

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DA ACIDOSE METABÓLICA
SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DE
FRATURA ÓSSEA -
UM ESTUDO EXPERIMENTAL**

Eduardo Nilo Vasconcelos Novais

Belo Horizonte

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

**EFEITO DA ACIDOSE METABÓLICA SOBRE A
CONSOLIDAÇÃO DE FRATURA ÓSSEA –
UM ESTUDO EXPERIMENTAL**

Eduardo Nilo Vasconcelos Novais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências

da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais,

como requisito parcial para obtenção do grau Mestre.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientadora: Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Professora Adjunta do Departamento de Pediatria

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor da Universidade Federal de Minas Gerais

Professor Ronaldo Tadeu Pena

Vice-Reitor da Universidade Federal de Minas Gerais

Professora Heloísa Maria Murgel Starling

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Professor Jaime Arturo Ramirez

Pró-Reitor de Pesquisa

Professor Carlos Alberto Pereira Tavares

Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Professor Francisco José Pena

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Professor Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós Graduação

Professor Carlos Faria Santos Amaral

Sub-Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Professor João Lúcio dos Santos Júnior

Chefe do Departamento de Pediatria

Professora Cleonice de Carvalho Coelho Mota

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente**

Professor Joel Alves Lamounier

**Sub-coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde – Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente**

Professor Eduardo Araújo de Oliveira

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente**

Professor Joel Alves Lamounier

Professor Eduardo Araújo de Oliveira

Professor Ivani Novato Silva

Professor Francisco José Pena

Professor Marco Antônio Duarte

Professor Marcos Borato Viana

Professora Regina Lunardi Rocha

Professor Roberto Assis Ferreira

Miguir Terezinha Vieccelli Donoso (Rep. Discente – Titular)

AGRADECIMENTOS

Várias pessoas, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste estudo, em especial:

- Professora Ana Cristina Simões e Silva, minha orientadora, pelos ensinamentos, amizade, mas, sobretudo, por ter me guiado pelo caminho da iniciação científica e acadêmica.
- Luis Henrique Villela, meu contemporâneo de Residência Médica no HC-UFMG e amigo, pela colaboração na realização do protocolo experimental.
- Alunos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, inseridos no programa de iniciação científica, especialmente Guilherme Soares.
- Dr. Daniel Dias Ribeiro, hematologista do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais pela realização dos exames laboratoriais.
- Os meus colegas membros do Corpo Clínico do Serviço Especial de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Os funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, especialmente o senhor Marcelo.
- Meus pais, Aloísio e Nancy por estarem SEMPRE ao meu lado, em todas as circunstâncias.
- Minhas irmãs e irmãos: Dri, Léo, Mariane e Henrique.
- Rachel pelo amor, apoio e compreensão durante a realização deste trabalho

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRD – acidose tubular renal distal

IRC – insuficiência renal crônica

ATR – acidose tubular renal

GH – growth hormone

IGF-1 – insulin-like growth factor type 1

AC – grupo acidótico

C – grupo controle

NH₄Cl 4% – Solução de cloreto de amônia à 4%

1,25-(OH)₂D – vitamina D

PTH – paratormônio

Ca₁₀(PO₄)₆OH₂ – cristais de hidroxiapatita

Eq/L – equivalente por litro

mEq/kg – mili-equivalente por kilograma

pH – potencial hidrogeniônico

H⁺ – íons hidrogênio

RNA – ribonucleic acid

PGE₂ – prostaglandina tipo 2

RANK – osteoclastic cell surface receptor

RANKL – ligand expressed by osteoblasts

HCO₃⁻ – bicarbonate

GH – hormônio de crescimento

MA – metabolic acidosis

RTA – renal tubular acidosis

CRD – chronic renal disease

pCO₂ – partial pressure of carbonic gas

ETF – exact test of Fisher

mEq/L – mili-equivalente por litro

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

UGMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 – Introdução	09
2 – Revisão da Literatura	09
<i>Artigo: Efeitos da Acidose Metabólica sobre o Tecido Ósseo: evidências clínicas e experimentais.</i>	
3 – Objetivos	09
4 – Materiais e Métodos	09
4.1 – Materiais	09
4.1.1 – Animais	09
4.1.2 – Grupos Experimentais	09
4.2 – Métodos	09
4.2.1 – Protocolo Experimental	09
4.2.2 – Análise Radiográfica da consolidação	09
4.2.3 – Análise Histológica da consolidação	09
4.2.4 – Análise Estatística	09
4.2.5 – Aspectos Éticos	09
5 – Resultados e Discussão	09
<i>Artigo: Effects of Metabolic Acidosis on fracture healing: an experimental study</i>	
6 – Comentários Finais	
7 – Anexos	

1 – INTRODUÇÃO

Esta dissertação de Mestrado está inserida em uma nova linha de pesquisa que envolve o estudo da interação entre rim e osso, mais especificamente, os efeitos da acidose metabólica sobre o tecido ósseo e a participação do osso no sistema de tamponamento do equilíbrio ácido-básico. Durante a fase inicial do desenvolvimento dessa linha de pesquisa, estabelecemos um modelo experimental de acidose metabólica crônica para posterior estudo da consolidação de fratura óssea nessa condição de desequilíbrio ácido-básico. Vale ressaltar que a acidose metabólica crônica está presente em uma série de doenças que acometem a faixa etária pediátrica, tais como as acidoses tubulares renais e as diversas formas de insuficiência renal crônica (1-10). Tais enfermidades cursam normalmente com deformidades angulares e torcionais dos ossos dos membros inferiores, cujo tratamento, algumas vezes, envolve cirurgia ortopédica através de múltiplas osteotomias (11-16). Além disso, fraturas patológicas podem estar presentes nessas doenças. Dessa forma, fica clara a importância do entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da consolidação óssea de uma fratura em um paciente portador de doença osteometabólica que cursa com acidose. No entanto, os dados da literatura são muito restritos nesse sentido. A maior parte dos estudos é realizada *in vitro* e apresenta maior ênfase na avaliação do papel do tecido ósseo como tampão da homeostase ácido-básica e nos efeitos da acidose sobre a constituição óssea (4, 9, 17-31). O presente estudo é o primeiro que avalia, utilizando um modelo experimental *in vivo*, a consolidação de uma fratura óssea em presença de acidose metabólica crônica.

A acidose metabólica crônica, definida como um estado de excesso de ácidos não voláteis no organismo, pode ocorrer por produção aumentada desses ou por uma diminuição na sua remoção pelos mecanismos homeostáticos. Esse distúrbio provoca importantes alterações no metabolismo ósseo (7, 9, 20, 32-34). O esqueleto, além de sua função estrutural, apresenta importante papel no tamponamento de ácidos não voláteis. Os efeitos da acidose metabólica no tecido ósseo são decorrentes de ação fisicoquímica direta, além de haver respostas mediadas por células. A acidose estimula a atividade dos osteoclastos, inibe a atividade de osteoblastos e diminui a mineralização óssea (18, 32, 34, 35). Durante a acidose metabólica crônica, a formação de tecido ósseo mineralizado está comprometida, além de haver um maior estímulo para sua reabsorção. Paralelamente, existe ainda, aumento na excreção renal de cálcio e fosfato, provocando um balanço negativo desses minerais no organismo e alterando ainda mais a mineralização óssea (9, 18, 24, 29, 32, 34, 35). Em estados acidêmicos de longa duração, ocorre degradação músculo protéica e comprometimento do crescimento (5, 33, 36). Inúmeras condições clínicas cursam com acúmulo de ácidos não voláteis no organismo, como a acidose tubular renal distal (ATRD), a insuficiência renal crônica (IRC), o processo de envelhecimento, situações envolvendo perdas gastrointestinais de bicarbonato e excesso de ingestão protéica na dieta.

Os efeitos da acidose sobre o metabolismo ósseo têm sido amplamente discutidos na literatura, assim como o processo de consolidação de uma fratura óssea. Novos conceitos celulares e biomoleculares da consolidação óssea têm sido estabelecidos (37, 38). No entanto, não existe, até o presente momento, uma definição clara do que ocorre na consolidação de fraturas em presença de acidose crônica. Dessa forma, o objetivo

principal deste estudo foi avaliar os efeitos da acidose metabólica crônica sobre a consolidação de fraturas.

Vale mencionar que essa linha de pesquisa já produziu, até o momento, a apresentação dos dados como pôster no World Congress of Nephrology (Berlin 2003) (39, 40) e no XLI Congress of European Renal Association (Lisboa 2004), além de ter sido apresentado como tema livre no VII Congresso Brasileiro de Ortopedia Pediátrica (Vitória 2006).

Finalmente, é importante explicar que esta dissertação de Mestrado foi elaborada conforme o modelo aprovado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente, que permite sua confecção no formato de artigos científicos a serem submetidos a revistas médicas. Sendo assim, a estruturação do trabalho seguiu os itens abaixo:

- 1- Seção de Introdução
- 2- Seção de “Revisão da Literatura” apresentada sob a forma do artigo: *Efeitos da Acidose Metabólica sobre o Tecido Ósseo: evidências clínicas e experimentais* (artigo a ser submetido para o periódico Acta Ortopédica Brasileira)
- 3- Seção de Objetivos
- 4- Seção de Metodologia
- 5- Seção de “Resultados e Discussão” apresentada sob a forma do artigo *Effects of Metabolic Acidosis on fracture healing: an experimental study* (artigo submetido para o periódico Journal of Bone and Mineral Metabolism)
- 5- Seção de Comentários Finais

Obs: As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou de cada seção. As referências dos artigos seguem as normas de cada periódico específico para o qual o mesmo foi submetido. As referências listadas no final das seções estão dispostas em ordem de citação e seguem as normas de Vancouver.

Referências Bibliográficas

1. Bushinsky DA. The contribution of acidosis to renal osteodystrophy. *Kidney Int* 1995;47(6):1816-32.
2. Wiederkehr M, Krapf R. Metabolic and endocrine effects of metabolic acidosis in humans. *Swiss Med Wkly* 2001;131(9-10):127-32.
3. Boirie Y, Broyer M, Gagnadoux MF, Niaudet P, Bresson JL. Alterations of protein metabolism by metabolic acidosis in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 2000;58(1):236-41.
4. Kraut JA. Disturbances of acid-base balance and bone disease in end-stage renal disease. *Semin Dial* 2000;13(4):261-6.
5. Dabbagh S. Renal osteodystrophy. *Curr Opin Pediatr* 1998;10(2):190-6.
6. Weger W, Kotanko P, Weger M, Deutschmann H, Skrabal F. Prevalence and characterization of renal tubular acidosis in patients with osteopenia and osteoporosis and in non-porotic controls. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(7):975-80.
7. Domrongkitchaiporn S, Pongsakul C, Stitchantrakul W, Sirikulchayanonta V, Ongphiphadhanakul B, Radinahamed P, et al. Bone mineral density and histology in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2001;59(3):1086-93.

