast C et al. Renal osteodystrophy in children: the role of vitamina D, phosphorus and parathyroid hormone. *Am J Kidney Dis* 1986; 7:275-284.

[34] Hodson EM, Shaw PF, Evans RA, Dunstan CR, Hills EE, Wong SYP, Rosenberg AR, Roy LP. Growth retardation and renal osteodystrophy in children with chronic renal failure. *J Pediatr* 1983; 103:735-740.

[35] Betts PR, White RHR. Growth potential and skeletal maturity in children with chronic renal insuffciency. *Nephron* 1976; 16:325-332.

[36] Avioli LV. Childhood renal osteodystrophy. Kidney Int 1978; 14:355-360.

[37] Kleinknecht C, Broyer M, Roy MP et al. La croissance au cours de l'insuffisance rénale chronique. *Rev Pediatr* 1979; 15:203-209.

[38] Langman CB, Masur AT, Baron R et al. 25 Hydroxyvitamin D3 (calcifediol) therapy of juvenile renal osteodystrophy: Benefical effect on linear growth velocity. *J Pediatr* 1982; 100:815-820.

[39] Tanner JM. Catch-up growth in man. *Br Med Bull* 1981; 33(3):233-238.

[40] Salusky I, Kleinknecht C, Broyer M, Gubler MC. Prolonged renal survival and stunting with protein-deficient diets in experimental uremia. *J Lab Clin Med* 1981; 97:21-30.

[41] West CD, Smith WC. An attempt to elucidate the cause of growth retardation in renal disease. *Am J Dis Child* 1956; 91:460-476.

[42] French CB, Genel M. Pathophysiology of growth failure in chronic renal insufficiency. Kidney Int 1986; 30 (suppl 19): S59-S64.

[43] Chantler C, Holliday MA. Growth in children with renal disease, with particular reference to the effects of calorie malnutrition: A review. *Clin Nephrol* 1973; 1:230-242.

[44] Simmons JM, Wilson CJ, Potter DE, Holliday MA. Relation of caloric deficiency to growth failure in children on hemodialysis and the growth response to calorie supplementation. *N Engl J Med* 1971; 285:653-656.

[45] Jones RWA, Rigden SP, Barratt TM, Chantler C. The effects of chronic renal failure in infancy on growth, nutritional status and body composition. *Pediatr Res* 1982; 16:784-791.

[46] Arnold WC, Danford D, Holliday MA. Effects of caloric supplementation on growth in children with uremia. Kidney Int 1983; 24:205-209.

[47] Stickler GB, Bergen BJ. A review: Short stature in renal disease. *Pediatr Res*, 1973, /.978-982.

[48] Caldas A, Broyer M, Dechaux M, Kleinknecht C. Primary distal tubular acidosis in childhood. Long-term follow-up of 28 patients. *J Pediatr* 1992; 121:233-241.

[49] Bergstrom WH, De Leon AS, Van Gemund JJ. Growth aberrations in renal disease. *Pediatr Clin North Am* 196411:563-575.

[50] D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USF* 1984; 81:935.

[51] Hara Y, May RC, Kelly RA, Mitch WE. Acidosis, not azotemia, stimulates branched-chain, amino acid catabolism in uremic rats. *Kidney Int* 1987; 32:808-814.

[52] Chan YL, Savdie E, Mason RS, Posen S. The effect of metabolic acidosis on vitamin D metabolites and bone histology in uremic rats. *Calcif Tissue Int* 1985; 37:158-164.

[53] Greenberg AJ, McNamara H, McCrancy WW. Metabolic balance studies in primary renal tubular acidosis: effect of acidosis on external calcium and phosphorus balances. *J Pediatr* 1966; 69:610-618.

[54] Gervais MH, Brazeau P. Influence de l'acidose métabolique chronique sur la regulation endocrinienne de la croissance chez le rat. *L'Union Medical du Canada* 1971; 100:716-722.

[55] Laouari D, Maniar S, Burtin M, Kleinknecht C. Growth in uremic rats on different diets. *Contribution of Nephrology* 1990; 81:142-153.

[56] Richards P, Wrong OM. Dominant inheritance in a family with renal tubular acidosis. *Lancet* 1972; 2:998-999.

[57] Maniar S, Caldas A, Laouari D, Kleinknecht C. Severity of chronic metabolic acidosis and growth of rats with chronic uremia. *Mineral and Electrolyte Metabolism* 1992; 18:241:244.

[58] Royer P, Broyer M. L'acidose rénale au cours des tubulopathies congénitales. In: Proceeding of Actualités Néphrologiques de l'Hôpital Necker, Paris, Flammarion 1967; 73-92.

[59] Rodriguez Soriano J, Boichis H, Stark H, Edelmann CM Jr. Proximal renal tubular acidosis. A defect in bicarbonate reabsorption with normal urinary acidification. *Pediatr Res* 1967; 1:81-88.

[60] Bentur L, Alon U, Mandel H, Pery M, Berant M. Familial distal renal tubular acidosis with neurosensory deafness. Early nephrocalcinosis. *Am J Nephrol* 1989; 9:470-474.

[61] Caldas A, Broyer M, Dechoux M. Achievement and maintenance of normal stature with alkali therapy in infants and chidren with classic renal tubular acidosis. *Pediatric Nephrology* 1987; 1(4), C108 (Abst).

[62] Broyer M, Caldas A, Kleinknecht C. Distal tubular acidosis and statural growth. *Pediatric Nephrology* 1988; 2(1), C116 (Abst).

[63] Tobler R, Prader A, Bühlmann A et al. Rachis ab Folge der Ureterosigmoidostomie. *Helv Paediatr Acta* 1957; 12:215-240.

[64] Prader A, Tanner JM, Von Harnack GA. Catch-up growth following ilness or starvation: An exemple of development canalization in man. *J Pediatr* 1963; 62:646-659.

[65] Palmer RH, Cornfeld D. Primary renal tubular acidosis recognized and treated at three days of age. A case report illustratring the value of rotine post mortem examination. *Clin Pediatr* 1973; 12:140-144.

[66] Edelmann CM Jr, Houston IB, Rodriguez-Soriano J, Boichis H, Stark H. Renal excretion of hydrogen ion in children with idiopathic growth retardation. *J Pediatr* 1968; 72:443.

[67] McSherry E. Acidosis and growth in non uremic renal disease. *Kidney Int* 1978; 14:349-354.

[68] Albright F, Consolazio WV, Coombs FS, Sulkowith HW, Talbot JH. Metabolic studies and therapy in a case of nephrocalcinosis with rickets and dwarfism. *Bull Johns Hopkins* J 1940; 66:7-14.

[69] Royer P. Chronic tubular disease. In *Nephrology*, edited by Hamburger J, Philadelphia, WB Saunders Co, 1968; 579-601.

[70] Sobel E. Preschool and school age child: Growth Problems in Biological Basis of Pediatric Pratice, New York, McGrow-Hill 1968; 2: 1568-1569.

[71] Watson EH, Lowrey GH. Growth and development of children. Chicago, *Year Book of Medical Publishers, Inc* 1969; 87-88.

[72] Cooke RE, Kleeman CR. Distal tubular dysfunction with renal calcification. *Yale J Biol Med* 1950; 23:199-209.

[73] Kaplan EL, Hill BJ, Locke S et al. Metabolic acidosis and parathyroid hormone secretion in sheep. *J Lab Clin Med* 1971; 78:819.

[74] Holliday MA, Chantler C, Potter DE (eds). Metabolism and growth in children with kidney insuffiency. Proceeding of an International Conference held in Carmel, California, April 1977, and Bethesda, Maryland, November 1977. *Kidney Int* 1978; 14:299-382.

[75] Schärer K, Mehls O, Holliday M (eds). International Workshop on chronic renal failure in children. Heidelberg, 21-22 May 1982. *Kidney Int* 1983; 24 [suppl 15]:1-15.

[76] Chesney R, Holliday M, Greifer I, Grupe W, Gruskin A, McEnery P (eds). Third International Workshop on growth in children with renal disease, Warrenton, Virginia, 3-5 May 1985. *Am J Kidney Dis* 1986; 7:255-352.

[77] Schärer K, Mehls O (eds). International Symposium on Growth, Nutrition and Endocrine Changes in Children with Chronic Renal Failure, Heidelberg, 2-4 April 1990. *Pediatric Nephrology* 1991; 5:438-571.

[78] Caruana RJ, Bulkalew VM Jr. The syndrome of distal (type 1) renal tubular acidosis. Clinical and laboratorial findings in 58 cases. *Medicine* 1988; 67:84-99.

[79] Schartum S, Nichols G Jr. Concerning pH gradients between the extracelular comportment and fluids bathing the bone mineral surface and their relation to calcium ion destribution. *J Clin Invest* 1962; 41:1163.

[80] Schartum S, Nichols G Jr. Calcium metabolism of bone *in vitro*: influence of bone cellular metabolism and parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1961; 40:2083.

[81] Goldhaber P, Rabadjija L. H^+ stimulation of cell-mediated bone resorption in tissue culture. *Am J Physiol* 1987; 253:90-98.

[82] Arnett TR, Dempster DW. Effect of pH on bone resorption by rat osteoclast *in vitro*. *Endocrinology* 1986; 119:119-124.

[83] Bushinsky DA. Internal exchanges of hydrogen ions: bone. In Seldin DW and Giebisch G (eds). The regulation of Acid-Base Balance. *Raven Press*, New York 1989; 69-88.

[84] Teti A, Blair HC, Schelesinger P et al. Extracellular protons acidify osteoclasts, reduce cytozolic calcium and promote expression of cell-matrix attachment structures. *J Clin Invest* 1989; 84:773.

[85] Barzel US. The effects of Excessiv Acid Feeding on Bone. *Calc Tiss Res* 1969; 4:94-100.

[86] Kraut JA, Mishler DR, Singer FR, Goodman WG. The effects of metabolic acidosis on bone formation and bone resorption in the rat. *Kidney Int* 1986; 30:694-700.

[87] Newell GK, Beauchene RE. Effects of dietary calcium level, acid stress, and age on renal, serum, and bone responses of rats. *J Nutr* 1975; 105:1039-1047.

[88] Krishnarao GVG, Draper HH. Age related changes in the bones of adult mice. *J Gerontol* 1969; 24:149-151.

[89] Upton PK, L'Estrange JL. Effects of chronic hydrochloric and lactic acid adminsitration on food intake, blood acid-base balance and bone composition of the rat. *Quart J Exp Physiol* 1977; 62:223-235.

[90] Kaye M, Freuch AJ, Silverman M. A study of vertebral bone power from patients with chronic renal failure. *J Clin Invest* 1970; 49:442.