8. Domrongkitchaiporn S, Pongskul C, Sirikulchayanonta V, Stitchantrakul W, Leeprasert V, Ongphiphadhanakul B, et al. Bone histology and bone mineral density after correction of acidosis in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2002;62(6):2160-6.
9. 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(5):694-700.
10. Kraut JA, Kurtz I. Metabolic acidosis of CKD: diagnosis, clinical characteristics, and treatment. *Am J Kidney Dis* 2005;45(6):978-93.
11. Novais E SPM. Hypophosphatemic rickets: the role of hemiepiphysiodesis. *J Pediatr Orthop* 2006;26(2):238-244.
12. Kanel JS, Price CT. Unilateral external fixation for corrective osteotomies in patients with hypophosphatemic rickets. *J Pediatr Orthop* 1995;15(2):232-5.
13. Omoloja AA, Kumar K, Crawford AH, Strife CF. Epiphyseal stapling and recombinant human growth hormone for correction of genu valgum in children with chronic renal insufficiency. *J Pediatr Orthop* 2003;23(5):639-42.
14. Oppenheim WL, Fischer SR, Salusky IB. Surgical correction of angular deformity of the knee in children with renal osteodystrophy. *J Pediatr Orthop* 1997;17(1):41-9.
15. Davids JR, Fisher R, Lum G, Von Glinski S. Angular deformity of the lower extremity in children with renal osteodystrophy. *J Pediatr Orthop* 1992;12(3):291-9.
16. Stickler GB, Morgenstern BZ. Hypophosphataemic rickets: final height and clinical symptoms in adults. *Lancet* 1989;2(8668):902-5.
17. Bushinsky DA. Net calcium efflux from live bone during chronic metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol* 1989;256(5 Pt 2):F836-42.

18. Bushinsky DA. Stimulated osteoclastic and suppressed osteoblastic activity in metabolic but not respiratory acidosis. *Am J Physiol* 1995;268(1 Pt 1):C80-8.
19. Bushinsky DA, Favus MJ, Schneider AB, Sen PK, Sherwood LM, Coe FL. Effects of metabolic acidosis on PTH and 1,25(OH)₂D₃ response to low calcium diet. *Am J Physiol* 1982;243(6):F570-5.
20. Bushinsky DA, Frick KK. The effects of acid on bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9(4):369-79.
21. Disthabanchong S, Martin KJ, McConkey CL, Gonzalez EA. Metabolic acidosis up-regulates PTH/PTHrP receptors in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Kidney Int* 2002;62(4):1171-7.
22. Frick KK, Bushinsky DA. In vitro metabolic and respiratory acidosis selectively inhibit osteoblastic matrix gene expression. *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 2):F750-5.
23. Frick KK, Bushinsky DA. Metabolic acidosis stimulates RANKL RNA expression in bone through a cyclo-oxygenase-dependent mechanism. *J Bone Miner Res* 2003;18(7):1317-25.
24. Frick KK, Jiang L, Bushinsky DA. Acute metabolic acidosis inhibits the induction of osteoblastic egr-1 and type 1 collagen. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):C1450-6.
25. Green J, Goldberg R, Maor G. PTH ameliorates acidosis-induced adverse effects in skeletal growth centers: the PTH-IGF-I axis. *Kidney Int* 2003;63(2):487-500.
26. Green J, Maor G. Effect of metabolic acidosis on the growth hormone/IGF-I endocrine axis in skeletal growth centers. *Kidney Int* 2000;57(6):2258-67.
27. Jara A, Felsenfeld AJ, Bover J, Kleeman CR. Chronic metabolic acidosis in azotemic rats on a high-phosphate diet halts the progression of renal disease. *Kidney Int* 2000;58(3):1023-32.

28. Jara A, Chacon C, Valdivieso A, Ibaceta M. [Effect of PTH, phosphate, and metabolic acidosis on the progression of renal insufficiency in the azotemic rat]. *Nefrologia* 2003;23 Suppl 2:37-42.
29. Kraut JA. The role of metabolic acidosis in the pathogenesis of renal osteodystrophy. *Adv Ren Replace Ther* 1995;2(1):40-51.
30. Kraut JA, Gordon EM, Ransom JC, Coburn JW, Kurokawa K. The effect of chronic metabolic acidosis on the end organ responsiveness to parathyroid hormone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56(3):619-22.
31. Kraut JA, Gordon EM, Ransom JC, Horst R, Slatopolsky E, Coburn JW, et al. Effect of chronic metabolic acidosis on vitamin D metabolism in humans. *Kidney Int* 1983;24(5):644-8.
32. Alpern RJ, Sakhaee K. The clinical spectrum of chronic metabolic acidosis: homeostatic mechanisms produce significant morbidity. *Am J Kidney Dis* 1997;29(2):291-302.
33. Franch HA, Mitch WE. Catabolism in uremia: the impact of metabolic acidosis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(12 Suppl):S78-81.
34. Bushinsky DA. Acidosis and bone. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20(1-2):40-52.
35. Bushinsky DA, Ori Y. Effects of metabolic and respiratory acidosis on bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993;2(4):588-96.
36. Dzurik R, Spustova V. [Nephrogenic metabolic acidosis]. *Vnitr Lek* 2003;49(5):370-3.
37. Frassetto LA, Todd KM, Morris RC, Jr., Sebastian A. Estimation of net endogenous noncarbonic acid production in humans from diet potassium and protein contents. *Am J Clin Nutr* 1998;68(3):576-83.

38. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005;19(10 Suppl):S4-6.
39. Novais; Eduarodo Nilo; Villela LH CJ, Lucio H; Saviato Célia; Simões e Silva, Ana Cristina. The effects of metabolic acidosis on the fracture repair: an experimental study in rats. In: *World Congress of Nephrology; 2003; Berlim; 2003.* p. 412.
40. Simões e Silva ACP, Regina Maria; Novais, Eduardo Nilo Vasconcelos. The impact of chronic acidemia in bone repair: an experimental study. In: *XLI Congress of European Renal Association; 2004; Lisboa; 2004.* p. 320.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

Artigo de Revisão

Efeitos da Acidose Metabólica sobre o Tecido Ósseo: evidências clínicas e experimentais.

Eduardo V. Novais ¹; Regina Maria Pereira ² , Guilherme G Soares³; Diogo Lago Martins³ ; Ana C. Simões e Silva, PhD ⁴

¹ Mestrando em Saúde da Criança e do Adolescente pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

² Doutora em Saúde da Criança e do Adolescente pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Professora Assistente do Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Belo Horizonte – UNIBH.

³ Alunos de iniciação científica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

⁴ Doutora em Pediatria, Professora Adjunta do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Correspondência para Eduardo Vasconcelos Novais

Endereço: Rua Passatempo, 342, ap. 300. Bairro Sion (30310-760)

Belo Horizonte – MG – Brasil. Tel: 55 – 31 – 3225 – 6397

Email: eduardonilo@hotmail.com

Resumo

A acidose metabólica é considerada um componente comum a diversas doenças. Inúmeros estudos descreveram a participação do tecido ósseo na manutenção da homeostase ácido-básica. Entretanto, os efeitos do tamponamento ósseo sobre o osso propriamente dito não estão bem estabelecidos. A acidose metabólica altera a composição do osso através de ação físico-química direta, além de estimular a reabsorção óssea mediada por células. Este artigo revisa algumas evidências experimentais e clínicas sobre a participação do osso como sistema de tamponamento dos distúrbios do equilíbrio ácido-básico. Os efeitos que o osso, agindo como tampão, exerce sobre sua própria composição celular e estrutura também são discutidos.

Palavras-chave: equilíbrio ácido-básico, consolidação de fratura, osso, acidose metabólica, osso, doença osteometabólica.

Abstract

Metabolic acidosis is considered a common component of many diseases. A series of studies have described the role of bone on the acid base homeostasis. However the effects of bone buffering on the bone itself is not well established. Metabolic acidosis alters bone composition either through the dissolution of bone mineral directly or by the stimulation of cell-mediated bone resorption. This article revises experimental and clinical evidence of the role of bone as a buffering system. The effects of bone, acting as a buffer, on its own cellular and structural composition are also a matter of discussion.

Key-words: acid-base imbalance, fracture healing, metabolic bone diseases, acidosis, bone

Introdução

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo que em conjunto com a cartilagem compõe o sistema esquelético. O tecido ósseo apresenta, além da função estrutural, um importante papel no equilíbrio metabólico, servindo como reserva iônica (1,2). Microscopicamente o tecido ósseo pode ser dividido em porção orgânica (20-40%) e porção mineral (40-50%), além de água e lípidos. A parte orgânica do osso é formada pelas células ósseas e por uma matriz orgânica extracelular. Basicamente são três as células ósseas: o osteoblasto, responsável pela síntese de matriz orgânica (osteóide), o osteócito, que corresponde ao osteoblasto embebido em matriz óssea calcificada e o osteoclasto, responsável pelo processo de reabsorção óssea (1). A matriz extracelular é composta principalmente por colágeno (90% tipo I) e outras proteínas como a osteocalcina e osteonectina. A porção mineral do osso é formada de cristais de hidroxiapatita $[(Ca_{10}(PO_4)_6OH_2)]$, na qual os cátions sódio, potássio e magnésio podem substituir o cálcio e o ânion bicarbonato pode substituir o fosfato ou a hidroxila (1). Cerca de 90% do cálcio corpóreo e, pelo menos 80% do carbonato estão contidos na fase mineral do tecido ósseo (2).

A homeostase ácido-básica é mantida por um conjunto de sistemas tampões (incluindo o osso) que mantém constante o nível de hidrogênio livre no sangue, em torno de 3.98×10^{-8} Eq/L (correspondente ao pH de 7.4) (3). Em alguns tipos de doenças crônicas, os sistemas de tamponamento podem ser insuficientes para a manutenção prolongada do pH dentro dos limites de normalidade. Dessa forma, são necessários mecanismos compensatórios que desencadeiam alterações fisiológicas principalmente nos pulmões e nos rins. Em condições normais, o principal regulador do equilíbrio ácido-

básico é o rim. Basicamente duas funções renais são cruciais: a reabsorção de bicarbonato nos túbulos proximais e a excreção de ácido equivalente à produção diária de ácidos não voláteis no néfron distal (4, 5).

A acidose metabólica é produzida por um desequilíbrio entre a produção e a excreção de ácido, resultando em aumento da concentração de íon hidrogênio. A acidose pode ser, então, secundária à acúmulo resultante de aumento da ingestão de uma fonte externa ou por aumento na produção endógena de ácido. Ocorre também por excreção inadequada de hidrogênio ou por perda excessiva de bicarbonato na urina ou fezes (3).

Como consequência da dieta rica em proteína, de modo geral, o metabolismo humano gera aproximadamente 1 mEq/kg de ácido que precisa ser eliminado, primariamente por mecanismos renais, para a manutenção da homeostase ácido-básica (6). Na insuficiência renal, a excreção da produção diária de ácido é menos eficaz. Além disso, várias doenças cursam com aumento da produção de ácido que supera a capacidade de eliminação renal. Com o processo de envelhecimento, ocorre uma diminuição global da função renal; dessa forma, pode surgir no indivíduo idoso acidose metabólica crônica, que é pouco evidente pela gasometria, mas apresenta significativas repercussões clínicas e metabólicas (7). Nesse cenário, a acidose precisa ser compensada por mecanismos independentes do rim, através, sobretudo, de tamponamento pelo osso. Existe suficiente evidência experimental e clínica do papel do tecido ósseo como potente tampão do íon hidrogênio, capaz de reestabelecer o valor do pH para os níveis fisiológicos (8-44). O objetivo deste artigo é revisar a literatura médica sobre as evidências experimentais e clínicas dos efeitos que a acidose metabólica exerce sobre o osso, além de discutir como a função de tamponamento de ácidos é capaz de interferir com o metabolismo e a estrutura do osso.