[91] Drinkard JP, Lee DBN, Gonick HC. Parathormone (PTH) and calcium kinetic changes with alkali treatment of renal tubular acidosis (RTA). *Proc Amar Soc Nephr 3rd Annual Meeting*, Washington, DC, 1969; 17.

[92] Arruda JAL, Alla V, Rubinstein H, Cruz-Soto M, Sabatini S, Batlle DC, Kurtzman NA. Parathyroid hormone and extrarenal acid buffering. *Am J Physiol* 1980; 239:F533-F538.

[93] Smith LH Jr, Schreiner GE. Studies on renal hyperchloremic acidosis. *J Lab Clin Med* 1954; 43:347-358.

[94] Coe FL, Firpo JJ Jr. Evidence of mild reversible hyperparathyroidism in distal renal tubula acidosis. *Arch Intern Med* 1975; 135:1485-1489.

[95] Wallach S, Baker RK, Nicastri A. Primary renal tubular acidosis and secondary hyperparathyroidism. *Am J Med* 1972; 52:809-816.

[96] Lemann J Jr, Litzow JR, Lennon EJ. Studies of the mechanisms by which chronic metabolic acidosis augments urinary calcium excretion in man. *J Clin Invest* 1967; 46:1318-1328.

[97] Sutton RAL, Wong NLM, Dirks JH. Effects of metabolic acidosis and alkalosis on sodium and calcium transport in the dog kidney. *Kidney Int* 1979; 15:520-533.

[98] Lemonn J Jr, Adams ND, Gray RW. Urinary calcium excretation in humans beings. *N Engl J Med* 1979; 301:535-541.

[99] Bisaz S, Felix Newman WF, Fleisch H. Quantitative determination of inhibitors of calcium phosphate precipitation in whole urine. *Miner Electrolyte Metab* 1978; 1:7:74-83.

[100] Harrison HE, Harrison HC. The effect of acidosis upon the renal tubular reabsorption of phosphate. *Amer J Phisiol* 1941; 134:781.

[101] Lee SW, Russell J, Avioli LV. 25-hydroxycholecalciferol to 1,25-dihydroxycholecalciferol conversion impaired by systemic metabolic acidosis. *Science* 1977; 195:994-996.

[102] Tsuru N, Chan JCM. Growth Failure in Children with Metabolic Alkalosis and with Metabolic Acidosis. *Nephron* 1987; 45:182-185.

[103] Portale AA, Halloran BP, Harris ST, Morris RC Jr. Metabolic acidosis reverses the increase in serum concentration of 1,25 $(OH)_2D$ in phosphorus restricted normal men. *Clin Res* 1987; 35:574.

[104] Nakano M, Kainer G, Foreman JW, Ko D, Chan J. The effects of exogenous rat growth hormone therapy on growth of uremic rats fed an 8% protein diet. *Pediatr Res* 1989; 26:204-207.

[105] Murphy LJ, Bell GI, Duckworth ML, Friesen HG. Identification, characterization, and regulation of a rat cDNA which encodes insuline-like growth factor-I. *Endocrinology* 1987; 121:684.

[106] Foss GL, Perry CB, Wood FJ. Renal tubular acidosis. *Q J Med* 1956; 98:185-199.

[107] Leedat YK. Some observation of renal tubular acidosis, a familial study. *S Afr Med J* 1964; 38:606-610.

[108] Mutalen CR, Montoreno, Labarrere C. Early skeletal effect of alkali therapy upon the osteomalacia of renal tubular acidosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42:875-881.

[109] Courey RW, Pfister RC. The radiographic findings in renal tubular acidosis. *Diag Radiol* 1972; 105:497-502.

[110] Chan JCM. Renal tubular acidosis. *J Pediatr* 1983; 102:327-340.

[111] Cunningham J, Bikle DD, Avioli LV. Acute, but not chronic, metabolic acidosis disturbs 25-hydroxyvitamin D_3 metabolism. *Kidney Int* 1984; 25:47-52.

[112] McSherry E, Weberman J, Grumbach M, Kaplan S. The effect of acidosis on human growth hormone (HGHO) release in children with non-azotemic RTA. *Clin Res* 1980; 28:535, (Abst).

[113] Matteini M, Cotrozzi G, Capelli G. Human growth hormone secretion induced by sodium bicarbonate infusion. *Acta Med Auxol* 1976; 8:49- -54.

[114] Winsness A, Monn E, Stokke O, Feyling T. Congenital, persistent proximal type renal tubular acidosis in two brothers. *Acta Pediatr Scand* 1979; 68:861-868.

[115] Chan JCM. Urinary sulfate excretion in children with classic renal tubular acidosis. *Nutr Metab* 1978; 22:257-261.

[116] Chesney RW. Growth Retardation in Childhood Renal Disease: a Hormonal or Nutritional Problem? *Am J Nephrol* 1987; 7:253-256.

[117] Rizzoni G, Broyer M, Guest G, Fine R, Holliday MA. Growth Retardation in Children with Chronic Disease: Scope of the Problem. *Am J Kidney Diseases* , 1986; 7:256-261.

[118] Mehls O, Ritz E. Skeletal growth in experimental uremia. *Kidney Intern* 1983; 24:S53-S62.

[119] National Research Council, Food and Nutrition Board: Recomended Dietary Allowances 10th ed, *National Academy of Science*, Washington DC; 1989.

[120] Edelman CM, Boichis H, Rodriguez-Soriano J, Staik H. The renal response of children to acute chloride acidosis. *Ped Res* 1967; 1:452-460.