Evidências Experimentais dos Efeitos da Acidose Metabólica sobre o Osso

Acidose Metabólica e Liberação de Cálcio pelo Tecido Ósseo

O aumento da concentração de íons hidrogênio (H^+) no fluido extracelular promove redução do conteúdo mineral do osso, inicialmente através de alterações sobre fatores físico-químicos que regulam a deposição e reabsorção do mineral ósseo e, posteriormente por mecanismos mediados por células (16, 18, 19, 28, 30, 31, 36, 39, 45, 46).

A acidose metabólica contribui diretamente para um balanço negativo de cálcio, devido ao aumento da excreção renal, secundária à redução da reabsorção tubular, sem alteração na absorção intestinal de cálcio (47-49). Mais de 90% do conteúdo de cálcio é encontrado na fase mineral do tecido ósseo, sugerindo que o osso é a fonte de cálcio excretado na urina (2).

Desde a década de 50, foram acumuladas evidências de que a acidose metabólica estimularia a perda de cálcio pelo osso (50). Apenas recentemente, no entanto, estudos *in vitro* comprovaram que essa perda ocorre inicialmente por ação físico-química direta no osso e, posteriormente, através de mecanismos mediados por células (3, 15, 17-23, 25, 40, 41, 47, 51-60).

Bushinsky et al. (23) desenvolveram um modelo experimental de cultura de células de ossos do crânio de ratos recém nascidos, através do qual é possível simular efeitos de alterações do pH do meio sobre o tecido ósseo. Em ensaio experimental que simula acidose aguda, ocorreu um efluxo de cálcio do osso craniano para o meio ácido,

que foi produzido a partir da redução da concentração de íons bicarbonato. Outro modelo experimental, que utilizou discos de hidroxiapatita incubados em meio ácido, corrobora o mecanismo de dissolução físico-química induzida por prótons, evidenciando que nesse período de acidose aguda não ocorre reabsorção de cálcio mediada por células (40, 61, 62). Ressalta-se ainda que o componente mineral do osso em equilíbrio com o meio e susceptível à ação físico-química inicial dos ácidos parece ser os compostos de associado ao carbonato e não ao fosfato (24, 54).

A reabsorção óssea mediada por células predomina em resposta à acidose metabólica crônica em modelos experimentais (16, 18, 19, 39). A perda óssea de cálcio resulta da inibição da atividade do osteoblasto e do estímulo para atividade do osteoclasto (16, 17, 31-34, 41, 59, 63). A liberação de β -glucuronidase, uma enzima que indica atividade do osteoclasto, é estimulada, enquanto a síntese de colágeno e a atividade da fosfatase alcalina são reduzidas pela acidose metabólica (41). O meio ácido aumenta áreas de reabsorção óssea mediada por células em cultura de tecidos e em estudos analisando osteoclastos em fatias de fêmur bovino (64). A acidose estimula a reabsorção óssea mediada por células independentemente da ação do paratormônio (65, 66). No entanto, a combinação de acidose e ações do paratormônio apresentam efeito aditivo sobre a reabsorção óssea mediada por células (67, 68).

A acidose metabólica altera padrões específicos de expressão gênica das células ósseas (23, 29, 32). Em resposta à redução do pH do meio de imersão de células de crânio de ratos recém nascidos, ocorre uma redução paralela no estímulo do gene *egr-1* além de diminuição da síntese de RNA do colágeno tipo I, importante genes para a função do osteoblasto (34). Em cultura de células ósseas, a acidose inibe a expressão do RNA da osteopontina, sem alterar, todavia, a expressão de outras proteínas como a osteonectina

(31). A atividade do osteoclasto é mediada por múltiplos fatores que são expressos pelo osteoblasto. A acidose metabólica estimula a produção osteoblástica de prostaglandina (PGE_2), que sabidamente tem ação de estimular a reabsorção óssea pelo osteoclasto (25, 40, 69). Uma proteína presente na superfície celular do osteoblasto (RANKL) interage com o receptor RANK, presente na superfície do osteoclasto e de suas células precursoras. A interação entre RANKL com RANK, estimula a diferenciação das células precursoras em osteoclastos maduros (70-72). Em cultura de células ósseas, em meio ácido, ocorre aumento do RNA da RANKL, o que favorece um aumento da reabsorção óssea mediada pelo osteoclasto (33). A acidose metabólica estimula ainda a resposta de receptores para o paratormônio em células de linhagem osteoblástica, um fator adicional que explica a reabsorção óssea (27).

O Tecido Ósseo como Tampão de Íons Hidrogênio na Acidose Metabólica

O tecido ósseo responde ao aumento da concentração de hidrogênio não apenas com efluxo de cálcio, mas atuando com mecanismo de tampão iônico; dessa forma, colaborando para reestabelecer o equilíbrio ácido-básico. (19, 21)

Lemann et al. (44, 73), em uma série de estudos, avaliaram os efeitos da dieta em três grupos de pacientes que receberam dieta protéica, dieta contendo cloreto de amônio e dieta à base de carbonato de sódio. Os autores demonstraram aumento da excreção renal de cálcio no grupo de dieta protéica e no grupo que recebeu cloreto de amônio. Nesses pacientes com sobrecarga ácida à custa do cloreto de amônio, os estudos mostraram que a maior parte do ácido ficou retida, o que foi evidenciado pela redução dos níveis de bicarbonato. A correlação entre os íons de hidrogênio retidos e o cálcio excretado pela

urina sugere que o tecido ósseo funciona não só como armazenador do excesso de íons hidrogênio, tamponando o bicarbonato plasmático, mas também como fonte de cálcio para a excreção urinária.

O tamponamento de íons hidrogênio pelo osso foi demonstrado *in vitro* através da entrada (influxo) de íons hidrogênio no tecido ósseo concomitante à saída (efluxo) de sódio e carbonato em resposta a uma sobrecarga ácida. A perda de sódio pelo osso provavelmente ocorre por um mecanismo de troca de prótons, enquanto a perda de carbonato sugere consumo desse agente tampão para compensar o excesso de prótons (14, 15, 18, 23, 24, 26, 51, 53, 54, 56, 74).

O osso, cuja superfície apresenta sítios negativos que podem formar complexos com sódio, potássio ou hidrogênio, é um reservatório de sódio e potássio. Estudos utilizando micro-sondas de alta resolução mostram que, após incubação em meio ácido, ocorre uma redução no conteúdo de sódio e potássio da superfície celular em relação ao conteúdo de cálcio, além de tamponamento do excesso de íons hidrogênio do meio, sugerindo que os prótons, mais especificamente o sódio e o potássio, são intercambiáveis com o hidrogênio (20, 75, 76).

O tecido ósseo armazena pelo menos 80% do total de dióxido de carbono do organismo, sendo dois terços sob a forma de complexos de carbonato (CO_3^{2-}) com vários cátions como o hidrogênio (HCO_3^-), cálcio, potássio e sódio, localizados nos cristais ósseos inacessíveis à circulação sistêmica. O terço restante, no entanto, está localizado na superfície hidratada dos cristais de hidroxiapatita, local de fácil acesso para a circulação sistêmica. A acidose metabólica aguda provoca redução no conteúdo ósseo de carbonato e de fosfato, contribuindo para o tamponamento do excesso de hidrogênio do meio (55, 77).

Evidências Clínicas dos Efeitos da Acidose Metabólica sobre o Osso

A acidose metabólica pode estar presente em uma série de doenças renais (3, 11, 16, 18, 19, 21, 30, 36, 37, 46, 47, 78-81). No entanto, também pode ser encontrada em estados fisiológicos relacionados à ingestão elevada de proteína na dieta e durante o processo de envelhecimento (7, 11, 78).

Diariamente, o metabolismo das proteínas encontradas na dieta humana origina ácidos não voláteis que precisam ser excretados para a manutenção da homeostase ácido-básica (7, 11, 16, 19, 78). Em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), ocorre uma redução na excreção urinária e um conseqüente balanço positivo de ácidos (18, 19, 30, 47). Se o par ácido-básico constituído pelo ácido carbônico e o bicarbonato fosse o único sistema tampão do fluido extracelular, ocorreria um consumo progressivo do bicarbonato, reduzindo de forma drástica seus níveis séricos. No entanto, durante o período inicial da insuficiência renal crônica, os níveis de bicarbonato e o pH se mantêm estáveis e dentro dos limites da normalidade, sugerindo a participação ativa de outros sistemas tampões, uma vez que a produção endógena de ácido também é mantida (18, 19, 30, 47). Além disso, os níveis de carbonato e cálcio do osso de pacientes portadores de IRC estão, em geral, reduzidos (18, 19). Dessa forma, acredita-se que o tecido ósseo atue como um importante sistema tampão para o excesso de íons hidrogênio presente na IRC (16, 36, 38).

A doença óssea associada à IRC é coletivamente denominada de osteodistrofia renal e pode-se manifestar através das seguintes formas clínicas: osteíte fibrosa relacionada ao hiperparatireoidismo, osteomalácia, doença óssea adinâmica e

osteodistrofia mista (82). A osteíte fibrosa é reconhecida como uma doença de acentuado remodelamento (*turnover*) ósseo, na qual ocorre um aumento no número e na atividade de osteoblastos, favorecendo a reabsorção óssea. Na osteomalacia encontra-se defeito na mineralização da matriz óssea, com acúmulo de osteóide. Vários mecanismos corroboram para a etiologia desses distúrbios ósseos na IRC, especialmente diminuição no fosfato excretado na urina com hiperfosfatemia sérica e redução nos níveis de vitamina D, que promovem aumento nos níveis de paratormônio, um dos fatores responsáveis pela maior reabsorção óssea. Conforme já mencionado, a acidose metabólica, presente na IRC, também pode causar dissolução físico-química primária do tecido ósseo, além de estimular a ação do osteoclasto e inibição de osteoblastos, contribuindo de maneira significativa para o aparecimento da osteodistrofia renal (18, 19, 30, 39, 41). Mesmo que a acidose metabólica não seja o mecanismo isolado responsável pela doença óssea na IRC, sua correção parece contribuir significativamente para a cura das lesões ósseas (37).