[121] Sempé P, Pedron G. Roy-Pernot MP. Auxologie, méthode et séquences. Theraplix, Paris, 1979.

[122] Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969; 44:291-303.

[123] Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970; 45:13-23.

[124] Tanner JM. Growth at adolescence. Blackwell Scientific Publications, Ltd, Oxford 1962; 1-10.

[125] Gilli G, Mehls O, Fischer W, Schärer K. Final height in children with chronic renal failure (abstract). *Pediatr Res* 1980; 14:1015.

[126] Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist, 2nd ed. Stanford University Press, California, 1959.

[127] Bernard J, Laval-Jeantet M. Le rapport cortico-diaphysaire tibial pendant la croissance. *Arch Franc Pediatr* 1962; 18:805-817.

[128] Chan JCM. The rapid determination of urinary titrable acid and ammonium and evolution of freezing as a method of preservation. *Clin Biochem* 1972; 5:94-98.

[129] Lin SL, Chan JCM. Urinary bicarbonate: a titrimetric method for determination. *Clin Biochem* 1973; 6:202-210.

[130] Shepard BM, Horst RL, Hamstra AJ, De Luca HF. Determination of vitamin D and its metabolites in plasma from normal and anephric man. *Biochem J* 1979; 182:55-69.

[131] Canterbury JM, Reiss E. Multiple immunoreactive forms of parathyroid hormones in human sera. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 140:1393-1395.

[132] Kowarski A, Thompson RG, Migeon CJ, Blizzard RM. Determination of integrated concentration of true secretion rate of human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 32:356-360.

[133] Penny R, Blizzard RM, Davis MT. Sequential arginine and insuline tolerance test on the same day. *J Clin Endocrinol Metabol* 1969; 29:1499-1501.

[134] Bercu BB, Shulman D, Root WA, Spiliottis EB. Growth hormone (GH), provocative testing frequently does not reflect endogenous GH secretion. *J Clin Endocrinol Metabol* 1986; 63:709-716.

[135] Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. Radioimmunoassay for insuline-like growth factor-I: Solutions to some potential problems and pitfalls. *Journal of Endocrinology* 1991; 128:347-357.

136] Toverud SV, Boass ASC, Garner, Endres DB. Circulating parathyroid hormone concentration in normal and vitamin D deprived rat pups determined with an N-terminal-specific radioimmunoassay. *Bone Miner* 1986; 1:145-155.

[137] Preece M, O'Riordan JLH, Lawson DEM, Kodick EA. Competitive protein-binding assay for 25-hydroxycholecalciferol and 25-hydroxyergocalciferol in serum. *Clin Chim Acta* 1974; 54:235-242.

[138] Ma RSW, Chan JCM. Endogenous sulfuric acid production: a method of measurement by extrapolation. *Clin Biochem* 1973; 6:82-87.

[139] Pavlovitch JH, Cournot-Witmer G, Bourdeau A, Balsan S. Suppressive effects of 24,25-dihydroxycholecalciferol on bone resorption induced by acute bilateral nephrectomy in rats. *J Clin Invest* 1981; 68:803-810.

[140] Blumen Krautz N, Arbo-Hanson G. An automated procedure for the quantitative determination of hydroxyproline in urine. *Clin Biochem* 1974; 7:250-257.

[141] Kivirikko KI, Laitinen O, Prockop DJ. Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal Biochem* 1967; 19:249-255.

[142] Schenk R, Eggli P, Fleisch H, Rosini S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 1986; 38:342-349.

[143] Cruz-Orive LM, Hunziker EB. Stereology for anisotropic cells: Application to growth cartilage. *J Microsc* 1986; 143:47-80.

[144] Hunziker EB, Schenk RK, Cruz.Orive LM. Quantification of chondrocyte performance in epiphyseal plates during longitudinal bone growth. *J Bone Jt Surgery* 1987; 69A:162-173.

[145] Garlick PJ, McNurlan MA, Preedy VR. A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissue by injection of [^{3}H]phenylalanine. *Biochem J* 1980; 192:719-723.

[146] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.

[147] Fleck A, Begg D. The estimation of ribonucleic acid using ultraviolet absorption measurements. *Biochem Biophys Acta* 1954; 108:333-339.

[148] Tanner RL. The response of normal subjects to the short ammonium chloride test. The modifying influence of renal ammonia production. *Clin Sci* 1971; 583-595.

[149] Brot J, Sirota JH. The renal clearance of endogenous "creatinine" in man. *J Clin Invest* 1948; 27:645-654.

[150] Brenner RJ, Spring DB, Sebastian A, McSherry EM, Genant HK, Palubinskas AJ. Morris RC Jr. Incidence of radiographically evident bone disease, nephrocalcinosis, and nephrolithiasis in various types of renal tubular acidosis. *New Engl J M* 1982; 307:217-222.

[151] Wrong OM, Feest TG. The natural history of distal renal tubular acidosis. *Contr Nephrol Karger, Basel* 1980; 21:137-144.

[152] Nance WE, Sweeney A. Evidence for autosomal recessive inheritance of the syndrome of renal tubular acidosis with deafness. *Birth Defects* 1971; 7:70-73.

[153] Choen T, Brand Avraham A, Karshai C et al. Familial infantile renal tubular acidosis and congenital nerve deafness: an autosomal recessive syndrome. *Clin Genet* 1973; 4:275-278.

[154] Walker WG, Ozer FL, Whelton A. Syndrome of perceptive deafness and renal tubular acidosis. *Birth Defects* 1974; 10:163-168.

[155] Shapira E, Ben-Yoseph Y, Eyal FC, Russel A. Enzymatically inactive red cell carbonic anhydrase B in a family with renal tubular acidosis. *J Clin Invest* 1974; 53:59-63.

[156] Donckerwolcke RV, Van Biervliet JPGM, Koorevaar G, Kuitgen RH, Van Stekelenburg GJ. The syndrome of renal tubular acidosis with nerve deafness. *Acta Pediatr Scand* 1976; 66:100-104.

[157] Simon H, Orive B, Zamora I, Mendizabal S. The acidification defect in the syndrome of renal tubular acidosis with nerve deafness. *Acta Pediatr Scand* 1979; 68:291-295.

[158] Dunger DB, Brenton CP, Cain AR. Renal tubular acidosis and nerve deafness. *Arch Dis Child* 1980; 55:221-225.

[159] Tashian RE, Kendall AG, Carter ND. Inherited variants of human red cell carbonic anhydrase. *Hemoglobin* 1980; 4:635-651.

[160] Takanobu A, Yamamoto J, Matsuda I, Tamiguchi N, Kondo T, Nagai B. Siblings with renal tubular acidosis and nerve deafness. The first family in Japan. *Human Genet* 1984; 66:282-285.

[161] McKusick VA. Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked pheno-types, 8th edn, 1988:1168-1169.

[162] Dedmon RE, Wrong O. The excretion of organic anion in renal tubular acidosis with particular reference to citrate. *Clin Sci* 1962; 22:19-32.

[163] Norman ME, Feldman NJ, Chon RM, McCurdy DK. Urinary citrate excretion in the diagnosis of distal renal tubular acidosis. *J Pediatr* 1978; 92:394-400.

[164] Morrissey JF, Ochoa M Jr, Lotspeich WD, Watherhouse C. Citrate excretion in renal tubular acidosis. *Ann Intern Med* 1963; 58:159-166.

165] McSherry E, Pokroy M. The absence of nephrocalcinosis in children with type 1 RTA on high dose alkali therapy since infancy. *Clin Res* 1978; 26:470A.

[166] Harrington TM, Bunch TW, Van Den Berg CJ. Renal tubular acidosis: a new look at treatment of musculoskeletal and renal disease. *Mayo Clin Proc* 1983; 58:354-360.

[167] Coe FL, Firpo JJ Jr, Hollandsworth DL, et al. Effect of acute and chronic metabolic acidosis on serum immunoreactive parathyroid hormone in man. *Kidney Int* 1975; 8:262-273.

[168] Kaye M. The effects in the rat of varying intakes of dietary calcium, phosphorus, and hydrogen ion on hyperparathyroidism due to chronic renal failure. *J Clin Invest* 1974; 53:256-269.

[169] Bushinsky DA, Favus MJ, Schneider AB et al. Effects of metabolic acidosis on PTH and $1,25(OH)_2D_3$ response to low calcium diet. *Am J Physiol* 1982; 243:F570-F575.

[170] Kraut JA, Gordon EM, Ranson JC et al. Effect of chronic metabolic acidosis on vitamin D metabolism in humans. *Kidney Int* 1983; 24:644-648.

[171] Weber HP, Gray RW, Dominguez JH, Lemann J Jr. The lack of effect of chronic metabolic acidosis on 25-OH-vitamin D metabolism and serum parathyroid hormone in human. *J Clin Endocr Metab* 1976; 43:1047-1055.

[172] Litzow JR, Lemann J, Lennon EJ. The effect of treatment of acidosis on calcium balance in patients with chronic azotemic renal disease. *J Clin Invest* 1967; 46:280-286.

[173] Stacy BD, Wilson BW. Acidosis and hypercalciuria: renal mechanisms affecting calcium, magnesium and sodium excretion in the sheep. *J Physiol* 1970; 210:549-564.

[174] Adams ND, Gray RW, Lemann J. The calciuria of increased fixed acid production in humans: evidence against a role for parathyroid hormone and $1,25(OH)_2D$ vitamine D. *Calcif Tiss Int* 1979; 28:233-238.

[175] Kaiser BA, Leitz H, Moore ES et al. The effect of chronic metabolic acidosis on calcium and phosphorus balance. *Pediatr Res* 1982; 16:323 A.

[176] Burnell JM, Teubner E. Changes in bone sodium and carbonate in metabolic acidosis and alkalosis in the dog. *J Clin Invest* 1971; 50:327-331.

[177] Pines KL, Mudge GH. Renal tubular acidosis with osteomalacia. *Am J Med* 1951; 11:302-311.

[178] Cuningham J, Fraher LJ, Clemens TL et al. Chronic acidosis with metabolic bone disease. Effect of alkali on bone morphology and vitamin D metabolism. *Am J Med* 1982; 73:199-204.

[179] Mautalen C, Montoreano R, Labarrere C. Early skeletal effect of alkali therapy upon the osteomalacia of renal tubular acidosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42.875-881.

[180] Phelps KR, Einhorn TA, Vigorita VJ et al. Acidosis-induced osteomalacia: metabolic studies and skeletal histomorphometry. *Bone* 1986; 7:171-179.