A acidose metabólica é um componente fundamental de um grupo de doenças tubulares renais denominadas em conjunto de Acidose Tubular Renal (ATR). Nos diferentes tipos de ATR pode ocorrer tanto uma redução na capacidade de reabsorção tubular proximal de bicarbonato, caracterizando a ATR do tipo 2 ou proximal; quanto um comprometimento na excreção distal de íons hidrogênio, no caso da ATR do tipo 1 ou distal (26, 27, 77-79). As diferentes formas de ATR Distal estão muito associadas com retardo do crescimento, redução de massa óssea, dor óssea, metabolismo ósseo alterado, deformidades esqueléticas e fraturas patológicas (28). A correção da acidose metabólica nesses casos melhora substancialmente a redução da massa óssea, a atividade celular óssea e possibilita melhora clínica dos pacientes, inclusive com restabelecimento do crescimento esquelético (29, 83). Além disso, é importante mencionar que formas

incompletas de ATR distal tem sido encontradas em pacientes com osteoporose primária (80, 81).

Efeitos da acidose metabólica sobre o crescimento

O retardo do crescimento é comum em pacientes portadores de IRC e nas diferentes formas de ATR. A desnutrição protéica é um fator importante para o impedimento do crescimento em pacientes azotêmicos (84). Adicionalmente, a acidose metabólica está diretamente envolvida na fisiopatologia da desnutrição protéica em crianças portadoras de IRC (85).

Além de promover o catabolismo protéico, a acidose metabólica exerce um efeito anti-anabólico nos centros de crescimento ósseo, relacionado parcialmente a um estado de resistência ao hormônio de crescimento (GH) e ao fator de crescimento *insulina-like-1* (IGF-1) (86-88). O crescimento longitudinal de um osso se dá pelo processo de ossificação endocondral, que também é essencial para o reparo de fraturas ósseas. A acidose metabólica exerce efeito negativo sobre o processo de ossificação endocondral nas placas epifisárias e, dessa forma, contribui para o retardo do crescimento nesses pacientes, que pode ser revertido através da terapia de reposição alcalina (89).

Acidose Metabólica, Dieta e Envelhecimento – Uma hipótese para a Osteoporose

No mundo ocidental, a dieta rica em proteínas é uma fonte de sobrecarga ácida, estimada em 50-100 mmol por dia. A dieta baseada em proteína animal tem relação direta com calciúria, formação de cálculos renais, diminuição de massa óssea na região do colo

do fêmur e aumento da incidência de fraturas do quadril (90-93). Um estado de leve acidemia crônica, mantido ao longo dos anos pela sobrecarga ácida, favorece a redução de massa óssea, podendo aumentar o risco de fraturas relacionadas à osteoporose (11, 19).

Algumas complicações relacionadas à acidose metabólica crônica estão presentes durante o processo de envelhecimento do organismo humano, o que sugere uma conexão entre acidemia subclínica e osteoporose (11, 30). Durante o processo de envelhecimento, ocorre uma diminuição global na função renal, incluindo uma redução na capacidade de excreção de ácidos (7, 78). Acredita-se que a diminuição da excreção de ácidos pelos rins com o envelhecimento associada à contínua ingestão de sobrecarga ácida na dieta resultem em indivíduos idosos numa acidemia subclínica (níveis normais ou muito discretamente reduzidos de pH e bicarbonato), porém acompanhada de acidose intracelular evidente (7, 19, 78, 94). Existe ainda pouca evidência clínica corroborando essa hipótese. No entanto, indivíduos idosos, ainda que possuam concentração sérica normal do bicarbonato, apresentam melhora significativa no balanço de cálcio e nitrogênio quando submetidos à terapia de suplementação alcalina (30, 95, 96).

Sebastian et al. (95) investigaram o efeito da produção endógena de ácido sobre os ossos. Dezoito mulheres em idade pós-menopausa foram mantidas com uma dieta padrão associada à suplementação de bicarbonato de potássio para neutralizar a produção endógena de ácido. Os autores comprovaram que a administração de álcalis resultou em redução da excreção urinária de cálcio, fosfato e hidroxiprolina (um marcador de catabolismo ósseo), além de melhora no balanço total do cálcio. Houve também aumento na excreção de osteocalcina, um marcador de formação óssea pelo osteoblasto. Esse e

outros estudos corroboram o papel da acidose no desenvolvimento de osteoporose em indivíduos com função renal normal (30, 39, 96).

Considerações finais

A acidose metabólica exerce um importante efeito sobre o tecido ósseo. Em última instância, o mecanismo de tamponamento pelo tecido ósseo diminui a magnitude de queda do pH e dos níveis séricos de bicarbonato na acidose metabólica. Inicialmente, ocorre dissolução físico-química com intercâmbio de sódio e potássio por hidrogênio e perda de carbonato e cálcio da superfície mineral do osso. A continuação do processo ocorre pelo estímulo de reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e pela inibição da formação de tecido ósseo pelos osteoblastos. A reabsorção óssea promove maior liberação de cálcio e de compostos que atuam como tampões tais como o carbonato e o fosfato.

O impacto clínico da participação do tecido ósseo no controle da homeostase ácido básica é evidente em doenças que comprometem a habilidade renal de excreção de ácidos e durante o processo de envelhecimento associado com dieta rica em proteína animal. Os efeitos diretos da acidose metabólica sobre a consolidação de fraturas ou osteotomias de ossos longos no tratamento de deformidades associadas à essas doenças precisa ainda ser melhor investigado.

Referências

1. Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop Relat Res* 1985(200):87-99.
2. Widdowson EM MR, Spray CM:. The chemical composition of the human body. *Clin Sci* 1951;10:113-125.
3. Bushinsky D. Metabolic Acidosis. In: Jacobson HR SG, Klahr S, editor. *The principles and practice of nephrology*. St. Louis, MO: Mosby; 1995. p. 924-932.
4. Simões e Silva AC. Distúrbios do equilíbrio ácido-básico na infância. In: Simões e Silva ACN, Rocksane C; Mota Joaquim Antônio C; Penna, Francisco, editor. *Manual de Urgências em Pediatria*. 1 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003. p. 41-49.
5. Simões e Silva ACS, Marcelo Ferraz de Oliveira; Lima Cristina J Crossara Ayres. Acidose Tubular Renal em Pediatria. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 2006;"no prelo".
6. Kurtz I, Maher T, Hulter HN, Schambelan M, Sebastian A. Effect of diet on plasma acid-base composition in normal humans. *Kidney Int* 1983;24(5):670-80.
7. Frassetto L, Sebastian A. Age and systemic acid-base equilibrium: analysis of published data. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996;51(1):B91-9.
8. Adamovich K, Sulyok E, Guignard JP. Effects of NH₄Cl metabolic acidosis on proximal and distal tubular sodium reabsorption in newborn infants. *Biol Neonate* 1991;60(3-4):193-200.
9. Alleyne GA. Renal metabolic response to acid-base changes. II. The early effects of metabolic acidosis on renal metabolism in the rat. *J Clin Invest* 1970;49(5):943-51.
10. Alleyne GA, Fraser HS, Besterman HS. Some effects of metabolic acidosis on carbohydrate metabolism in the rat. *Clin Sci* 1970;39(3):375-82.

11. Alpern RJ, Sakhaee K. The clinical spectrum of chronic metabolic acidosis: homeostatic mechanisms produce significant morbidity. *Am J Kidney Dis* 1997;29(2):291-302.
12. Bailey RR. Chronic acidosis with metabolic bone disease. *N Z Med J* 1985;98(781):483-4.
13. Beck N, Webster SK. Effects of acute metabolic acidosis on parathyroid hormone action and calcium mobilization. *Am J Physiol* 1976;230(1):127-31.
14. Bushinsky DA. Net proton influx into bone during metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol* 1988;254(3 Pt 2):F306-10.
15. Bushinsky DA. Net calcium efflux from live bone during chronic metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol* 1989;256(5 Pt 2):F836-42.
16. Bushinsky DA. Acidosis and bone. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20(1-2):40-52.
17. Bushinsky DA. Stimulated osteoclastic and suppressed osteoblastic activity in metabolic but not respiratory acidosis. *Am J Physiol* 1995;268(1 Pt 1):C80-8.
18. Bushinsky DA. The contribution of acidosis to renal osteodystrophy. *Kidney Int* 1995;47(6):1816-32.
19. Bushinsky DA. Acid-base imbalance and the skeleton. *Eur J Nutr* 2001;40(5):238-44.
20. Bushinsky DA, Chabala JM, Gavrillov KL, Levi-Setti R. Effects of in vivo metabolic acidosis on midcortical bone ion composition. *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 2):F813-9.
21. Bushinsky DA, Frick KK. The effects of acid on bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9(4):369-79.

22. Bushinsky DA, Favus MJ, Schneider AB, Sen PK, Sherwood LM, Coe FL. Effects of metabolic acidosis on PTH and 1,25(OH)₂D₃ response to low calcium diet. *Am J Physiol* 1982;243(6):F570-5.
23. Bushinsky DA, Krieger NS, Geisser DI, Grossman EB, Coe FL. Effects of pH on bone calcium and proton fluxes in vitro. *Am J Physiol* 1983;245(2):F204-9.
24. Bushinsky DA, Lechleider RJ. Mechanism of proton-induced bone calcium release: calcium carbonate-dissolution. *Am J Physiol* 1987;253(5 Pt 2):F998-1005.
25. Bushinsky DA, Parker WR, Alexander KM, Krieger NS. Metabolic, but not respiratory, acidosis increases bone PGE(2) levels and calcium release. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281(6):F1058-66.
26. Bushinsky DA, Smith SB, Gavrilov KL, Gavrilov LF, Li J, Levi-Setti R. Chronic acidosis-induced alteration in bone bicarbonate and phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(3):F532-9.
27. Disthabanchong S, Martin KJ, McConkey CL, Gonzalez EA. Metabolic acidosis up-regulates PTH/PTHrP receptors in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Kidney Int* 2002;62(4):1171-7.
28. Domrongkitchaiporn S, Pongsakul C, Stitchantrakul W, Sirikulchayanonta V, Ongphiphadhanakul B, Radinahamed P, et al. Bone mineral density and histology in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2001;59(3):1086-93.
29. Domrongkitchaiporn S, Pongskul C, Sirikulchayanonta V, Stitchantrakul W, Leeprasert V, Ongphiphadhanakul B, et al. Bone histology and bone mineral density after correction of acidosis in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2002;62(6):2160-6.
30. Franch HA, Mitch WE. Catabolism in uremia: the impact of metabolic acidosis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(12 Suppl):S78-81.

31. Frick KK, Bushinsky DA. Chronic metabolic acidosis reversibly inhibits extracellular matrix gene expression in mouse osteoblasts. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt 2):F840-7.
32. Frick KK, Bushinsky DA. In vitro metabolic and respiratory acidosis selectively inhibit osteoblastic matrix gene expression. *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 2):F750-5.
33. Frick KK, Bushinsky DA. Metabolic acidosis stimulates RANKL RNA expression in bone through a cyclo-oxygenase-dependent mechanism. *J Bone Miner Res* 2003;18(7):1317-25.
34. Frick KK, Jiang L, Bushinsky DA. Acute metabolic acidosis inhibits the induction of osteoblastic egr-1 and type 1 collagen. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):C1450-6.
35. Krapf R, Vetsch R, Vetsch W, Hulter HN. Chronic metabolic acidosis increases the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D in humans by stimulating its production rate. Critical role of acidosis-induced renal hypophosphatemia. *J Clin Invest* 1992;90(6):2456-63.
36. Kraut JA. The role of metabolic acidosis in the pathogenesis of renal osteodystrophy. *Adv Ren Replace Ther* 1995;2(1):40-51.
37. Kraut JA. Disturbances of acid-base balance and bone disease in end-stage renal disease. *Semin Dial* 2000;13(4):261-6.
38. Kraut JA, Kurtz I. Metabolic acidosis of CKD: diagnosis, clinical characteristics, and treatment. *Am J Kidney Dis* 2005;45(6):978-93.
39. 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(5):694-700.