[181] Kawashima H, Kraut JA, Kurokawa K. Metabolic acidosis suppresses 25-hydroxyvitamin D_3-1a-hydroxylase in the rat kidney - distinct site and mechanism of action. *J Clin Invest* 1982; 70:135-140.

[182] Sauveur B, Garabédian M, Fellot C et al. The effect of induced metabolic acidosis on vitamin D_3 metabolism in rachitic chicks. *Calcif Tissue Res* 1977; 23:121-124.

[183] Ro HK, Tembe V, Krug T et al. Acidosis inhibits $1,25(OH)_2D3$ but not cAMP production in response to parathyroid hormone in the rat. *J Bone Min Res* 1990; 5:272-278.

[184] Bushinsky DA, Nalbantian-Brandt C, Favus MJ. Elevated Ca^{2+} does not inhibit the $1,25(OH)_2D_3$ response to phosphorus restriction. *Am J Physiol* 1989; 256:F285-F289.

[185] Chesney RW, Kaplan BS, Phelps M, De Luca HF. Renal tubular acidosis does not alter circulating values of calcitriol. *J Pediatrics* 1984; 104:51-55.

[186] Bushinsky DA, Riera GS, Favus MJ, Coe FL. Evidence that blood ionized calcium can regulate serum $1,25(OH)_2D_3$ independently of parathyroid hormone and phosphorus in the rat. *J Clin Invest* 1985; 76:1599-1604.

[187] Caldas A, Richard M, Maniar S et al. Zinc bone loss in chronic renal failure and chronic metabolic acidosis. *Biological Trace Element Research* 1992; 32:339-348.

[188] Lefebvre A, de Vernejoul MC, Gueris J et al. Optimal correction of acidosis changes progression of dialysis osteodystrophy. *Kidney Int* 1989; 36:1112-1118.

[189] Barsotti G, Lazzeri M, Cristofano C et al. The role of matabolic acidosis in causing uremic hyperphosphatemia. *Miner Electrolyte Metab* 1986; 12:103-106.

[190] Henda Y, Takahashi K, Takahashi S, Azimu K, Irie M, Sakuma M, Tsushima T, Shizume K. Growth hormone secretion during nocturnal sleep in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metabol* 1969; 29:20.

[191] Hunter WM, Rigal WM. The diurnal pattern of plasma growth hormone concentration in children and adolescents. *Journal of Endocrinology* 1966; 34:147-153.

[192] Parker DC, Sassin JF, Mace JW, Gotlin RW, Rossman LG. Human growth hormone release during sleep: electroencephalographic correlation. *J Clin Endocrinol Metabol* 1969; 29:871.

[193] Albertsson-Wikland K, Rosberg S. Analyses of 24-hour growth hormone profile in children: relation to growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:493-500.

[194] May RC, Kelly RA, Mitch WE. Mechanisms for defects in muscle protein metabolism in rats with chronic uremia. *J Clin Invest* 1987; 79:1099-1103.

[195] Gafter U, Kraut JA, Lee DBN, et al. Effect of metabolic acidosis on intestinal absorption of calcium and phosphorus. *Am J Physiol* 1980; 239:G480-G484.

[196] Halliburton IW. The effect of unilateral nephrectomy and of diet on the composition of the kidney. In Compensatory Renal Hypertrophy, Nowinski WW and Goss RJ ed, 1969, Academic Press New York and London, 101-130.

[197] Ireland SB, Stewart PM. Protein turnover in uraemia in the rat. *Clin Sci* 1990; 79:537-542.

[198] Portale AA, Booth BE, Halloran BP, Morris C Jr. Effect of dietary phosphorus on circulating concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D and immunoreactive parathyroid hormone in children with moderate renal insuffciency. *J Clin Invest* 1984; 73:1580-1589.

[199] Purkerson ML, Hoffsten PE, Klahr S. Pathogenesis of the glomerulopathy associated with renal infarction in rats. *Kidney Int* 1976; 9:407-417.

[200] Meyer TW, Rennke HG. Progressive glomerular injury after limited renal infarction in the rat. *Am J Physiol* 1988; 252:F856-F862.

[201] Broyer M. Frequence et causes de l'insuffisance rénale chez l'enfant. Néphrologie Pédiatrique, édite par Royer L, Habib R, Mathieu H, Broyer M, 1983; 425-430. Flammarion, Paris.

[202] Challa A, Krieg RJ, Thabet NA, Veldhuis JD, Chan CM. Metabolic acidosis inhibits growth hormone secretion in rats: mechanism of growth retardation. *Am J Physiol* 1993; 265:E547-E553.

[203] Challa A, Chan W, Krieg RJ, Thabet NA, Liu F, Hintz RL, Chan CM. Effect of metabolic acidosis on the expression of insulin-like growth factor and growth hormone receptor. *Kidney International* 1993; 44:1224-1227.

[204] El-Bishti MM, Counahan R, Bloom SR, Chantler C. Hormonal and metabolic responses to intravenous glucose in children on regular hemodialysis. *A Clin Nutr* 1978; 31:1865-1869.

[205] Ramirez G. O'Neill WM, Bloomer HA, Jubiz W. Abnormalities in the regulation of growth hormone in chronic renal failure. *Arch Intern Med* 1978; 138:267-271.

[206] Hokken-Koelega ACS, Hackeng WHL, Stijnen T, Wit JM, Muinck Keizer-Schrama SS MPF, Drop SLS. Twenty-four hour plasma growth hormone (GH) profiles, urinary GH secretion, and plasma insulin-like growth factor I and II in prepubertal children with chronic renal insufficiency and severe growth retardation. *J Clin Endocrinol Metabol* 1990; 71:688-695.