40. Krieger NS, Bushinsky DA, Frick KK. Cellular mechanisms of bone resorption induced by metabolic acidosis. *Semin Dial* 2003;16(6):463-6.
41. Krieger NS, Sessler NE, Bushinsky DA. Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro. *Am J Physiol* 1992;262(3 Pt 2):F442-8.
42. Lemann J, Jr., Bushinsky DA, Hamm LL. Bone buffering of acid and base in humans. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(5):F811-32.
43. Lemieux G, Watford M, Vinay P, Gougoux A. Metabolic changes in skeletal muscle during chronic metabolic acidosis. *Int J Biochem* 1980;12(1-2):75-83.
44. Lemann J, Jr., Litzow JR, Lennon EJ. The effects of chronic acid loads in normal man: further evidence for the participation of bone mineral in the defense against chronic metabolic acidosis. *J Clin Invest* 1966;45(10):1608-14.
45. Jara A, Felsenfeld AJ, Bover J, Kleeman CR. Chronic metabolic acidosis in azotemic rats on a high-phosphate diet halts the progression of renal disease. *Kidney Int* 2000;58(3):1023-32.
46. Kraut JA, Coburn JW. Bone, acid, and osteoporosis. *N Engl J Med* 1994;330(25):1821-2.
47. Krieger NS, Frick KK, Bushinsky DA. Mechanism of acid-induced bone resorption. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13(4):423-36.
48. Gafter U, Kraut JA, Lee DB, Silis V, Walling MW, Kurokawa K, et al. Effect of metabolic acidosis in intestinal absorption of calcium and phosphorus. *Am J Physiol* 1980;239(6):G480-4.
49. Sutton RA, Wong NL, Dirks JH. Effects of metabolic acidosis and alkalosis on sodium and calcium transport in the dog kidney. *Kidney Int* 1979;15(5):520-33.

50. Neuman W, Neuman MW. The chemical dynamics of bone mineral. Chicago: University Chicago Press; 1958.
51. Bushinsky DA, Gavrillov KL, Chabala JM, Levi-Setti R. Contribution of organic material to the ion composition of bone. *J Bone Miner Res* 2000;15(10):2026-32.
52. Bushinsky DA, Lam BC, Nespeca R, Sessler NE, Grynpas MD. Decreased bone carbonate content in response to metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol* 1993;265(4 Pt 2):F530-6.
53. Bushinsky DA, Ori Y. Effects of metabolic and respiratory acidosis on bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993;2(4):588-96.
54. Bushinsky DA, Sessler NE. Critical role of bicarbonate in calcium release from bone. *Am J Physiol* 1992;263(3 Pt 2):F510-5.
55. Bushinsky DA, Smith SB, Gavrillov KL, Gavrillov LF, Li J, Levi-Setti R. Acute acidosis-induced alteration in bone bicarbonate and phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283(5):F1091-7.
56. Bushinsky DA, Wolbach W, Sessler NE, Mogilevsky R, Levi-Setti R. Physicochemical effects of acidosis on bone calcium flux and surface ion composition. *J Bone Miner Res* 1993;8(1):93-102.
57. Krieger NS, Parker WR, Alexander KM, Bushinsky DA. Prostaglandins regulate acid-induced cell-mediated bone resorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(6):F1077-82.
58. Chabala JM, Levi-Setti R, Bushinsky DA. Alteration in surface ion composition of cultured bone during metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol* 1991;261(1 Pt 2):F76-84.

59. Sprague SM, Krieger NS, Bushinsky DA. Greater inhibition of in vitro bone mineralization with metabolic than respiratory acidosis. *Kidney Int* 1994;46(4):1199-206.
60. Ori Y, Lee SG, Krieger NS, Bushinsky DA. Osteoblastic intracellular pH and calcium in metabolic and respiratory acidosis. *Kidney Int* 1995;47(6):1790-6.
61. Bushinsky DA, Goldring JM, Coe FL. Cellular contribution to pH-mediated calcium flux in neonatal mouse calvariae. *Am J Physiol* 1985;248(6 Pt 2):F785-9.
62. Bushinsky DA, Sessler NE, Glens RE, Featherstone JD. Proton-induced physicochemical calcium release from ceramic apatite disks. *J Bone Miner Res* 1994;9(2):213-20.
63. Bushinsky DA. Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. *Am J Physiol* 1996;271(1 Pt 2):F216-22.
64. Arnett TR, Dempster DW. Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology* 1986;119(1):119-24.
65. Kraut JA, Gordon EM, Ransom JC, Coburn JW, Kurokawa K. The effect of chronic metabolic acidosis on the end organ responsiveness to parathyroid hormone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56(3):619-22.
66. Madias NE, Johns CA, Homer SM. Independence of the acute acid-buffering response from endogenous parathyroid hormone. *Am J Physiol* 1982;243(2):F141-9.
67. Bushinsky DA, Nilsson EL. Additive effects of acidosis and parathyroid hormone on mouse osteoblastic and osteoclastic function. *Am J Physiol* 1995;269(6 Pt 1):C1364-70.
68. Lopez I, Aguilera-Tejero E, Felsenfeld AJ, Estepa JC, Rodriguez M. Direct effect of acute metabolic and respiratory acidosis on parathyroid hormone secretion in the dog. *J Bone Miner Res* 2002;17(9):1691-700.

69. Raisz LG. Bone cell biology: new approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res* 1993;8 Suppl 2:S457-65.
70. Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 2000;192(1):4-13.
71. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93(2):165-76.
72. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12(1):9-18.
73. Bleich HL, Moore MJ, Lemann J, Jr., Adams ND, Gray RW. Urinary calcium excretion in human beings. *N Engl J Med* 1979;301(10):535-41.
74. Bushinsky DA, Gavrillov K, Chabala JM, Featherstone JD, Levi-Setti R. Effect of metabolic acidosis on the potassium content of bone. *J Bone Miner Res* 1997;12(10):1664-71.
75. Bushinsky DA, Chabala JM, Levi-Setti R. Comparison of in vitro and in vivo ⁴⁴Ca labeling of bone by scanning ion microprobe. *Am J Physiol* 1990;259(4 Pt 1):E586-92.
76. Bushinsky DA, Chabala JM, Levi-Setti R. Ion microprobe analysis of mouse calvariae in vitro: evidence for a "bone membrane". *Am J Physiol* 1989;256(1 Pt 1):E152-8.
77. Bettice JA. Skeletal carbon dioxide stores during metabolic acidosis. *Am J Physiol* 1984;247(2 Pt 2):F326-30.

78. Frassetto LA, Morris RC, Jr., Sebastian A. Effect of age on blood acid-base composition in adult humans: role of age-related renal functional decline. *Am J Physiol* 1996;271(6 Pt 2):F1114-22.
79. Wiederkehr M, Krapf R. Metabolic and endocrine effects of metabolic acidosis in humans. *Swiss Med Wkly* 2001;131(9-10):127-32.
80. Weger W, Kotanko P, Weger M, Deutschmann H, Skrabal F. Prevalence and characterization of renal tubular acidosis in patients with osteopenia and osteoporosis and in non-porotic controls. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(7):975-80.
81. Weger M, Deutschmann H, Weger W, Kotanko P, Skrabal F. Incomplete renal tubular acidosis in 'primary' osteoporosis. *Osteoporos Int* 1999;10(4):325-9.
82. Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P, Sardella D, Chicca S, Manni M, et al. Renal bone disease in 76 patients with varying degrees of predialysis chronic renal failure: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11(5):813-9.
83. Disthabanchong S, Domrongkitchaiporn S, Sirikulchayanonta V, Stitchantrakul W, Karnsombut P, Rajatanavin R. Alteration of noncollagenous bone matrix proteins in distal renal tubular acidosis. *Bone* 2004;35(3):604-13.
84. Foreman JW, Abitbol CL, Trachtman H, Garin EH, Feld LG, Strife CF, et al. Nutritional intake in children with renal insufficiency: a report of the growth failure in children with renal diseases study. *J Am Coll Nutr* 1996;15(6):579-85.
85. Boirie Y, Broyer M, Gagnadoux MF, Niaudet P, Bresson JL. Alterations of protein metabolism by metabolic acidosis in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 2000;58(1):236-41.
86. Green J, Maor G. Effect of metabolic acidosis on the growth hormone/IGF-I endocrine axis in skeletal growth centers. *Kidney Int* 2000;57(6):2258-67.

87. Challa A, Chan W, Krieg RJ, Jr., Thabet MA, Liu F, Hintz RL, et al. Effect of metabolic acidosis on the expression of insulin-like growth factor and growth hormone receptor. *Kidney Int* 1993;44(6):1224-7.
88. Brungger M, Hulter HN, Krapf R. Effect of chronic metabolic acidosis on the growth hormone/IGF-1 endocrine axis: new cause of growth hormone insensitivity in humans. *Kidney Int* 1997;51(1):216-21.
89. 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(2):509-27.
90. Ginty F. Dietary protein and bone health. *Proc Nutr Soc* 2003;62(4):867-76.
91. Feskanich D, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA. Protein consumption and bone fractures in women. *Am J Epidemiol* 1996;143(5):472-9.
92. Abelow BJ, Holford TR, Insogna KL. Cross-cultural association between dietary animal protein and hip fracture: a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1992;50(1):14-8.
93. Sellmeyer DE, Stone KL, Sebastian A, Cummings SR. A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Am J Clin Nutr* 2001;73(1):118-22.
94. Barzel US. The skeleton as an ion exchange system: implications for the role of acid-base imbalance in the genesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1995;10(10):1431-6.
95. Sebastian A, Harris ST, Ottaway JH, Todd KM, Morris RC, Jr. Improved mineral balance and skeletal metabolism in postmenopausal women treated with potassium bicarbonate. *N Engl J Med* 1994;330(25):1776-81.

96. Frassetto L, Morris RC, Jr., Sebastian A. Potassium bicarbonate reduces urinary nitrogen excretion in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(1):254-9.

3 – OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar os efeitos da acidose metabólica crônica sobre a consolidação de uma fratura óssea.

3.1 – Objetivos Específicos

- a. Produzir acidose metabólica crônica em ratos através da administração de solução de cloreto de amônio por duas semanas como única fonte de líquido, comparando os parâmetros gasométricos (pH, PCO₂, bicarbonato) com os de ratos que receberam água *ad libitum* pelo mesmo período (grupo controle);
- b. Comparar a consolidação de uma fratura produzida manualmente na tíbia direita nos ratos que receberam cloreto de amônio com os ratos que ingeriram água (grupo controle), utilizando parâmetros clínicos, radiológicos e histológicos;
- c. Determinar o peso dos animais no início e no final do experimento para avaliação do ganho ponderal;
- d. Comparar, ao término do período experimental, os níveis séricos de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio e fosfato), de creatinina e os parâmetros gasométricos (pH, PCO₂, bicarbonato) nos ratos tratados com cloreto de amônio e nos que receberam água (grupo controle).

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Materiais

4.1.1 – Animais

Foram estudados 20 ratos Holtzman machos, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Faculdade da Universidade Federal de Minas Gerais, que pesavam, em média, 229.3 ± 71 g. Os animais foram alimentados, durante o período de estudo, com ração padronizada (Nuvilab CR1 – NUVITAL ®) sob livre demanda e mantidos em ambiente com temperatura controlada e com ciclo claro-escuro de 12 horas.

4.1.2 – Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos constituídos de 10 ratos cada um, denominados **AC** (ratos que receberam cloreto de amônio) e **C** (ratos que receberam água – grupo controle), sendo identificados por numeração seqüencial dentro de cada grupo.

O grupo **AC** era formado por 10 ratos com peso médio inicial de $212,6 \pm 68,7$ gramas. Acidose metabólica foi produzida pela administração diária de solução de cloreto de amônio a 4 % (NH_4Cl). O NH_4Cl foi colocado em bebedouro padrão com livre acesso durante todo o experimento. Esta solução era a única fonte de líquido dos animais acidóticos.

A administração de NH_4Cl como única fonte hídrica causa acidose sistêmica ao aumentar a produção de ácido no organismo sem alterar a excreção, criando um balanço positivo de ácido (1). Ressalta-se que a administração de soluções de NH_4Cl como única fonte hídrica é a forma mais amplamente utilizada na literatura para produção de acidose em modelos experimentais, variando-se de 1.8 a 4.0% a concentração da solução utilizada (2-4).

O grupo C serviu como grupo controle e foi composto por 10 ratos com média de peso inicial de $246,0 \pm 73,6$ gramas. Esse grupo recebeu água filtrada em bebedouro padrão com livre acesso durante todo o experimento.

Todos os procedimentos envolvendo os animais foram realizados de acordo com as recomendações de protocolos de uso e cuidados com animais de laboratório [vide protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais no anexo 1].

4.2 – Métodos

4.2.1 – Protocolo Experimental

Após 14 dias de ingestão de água (grupo C) ou NH_4Cl a 4% (grupo AC), todos os ratos foram submetidos à anestesia inalatória com éter sulfúrico e, a seguir, realizou-se coleta de 1 ml de sangue arterial por punção intracardíaca, em seringa heparinizada, com agulha 25 x 7 mm. As amostras de sangue foram imediatamente submetidas à análise gasométrica para determinação do pH, da pressão parcial de CO_2 (PCO_2) e dos níveis de

bicarbonato (HCO_3^-) por técnica padrão em aparelho Rapid Lab 348 pH Blood Gas Analyzer Bayer Corporation/USA.

No décimo quinto dia, cada rato foi novamente anestesiado e foi realizada manualmente, por mecanismo de flexão, fratura diafisária da tíbia e fíbula direita, de acordo com técnica previamente descrita na literatura (5, 6). A escolha da técnica de fratura por pressão manual em mecanismo de flexão sem fixação ou qualquer imobilização do animal está embasada na literatura como uma opção simples e eficaz para avaliar a consolidação (5-7). As fraturas foram confirmadas clinicamente e através de radiografias do membro fraturado.

Todos os animais permaneceram em suas respectivas gaiolas sem imobilização ou restrição de movimentos. O grupo **AC** continuou recebendo a solução de NH_4Cl a 4% e o grupo **C** ingerindo água pura até o final do período experimental.

Após quatro semanas da realização da fratura (28 dias), cada rato foi pesado e novamente anestesiado. Coletou-se 4 ml de sangue por punção intracardíaca para análise gasométrica (1ml em seringa heparinizada) e de parâmetros bioquímicos (3ml em tubos padronizados). A determinação de pH, pCO_2 e HCO_3^- foi novamente realizada pelo método descrito. Para a determinação dos níveis séricos de sódio, potássio, e cálcio foi utilizado o equipamento 9180 Electrolyte Analyser-AVL Cientific Corporation e para as dosagens de creatinina e fósforo séricos utilizou-se o equipamento CobasMiraPlus–Roche/ USA. Todos os animais foram, então, sacrificados através de anestesia letal para obtenção e preparação de peças anatômicas dos membros submetidos à fratura.

É importante mencionar que o período de quatro semanas para avaliar a presença de consolidação da fratura foi escolhido baseado em uma série de estudos sobre o reparo de fraturas experimentais em ratos (7-11).

4.2.2 – Análise radiográfica

Após o sacrifício de cada animal, o membro posterior direito foi cuidadosamente dissecado, mantendo-se, no entanto, o envoltório muscular da tíbia e fíbula para obtenção de uma radiografia em ântero-posterior. As radiografias foram analisadas por um único examinador cego e classificadas em fratura consolidada ou fratura não consolidada de acordo com a presença e maturidade do calo de fratura e neoformação óssea entre as corticais dos fragmentos opostos. Após a realização da radiografia, as tíbias foram dissecadas de seu envoltório muscular e preparadas para análise histológica.

4.2.3 – Análise histológica

Para exame histológico, os segmentos ósseos de tíbia foram inicialmente fixados em formol a 10%. Em seguida foram descalcificados em solução tamponada de formalina / ácido nítrico a 10% por 24 a 48 horas e incluídos em parafina. Cortes de 5 µm foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e examinados em microscopia óptica convencional nos aumentos de 3.2, 10 e 40 vezes.

A formação do calo de fratura foi classificada histologicamente de acordo com uma escala de 5 pontos, proposta por Allen e colaboradores (7), que considera:

- Grau 0 - não-união ou pseudartrose caracterizada pela presença inquestionável de uma cavidade dentro da placa cartilaginosa entre os fragmentos de fratura, contendo sangue ou outro fluido e/ ou revestida por tecido mesotelial cubóide;
- Grau 1 - união cartilaginosa incompleta com tecido fibroso na placa de cartilagem hialina do calo;
- Grau 2 - união cartilaginosa completa com placa de cartilagem bem estabelecida unindo os cotos de fratura;
- Grau 3 - união óssea incompleta caracterizada pela presença de cartilagem hialina no calo;
- Grau 4 - união óssea completa.

Uma pontuação específica foi dada para cada peça individualmente. Em seguida foi determinada a média de pontuação obtida em cada grupo, obtendo-se a média dos valores do escore de consolidação da fratura para os grupos **AC** e **C**.

4.2.4 – Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. O nível de significância foi ajustado como $P < 0.05$. O teste T de Student para amostras pareadas foi usado para a comparação dos dados coletados no mesmo grupo experimental em períodos de tempo diferentes. O teste T de Student para dados não pareados foi usado para as comparações entre dois grupos diferentes. O Teste Exato de Fisher foi usado para a análise comparativa dos resultados clínicos e radiológicos dos ratos **AC** e controles. Os resultados da análise histológica foram apresentados como os valores médios de uma escala de cinco pontos estabelecida para cada grupo (7). O teste T de Student para dados

não pareados permitiu a comparação entre as médias dos escores de consolidação da fratura obtidas em ambos os grupos. A concordância para os achados radiológicos e histológicos foi avaliada pelo coeficiente Kappa.

4.2.5 – Aspectos Éticos

Este estudo foi realizado de acordo com as normas da ética para experimentação e cuidado com animais de laboratório e recebeu aprovação por parte do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG. (vide protocolo no anexo 1).

Referências Bibliográficas

1. Lemann J, Jr., Bushinsky DA, Hamm LL. Bone buffering of acid and base in humans. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(5):F811-32.
2. 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(5):694-700.
3. Carbajo E, Lopez JM, Santos F, Ordonez FA, Nino P, Rodriguez J. Histologic and dynamic changes induced by chronic metabolic acidosis in the rat growth plate. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(6):1228-34.
4. Jara A, Felsenfeld AJ, Bover J, Kleeman CR. Chronic metabolic acidosis in azotemic rats on a high-phosphate diet halts the progression of renal disease. *Kidney Int* 2000;58(3):1023-32.
5. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998(355 Suppl):S56-65.
6. Bourque WT, Gross M, Hall BK. A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 1992;42(4):369-74.
7. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 1980;51(4):595-600.
8. Henricson A, Hulth A, Johnell O. The cartilaginous fracture callus in rats. *Acta Orthop Scand* 1987;58(3):244-8.
9. Bo J, Sudmann E, Marton PF. Effect of indomethacin on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1976;47(6):588-99.

10. Grundnes O, Reikeras O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1993;64(3):340-2.
11. Udupa KN, Prasad GC. Chemical and Histochemical Studies on the Organic Constituents in Fracture Repair in Rats. *J Bone Joint Surg Br* 1963;45:770-9.

Effects of metabolic acidosis in fracture healing: an experimental study in rats

Eduardo V. Novais, MD^{*}; Célia S. P. Barbosa, MD[§] Luiz H. Vilela^{*}, MD; Lúcio H. Carvalho, PhD^{*}; Marco A.P. Andrade, PhD^{*}; Ana C. Simões e Silva, PhD[†]

From the ^{*}Department of Orthopaedic Surgery, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; the [§]Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; the [†]Department of Pediatrics, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Each author certifies that he or she has no commercial associations (e.g., consultancies, stock ownership, equity interest, patent/licensing arrangements, etc.) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted article.

Each author certifies that his or her institution has approved the animal protocol for this investigation and that all investigations were conducted in conformity with ethical principles of research.

Correspondence to: Ana Cristina Simões e Silva. Rua Timbiras, 1364, AP 1704 - Bloco A. Funcionários. Belo Horizonte, MG, Brazil. 30140-061. Phone: 011-55-31-3224-9937; Fax: 011-55-31-3225-6397; E-mail: acssilva@hotmail.com; ana@medicina.ufmg.br

Abstract

Metabolic acidosis (MA) has been implicated in the development of osteoporosis and bone diseases. There is substantial evidence that acidosis adversely affects bone by increasing bone resorption and reducing bone formation. Several different types of bone disease have been observed in experimental and clinical studies of MA. However, the effects of acidosis on fracture repair have never been systematically evaluated. The present study further investigated the effects of MA on fracture healing in acidotic rats (AC) and in non-acidotic (C) controls. Chronic MA was induced by ingestion of ammonium chloride added to tap water as the unique source of liquid for the animals. After two weeks of acid-load (AC group) or tap water (C group) ingestion, a fracture of the right tibia was manually produced. Four weeks later, fracture healing was evaluated by clinical, radiological and histological parameters. Fracture healing in AC animals was significantly altered as compared to C group. However, AC rats were able to compensate the MA. It was found a significant difference in serum phosphate levels between both groups. This study showed a higher frequency of delayed fracture healing and nonunion in the presence of MA and indicated an important role of bone buffering in acid base homeostasis.