[207] Pellegrino ED, Biltz RM. The composition of human bone in uremia. Observations on the reservoir function of bone and demonstration of a labile fraction of bone carbonate. *Medicine* 1965; 44:397-418.

[208] Dominguez JH, Raisz LG. Effect of changing hydrogen ions carbonic acid and bicarbonate concentrations on bone resorption *in vitro*. *Calcif Tissue Int* 1979; 29:7-13.

[209] Bushinsky DA, Lechleider RJ. Mechanism of proton induced bone-calcium release: calcium carbonate dissolution. *Am J Physiol* 1987; 253:998-1005.

[210] Bushinsky DA, Goldring JM, Coe FL. Cellular contribution to pH-mediated calcium flux in neonatal mouse calvariae. *Am J Physiol* 1985; 253:F998-1005.

[211] Bushinsky DA. Net calcium efflux from live bone during chronic metabolic but not respiratory acidosis. *Am J Physiol* 1989; 256:836-842.

[212] Krieger NS, Sessler NE, Bushinsky DA. Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity *in vitro. Am J Physiol* 1992; 262:F442-F448.

[213] Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P, et al. Plasma insulin-like growth factor and bone formation parameters in predialysis chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1991; 17:153-159.

[214] Bichara M, Mercier O, Borensztein P, Paillard M. Acute metabolic acidosis enhances circulating parathyroid hormone, which contributes to the renal response against acidosis in the rat. *J Clin Invest* 1990; 86:430-443.

[215] Madias NE, Johns CA, Homer SM. Independence of the acute acid--buffering response from endogenous parathyroid hormone. *Am J Physiol* 1982; 243:F141-F149.

[216] Andress DL, Pandian MR, Endres DB, Kopp JB. Plasma insulin-like growth factors and bone formation in uremic hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1989; 36:471-477.

[217] Spencer EM, Liu CC, Si ECC, Howard GA. *In vivo* actions of insulin--like growth factor I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. *Bone* 1991; 12:21-26.

[218] Coles GA. Body composition in chronic renal failure. *Q J Med* 1972; 41:25-47.

[219] Delaporte C, Bergström J, Broyer M, Dartois AM. Variations in muscle cell protein of severely uremic children. *Kidney Int* 1976; 10:239-245.

[220] Kopple JD. Causes of catabolism and wasting in acute or chronic renal failure. In Nephrology, edited by Robinson RR, New York, Springer-Verlag 1984; 1498-1514.

[221] Mitch WE, Clark AS. Muscle protein turnover in uremia. *Kidney Int* 1982; 24 (suppl 16):S2-S8.

[222] Wassner SJ, Bergström J, Brusilow SW et al. Protein metabolism in renal failure: abnormalities and possible mechanisms. *Am J Kidney Dis* 1986, VII; 4:285-291.

[223] Garber AL. Skeletal muscle protein and amino acid metabolism in experimental chronic uremia in the rat. *J Clin Invest* 1978; 62:623-632.

[224] Harter HR, Davis TA, Karl IE. Enhenced muscle protein catabolism in uremia. *Adv Exp Med Biol* 1984; 167:557-569.

[225] Holliday MA, Chantler C, MacDonnell R, Keitges J. Effect of uremia on nutritionally-induced variations in protein metabolism. *Kidney Int* 1977; 11:236-245.

[226] Li JB, Wassner SJ. Muscle degradation in uremia: 3-methylhistidine release in fed and fasted rats. *Kidney Int* 1981; 20:321-325.[227] Li JB, Vassner SJ. Protein synthesis and degradation in skeletal muscle of chronically uremic rats. *Kidney Int* 1986; 29:1136-1143.

[228] Roullet JB, Lacour B, Yvert JP et al. Factors of increase in serum triglyceride-rich lipoproteins in uremic rats. *Kidney Int* 1985; 27:420--425.

[229] Williams AJ, Walls J. Body composition and dietary protein in experimental renal disease. Xth International Congress of Nephrology, London 1987; 523.

[230] Lyon DM, Dunlop DM, Stewart CP. The alkaline treatment of chronic nephritis. *Lancet* 1931; 2:1009-1113.

[231] Jenkin D, Burton PR, Bennett SE et al. The metabolic consequences of the correction of acidosis in uremia. *Nephrol Dial Transpl* 1989; 4:92-95.

[232] Papadoyannakis NJ, Stefanidis CJ, Geown MM. The effect of the correction of metabolic acidosis on nitrogen and potassium balance of patients with chronic renal failure. *Am J Clin Butr* 1984; 40:623-627.

[233] Hannaford MG, Leiter LA, Josse RG et al. Protein wasting due to acidosis of prolonged fasting. *Am J Physiol* 1982; 243:E-251-E256.

[234] Tizianello A, DE Ferri G, Garibotto G, Gurreri G. Effects of chronic renal insufficency and metabolic acidosis on glutamine metabolism in man. *Clin Sci Mol Med* 1978; 55:391-397.

[235] Young VR. The role of skeletal and cardiac muscle in the regulation of protein metabolism. In Mammalian Protein Metabolism Vol 4, Ch 40. Edited by Munro HN, New York and London: Academy Press 1970; 586-674.

[236] Reeds PJ, Haggarty P, Wahle KWJ, Fletcher JM. Tissue and whole-body protein synthesis in immature Zucker rats and their relationship to protein deposition. *Biochem J* 1982; 204:393-398.