Keywords: acid-base imbalance, fracture healing, metabolic bone diseases, acidosis

Introduction

Metabolic (MA) acidosis is an acid-base disturbance induced by a primary decrease in plasma bicarbonate concentration that leads to a reduction in systemic pH. MA is also associated with an increase in urinary calcium excretion without a compensatory increase in intestinal calcium absorption, resulting in a net loss of body calcium [1-3]. Bone has been considered the main source of additional urinary calcium load, since more than 99% of body calcium is located within the mineral phases of skeleton [4]. Chronic MA is commonly found in chronic renal diseases (CRD), renal insufficiency, renal tubular acidosis (RTA) and has also been implicated as a contributing factor for the development of renal osteodystrophy and osteoporosis [5-10].

There is substantial evidence that acidosis exerts profound adverse effects on bone metabolism and thus could interfere with fracture healing. Fracture healing is a complex physiologic process in which the events of endochondral and intramembranous bone formation follow a specific time sequence [11-14]. This complex process has been elucidated by using reproducible models of fracture healing in small animals [11-15]. Most of the cellular and biochemical mechanisms that occur during fracture healing parallel those that take place in the growth plate during development [14, 15]. Recently, MA has been associated with inhibitory effects on cartilage cell progression and endochondral bone formation in the rat growth plate [16]. *In vitro* studies have also shown that MA promotes distinct morphological changes in growth centers and also suppresses proliferation and differentiation of chondrocytes in the murine mandibular condyle [17, 18]. In addition, MA produces changes in bone mineral content, which are consistent with the recognized role of bone as a proton buffer system. Acidosis initially

stimulates physicochemical mineral dissolution and subsequently increases bone resorption and reduces bone formation as it suppresses osteoblastic activity and stimulates osteoclastic activity [3, 19-25].

Several different types of bone disease have been observed in experimental and clinical forms of MA with either normal or compromised renal function [3, 5, 7-10, 20, 26-30]. MA-related clinical conditions frequently lead to skeletal abnormalities. Children with CRD or RTA often present widened and irregular epiphyseal-metaphyseal junctions and bowing deformities. Similarly, adults with renal insufficiency usually develop osteopenia or osteoporosis and have higher risk for fractures. The orthopaedic management of long bone deformities and pathological fractures associated with these situations may be troublesome. For all these reasons, the investigation of the process of fracture or bone surgery repair in the presence of chronic MA takes on new importance. In this regard, herein we evaluated the effects of MA on fracture healing in an experimental model.

Material and Methods

Animals

Twenty male Holtzman rats (Holtzman Co.; Madison Wisconsin, USA) with a mean weight of 229.3 ± 71 g were studied. Rats were housed in individual cages in controlled atmospheric condition with an artificial 12-hour light-dark cycle. The animals had continuous and free access to standard rat chow. The Animal Care Ethics Committee of our institution approved this study. All experimental procedures were in accordance with the international guidelines for appropriate animal care.

Experimental Protocol

The animals were divided into two groups of 10 rats each (day 0 of the protocol): acidotic rats (AC, mean weight of 212.6 ± 68.7 g) and control rats (C, mean weight 246.0 ± 73.6 g). Metabolic acidosis in AC group was induced by daily administration of 4% ammonium chloride (NH_4Cl) as the only source of drinking solution through the whole experiment [3, 16, 31]. Animals in C group received standard tap water *ad libitum* during the study period.

On protocol day 14, systemic blood samples were obtained by cardiac puncture under anesthesia [31, 32]. Blood samples were collected into heparinized syringes and immediately analyzed, using a standard blood gas analyzer (Rapid Lab 348 pH/ Blood Gas Analyzer, Bayer Corporation, USA), to directly measure pH and partial pressure of carbonic gas (pCO_2) and to calculate bicarbonate concentration and base excess. Immediately after heart puncture, still under anesthesia, the rats were submitted to right tibia and fibula fractures. A diaphyseal fracture was produced using digital pressure applied over a fulcrum, according to technique described elsewhere [33, 34]. The radiological confirmation of the fractures was obtained through conventional X-rays of the right leg. Animals were kept in their cages without immobilization or restriction of movements. The AC group received 4% ammonium chloride as the only source of liquids until the end of the experiment, while the control group received only tap water. There was no difference between animal chow ingestion between groups.

On protocol day 42 (28 days after the fracture) each rat was weighed and blood samples were withdraw by heart puncture under anesthesia for another gas analysis and for the determination of biochemical measurements. Sodium, potassium, chloride and

calcium concentrations were measured using a 9180 Electrolyte Analyzer (AVL Scientific Corporation). Plasma phosphate and creatinine levels were determined with an automated biochemical analyzer (COBAS Mira Plus, Roche). Rats, still under anesthesia, were then sacrificed by exsanguination from the abdominal aorta.

Radiographic analysis

After the sacrifice of the rats, their right tibias were removed with its muscular wrapper and anteroposterior radiographs were taken immediately to determine the presence of fracture healing. The radiographic changes were evaluated with respect to the maturity of callus formation and of bridging bone formation on the cortices. One independent observer, blinded to the treatment groups, analyzed all radiographs.

Histological analysis

For histological exam, the right tibia was stripped of adhering soft tissue and fixed in 10% formaldehyde solution. It was also decalcified in a 10% formaldehyde / nitric acid solution of for 48 hours and embedded in paraffin. Specimens were then sectioned longitudinally (cuts of 5 μ m) and stained with hematoxylin and eosin. One independent observer, blinded to the treatment groups, analyzed all bone tissue sections.

The grade of fracture healing was determined using a 5 point scale according to Allen et al. [32] as follow:

- Grade 0: nonunion or pseudoarthrosis characterized by the incontrovertible cavity within the cartilaginous plate between fracture fragments, containing blood or other fluid and / or lined by low cubical mesothelia;

- Grade 1: incomplete cartilaginous union with retention of fibrous elements in the cartilaginous plate;
- Grade 2: complete cartilaginous union with well-formed plate of hyaline cartilage uniting the fragments;
- Grade 3 - incomplete bone union characterized by the presence of small amount of cartilage in the callus;
- Grade 4 – complete bone union.

Each individual histological section received a specific grade. The mean values for the grade of bone repair was calculated in AC and C rats, establishing bone fracture repair scores as previously described [32].

Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation. The level of significance was set as $P < 0.05$. Paired Student t-test was used for the comparison of data collected in the same experimental group at different periods of time. Non-paired Student t-test was used for the comparisons between two different groups. Exact Test of Fisher was used (ETF) for the comparative analysis of clinical and radiological findings in AC and C rats. The results of histology analysis are presented as a mean score of a five-point scale established for each group. Non-paired student t-test allowed the comparison between the means of the scores of fracture healing obtained in both groups. The level of agreement between radiographic and histological analysis of fracture healing was calculated with the Kappa coefficient.

Results

Body weight variation

At the beginning of the experimental period there was no difference in body weight between AC and C rats (212.6 ± 68.7 g vs. 246.0 ± 73.6 g, $P = 0.30$). However, at the 42nd study day, the mean of body weight was significantly lower in AC group when compared to C rats (213.3 ± 58.1 g vs. 299.0 ± 36.4 g, $P = 0.01$). Additionally, the evaluation of weight variation among each group (difference between final and initial body weight) revealed a completely absence of weigh gain in the AC group (212.6 ± 68.7 g vs. 213.3 ± 58.1 g, $P = 0.54$), contrasting with a significant elevation of final body weight in control animals (246.0 ± 73.6 g vs. 299.0 ± 36.4 g, $P = 0.004$).

Biochemical parameters

Blood gas analysis

As shown in figure 1, the administration of 4% NH_4Cl for 14 days induced an evident metabolic acidosis as documented by significant reductions in pH values (7.26 ± 0.04 vs. 7.38 ± 0.06 , $P = 0.000003$, panel A) as well as in the bicarbonate concentration in AC rats (18.5 ± 5.0 mEq/L vs. 25.3 ± 2.5 mEq/L, $P = 0.00009$) when compared to C rats (panel B). Both pH and bicarbonate levels clearly showed that rats of the AC group were in a state of evident metabolic acidosis when the fracture was performed (figure 1). There was no significant difference among pCO_2 values in both groups that further confirmed the metabolic nature of acidosis in AC group.

As also shown in figure 1, at the end of the experimental period (day 42), even with the daily administration of 4% ammonium chloride, it was observed that AC rats compensated the metabolic acidosis by reaching an acid-base equilibrium as shown by

blood gas parameters. Final blood pH values were significantly higher than previous measurements (7.39 ± 0.06 vs. 7.26 ± 0.04 , $P= 0.00006$, panel A). Accordingly, the bicarbonate concentration exhibited the same profile when compared final and initial values (27.2 ± 4.2 mEq/L vs. 18.5 ± 5.0 mEq/L, $P= 0.0003$, panel B). In addition, there was no significant difference in the pH values ($P= 0.24$) and bicarbonate concentration ($P= 0.63$) of AC rats and C group at the end of the experiment.

Serum creatinine and electrolytes measurements

As previously mentioned, the biochemical measurements were performed only at the end of the experimental period (day 42). Serum creatinine was similar in both groups and within normal range. No differences in sodium, potassium and calcium levels were detected by the comparison of both groups and the values were also within normal range. On the other hand, it was detected a significant lower level of serum phosphate in AC rats when compared to C group ($P= 0,001$) (see Table 1)

Fracture healing analysis

Radiographic evaluation

The analysis of the radiographs showed evidence of fracture healing in all cases of the C group (figure 2A). In AC group, only four cases with complete fracture healing were found. In six cases, there was a small amount of bridging bone formation with delayed bone union (figure 2B). The statistical comparison of these results showed a significant difference between both groups ($p = 0.01$)

Histological evaluation

In general, an impairment of fracture healing was observed in acidotic rats. AC rats exhibited a statistically significant decrease in mean fracture healing score as compared to C group, suggesting an effect of metabolic acidosis on bone metabolism. In addition, there was an increase in pseudoarthrosis formation in AC group, but not reaching statistical difference. (Table 3)

In control rats (Figure 3A) the trabeculae varied in thickness and size and showed partial mineralization of the central area with outlying deposition of osteoid. Most of the trabeculae were totally covered by rows of osteoblasts depositing osteoid layers and osteoclasts with resorption activity in gaps of Howship.

In contrast, the histological analysis in AC group suggested more connective fibrous tissue and fibrochondroid tissue and less woven bone formation when compared to controls. Although the number and activity of osteoclasts were not directly measured there was a tendency to find more osteoclasts than in C group (figure 5A and 5B). In five cases, there was formation of "sinovial-like" cavity in areas covered by a single layer of flat cells and with fibrin deposits, indicating pseudoarthrosis or fracture nonunion, associated, most of the time, to the resorption of bone fragments partially destroyed with evident osteoclastic activity.

The level of agreement between the conclusion of radiographic evaluation of fracture healing and histological analysis was considered excellent with a Kappa coefficient of 78%.