[237] Millward DJ, Garlick PJ, Stewart JC et al. Skeletal muscle growth and protein turnover. *Biochem J* 1975; 150:235-243.[238] Rannels DE, Wartell SA, Watkins CA. The measurement of protein synthesis in biological systems. *Life Sci* 1982; 30:1679-1690.

[239] Millward DJ, Garlick PJ, James WPT et al. Relationship between protein synthesis and RNA content in skeletal muscle. *Nature* 1973; 241:204-205.

[240] Asatoor AM, Amstrong MD. 3-Methylhistidine. A component of actin. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 26:168-174.

[241] Rennie MJ, Millward DJ. 3-Methylhistidine excretion and the urinary 3-methylhistidine/creatinine ratio are poor indicators of skeletal muscle protein breakdown. *Clin Sci* 1983; 65:217-225.

[242] Reeds PJ, Palmer RM, Hay SM, McNurllan DN. Protein synthesis in skeletal muscle measured at different times during a 24 hour period. *Bioscience Reports* 1986; 6:209-213.

[243] Waterlow JC, Staphen JML. The effect of low protein diets on the turnover rates of serum, liver and muscle protein in rat, measured by continuous infusion of L-[14C]lysine. *Clin Sci* 1968; 35:287-305.

[244] Garlick PL, Millward DJ, James WPT. The diurnal response of muscle and liver protein synthesis *in vivo* in meal-fed rats. *Biochem J* 1975; 136:935-945.

[245] Li JB, Higgins EH, Jefferson LS. Changes in protein turnover in skeletal muscle in response to fasting. *Am J Physiol* 1979; 236(3):E222-E228.

[246] Lemonnier D, Alexiu A, Mackay S, Bourgion F. Rôle des facteurs nutritionnels dans les obesités expérimentales. *Journées de Diabétologie* 1978; 177-185.

[247] May RC, Kelly RA, Mitch WE. Metabolic acidosis stimulates protein degradation in rat muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. *J Clin Investt* 1986; 77:614-621.

[248] England BK, Chastain JL, Mitch WE. Abnormalities in protein synthesis and degradation induced by extracellular pH in BC_3H_1 myocytes. *Am J Physiol* 1991; 260:C277-C282.

[249] May RC, Hara Y, Kelly RA et al. Branched-chain, amino acid metabolism in rat muscle: Abnormal regulation in acidosis. *Am J Physiol* 1987; 252:E712-E718.

[250] May RC, Masud T, Logue B et al. Chronic metabolic acidosis accelerates whole body proteolysis and oxidation in awake rats. *Kidney Int* 1992; 41:1435-1542.

[251] Williams B, Layward E, Walls J. Skeletal muscle degradation and nitrogen wasting in rats with chronic metabolic acidosis. *Clin Sci* 1991; 80:457-462.

[252] Williams B, Hattersley J, Layward E, Walls J. Metabolic acidosis and skeletal muscle adaptation to low protein diets in chronic uremia. *Kidney Int* 1991; 40:779-786.

[253] Juskovitz C, England BK, Ebb R, Mitch WE. Protein degradation in LLCPK1 renal cells: role of glucocorticoids. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2:762.

[254] Garber AJ. Effects of parathyroid hormone on skeletal muscle protein and amino acid metabolism in rat. *J Clin Invest* 1983; 71:1806-1821.

[255] Li JB, Jefferson LS. Effect of isoproterenol on amino acid levels and protein turnover in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1977; 232:E243--E249.

[256] Chang TW, Goldberg AI. The origin of alanine produced in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1978; 253:3677-3684.

[257] Chang TW, Goldberg AI. The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1978; 253:3685-3695.

[258] Wassner SJ, Li JB. Lack of an acute effect of parathyroid hormone within skeletal muscle. *Int J Pediatr Nephrol* 1987; 8:15-20.

[259] Wassner SJ, Sperdoto A, Li JB. Vitamin D-deficiency, hypocalcemia and skeletal muscle degradation in rats. *J Clin Invest* 1983; 72:102--112.

[260] Jacob R, Barret E, Plewe G et al. Acute effects of insuline-like growth factor I on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. *J Clin Invest* 1989; 83:1717-1723.

[261] Martin AA, Thomas FM, Owens PC et al. IGF-1 and its variant, des-(1-3)IGF-1, enhance growth in rats with reduced renal mass. *Am J Physiol* 1991; 261:F626-F633.

[262] Tonshoff B, Mehls O, Heinrich U et al. Growth stimulating effects of recombinant human growth hormone in children with end-stage renal disease. *J Pediatr* 1990; 116:561-566.

[263] Samaan N, Freeman RM. Growth hormone levels in severe renal failure. *Metabolism* 1970; 19:102.

[264] Ward HC, Holliday D, Sim JW. Protein and energy metabolism with biosynthetic human growth hormone after gastrointestinal surgery. *Ann Surg* 1987; 206:56-61.

[265] Snyder DK, Underwood LE, Clermmons DR. Anabolic effects of growth hormone in obese diet-restricted subjects are dose-dependent. *Am J Clin Nutr* 1990; 52:431-437.

[266] Mehls O, Ritz E, Hunziker EB, Eggli P, Heinrich U, Zapf J. Improvement of growth and food utilization by human recombinant growth hormone in uremia. *Kidney Int* 1988; 33:45-52.