Discussion

A potential long-term effect of metabolic acidosis is bone demineralization, which may have multiple consequences on skeletal structural function [3, 5, 7-10, 20, 26-30]. The orthopaedic management of long bone deformities and pathologic fractures associated with metabolic acidosis related conditions might be troublesome. The healing of a fracture, osteotomies for long bone deformities and spine fusion may be compromised by the presence of a sub clinical status of metabolic acidosis [35-37]. In patients with metabolic conditions related to chronic acidosis, healing index averaged approximately twice that seen in pediatric femoral lengthening and was 25% greater than for patients undergoing tibial lengthening in a series of angular deformities managed with the Ilizarov method [35]. Complications after osteotomies have been described in at least 40% of children with renal osteodystrophy. Complications of corrective osteotomy are related to perioperative metabolic instability and adequate multimodal medical management must be emphasized to maintain metabolic homeostasis [36, 37]. Although the interaction between metabolic acidosis and bone metabolism has been investigated, there is no systematic experimental data evaluating the effect of metabolic acidosis on the fracture healing process. This *in vivo* study is the first to show the potential inhibitory effects of metabolic acidosis in a rat tibia fracture healing.

Our findings have admitted limitations which need to be further investigated. We did not measure the serum levels of hormones involved in bone metabolism such as parathyroid hormone (PTH), vitamin D and calcitonin due to the difficulties to obtain laboratory kits specifically appropriate to detect rat hormones. Despite of this limitation, our data suggest the role of PTH in acidotic animals, since it was observed a significant

reduction in serum phosphate levels in this group of rats. This finding can be explained as the result of the kidney action of PTH that normally increases urinary phosphate excretion. Although we were not able to prove this hypothesis, we currently believe that PTH might have a role in the impaired fracture healing process in the acidotic animals. Further studies are necessary to clarify this issue. In addition, we did not determine the urinary electrolyte excretion. These measurements could be useful to analyze the impact of chronic acid overload on renal function homeostasis. Indeed, we currently start a new experimental protocol that includes the urinary electrolyte measurements. Fracture healing was analyzed according to radiological and histological analysis, both performed by independent observers blinded to the treatment groups. In addition, we did not perform any biomechanical tests as other studies of fracture healing [38, 39]. However it should be pointed out that a handful of studies on fracture healing includes only histological analysis as we did [11-15, 32, 34]. Recently, it has been suggested that the histological methods developed for metabolic bone disease studies are not completely suitable for the evaluation of bone repair and histomorphometric measurements of bone repair have a better correlation to biomechanical and radiographic imaging properties that functionally define rates of bone healing [40].

Although the precise mechanisms by which metabolic acidosis affect fracture healing could not be elucidated by the present study, our results showed significant difference between the fracture healing in acidotic and control rats verified by clinical, radiological and histological analysis. These results clearly evidenced the effects of chronic metabolic acidosis in the biological process of fracture healing. There is substantial evidence that acidosis adversely affects bone as it induces changes in bone mineral content, which are consistent with the purported role of bone as a proton buffer

[1, 3, 5-10, 19, 22-24, 30, 41-46]. The present study supported the key role of bone in acid base homeostasis. To date, the skeleton functionally acts as an alkaline reserve, consumed during chronic acidotic conditions. In this study, we clearly showed that, at the end of the experimental period, the pH and the bicarbonate serum levels reached normal range in rats receiving acid overload. The normalization of plasma acid base status was associated with a permanent stimulus for bone resorption and a negative effect on the fracture healing process. Many studies substantiate our finding since metabolic acidosis increases net calcium efflux from bone, initially through physicochemical mechanisms and later through cell-mediated pathways [24, 47-51]. Metabolic acidosis has profound effects in both cartilage and bone cells [1, 16, 19, 23, 41, 42, 44-46, 52-55]. Studies *in vitro* and *in vivo* have demonstrated that metabolic acidosis increases bone resorption and reduces bone formation as it suppresses osteoblastic activity and stimulates osteoclastic activity [1, 19, 23, 41, 42, 44-46, 52-55]. Recently metabolic acidosis has been associated with inhibitory effects on cartilage cell progression and endochondral bone formation in the rat growth plate [16]. *In vitro* studies have also shown that metabolic acidosis exerts distinct morphological changes in growth centers and also suppresses proliferation and differentiation of chondrocytes in the murine mandibular condyle [17, 18]. All these proposed mechanisms may be implicated on the biological process of fracture healing and they probably explain the impairment observed in the acidotic rats of this study. Further studies are obviously necessary to comprehend the whole process.

In conclusion, our study indicates the role of bone as a proton buffer system that adjusts the pH and bicarbonate levels during chronic metabolic acidosis by promoting bone mass reduction. In addition, our findings characterize, for the first time, the effects

of sustained metabolic acidosis on the fracture healing process. Based on our data, we highly recommended a strict control of acid base status before the orthopaedic correction of bone deformities or surgical treatment of fractures in chronic acidotic patients.

References

1. Lemann J, Jr., Bushinsky DA, Hamm LL. Bone buffering of acid and base in humans. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(5):F811-32.
2. Lemann J, Jr., Litzow JR, Lennon EJ. The effects of chronic acid loads in normal man: further evidence for the participation of bone mineral in the defense against chronic metabolic acidosis. *J Clin Invest* 1966;45(10):1608-14.
3. 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(5):694-700.
4. Widdowson EM MR, Spray CM. The chemical composition of the human body. *Clin Sci* 1951;10:113-125.
5. Bushinsky DA. The contribution of acidosis to renal osteodystrophy. *Kidney Int* 1995;47(6):1816-32.
6. Alpern RJ, Sakhaee K. The clinical spectrum of chronic metabolic acidosis: homeostatic mechanisms produce significant morbidity. *Am J Kidney Dis* 1997;29(2):291-302.
7. Franch HA, Mitch WE. Catabolism in uremia: the impact of metabolic acidosis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(12 Suppl):S78-81.
8. Domrongkitchaiporn S, Pongsakul C, Stitchantrakul W, Sirikulchayanonta V, Ongphiphadhanakul B, Radinahamed P, et al. Bone mineral density and histology in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2001;59(3):1086-93.
9. Domrongkitchaiporn S, Pongsakul C, Sirikulchayanonta V, Stitchantrakul W, Leeprasert V, Ongphiphadhanakul B, et al. Bone histology and bone mineral density after correction of acidosis in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2002;62(6):2160-6.

10. Weger W, Kotanko P, Weger M, Deutschmann H, Skrabal F. Prevalence and characterization of renal tubular acidosis in patients with osteopenia and osteoporosis and in non-porotic controls. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(7):975-80.
11. Hulth A. Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1989(249):265-84.
12. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop Relat Res* 1989(248):294-309.
13. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res* 1989(248):283-93.
14. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998(355 Suppl):S7-21.
15. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005;19(10 Suppl):S4-6.
16. Carbajo E, Lopez JM, Santos F, Ordonez FA, Nino P, Rodriguez J. Histologic and dynamic changes induced by chronic metabolic acidosis in the rat growth plate. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(6):1228-34.
17. Green J, Goldberg R, Maor G. PTH ameliorates acidosis-induced adverse effects in skeletal growth centers: the PTH-IGF-I axis. *Kidney Int* 2003;63(2):487-500.
18. Green J, Maor G. Effect of metabolic acidosis on the growth hormone/IGF-I endocrine axis in skeletal growth centers. *Kidney Int* 2000;57(6):2258-67.
19. Krieger NS, Frick KK, Bushinsky DA. Mechanism of acid-induced bone resorption. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13(4):423-36.
20. Macleay JM, Olson JD, Turner AS. Effect of dietary-induced metabolic acidosis and ovariectomy on bone mineral density and markers of bone turnover. *J Bone Miner Metab* 2004;22(6):561-8.
21. MacLeay JM, Olson JD, Enns RM, Les CM, Toth CA, Wheeler DL, et al. Dietary-induced metabolic acidosis decreases bone mineral density in mature ovariectomized ewes. *Calcif Tissue Int* 2004;75(5):431-7.
22. Bushinsky DA. Acidosis and bone. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20(1-2):40-52.
23. Bushinsky DA. Stimulated osteoclastic and suppressed osteoblastic activity in metabolic but not respiratory acidosis. *Am J Physiol* 1995;268(1 Pt 1):C80-8.

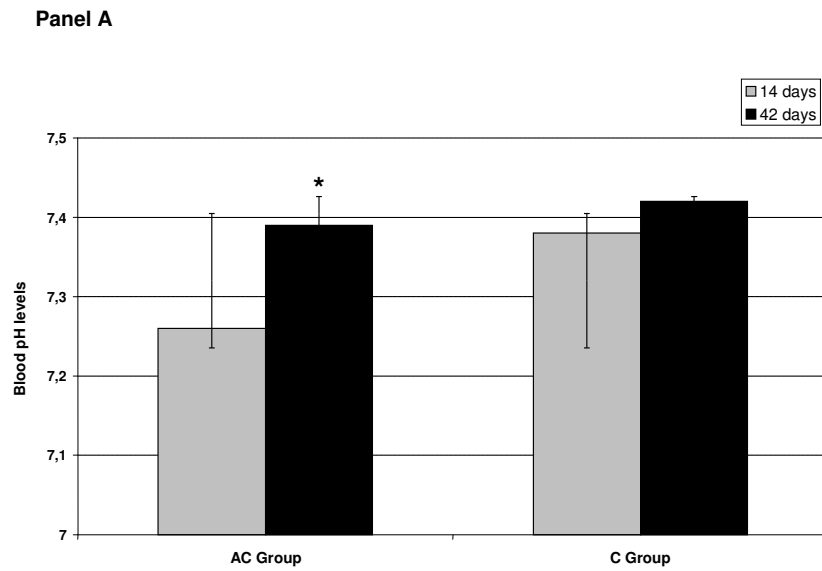
24. Bushinsky DA, Chabala JM, Gavrilov KL, Levi-Setti R. Effects of in vivo metabolic acidosis on midcortical bone ion composition. *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 2):F813-9.
25. Bushinsky DA, Ori Y. Effects of metabolic and respiratory acidosis on bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993;2(4):588-96.
26. Lemann J, Jr., Adams ND, Wilz DR, Brenes LG. Acid and mineral balances and bone in familial proximal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2000;58(3):1267-77.
27. Kraut JA. Disturbances of acid-base balance and bone disease in end-stage renal disease. *Semin Dial* 2000;13(4):261-6.
28. Kovacic V, Roguljic L. Metabolic acidosis of chronically hemodialyzed patients. *Am J Nephrol* 2003;23(3):158-64.
29. Jara A, Felsenfeld AJ, Bover J, Kleeman CR. Chronic metabolic acidosis in azotemic rats on a high-phosphate diet halts the progression of renal disease. *Kidney Int* 2000;58(3):1023-32.
30. Disthabanchong S, Domrongkitchaiporn S, Sirikulchayanonta V, Stitchantrakul W, Karnsombut P, Rajatanavin R. Alteration of noncollagenous bone matrix proteins in distal renal tubular acidosis. *Bone* 2004;35(3):604-13.
31. Lina BA, Kuijpers MH. Toxicity and carcinogenicity of acidogenic or alkalogenic diets in rats; effects of feeding NH_4Cl , KHCO_3 or KCl . *Food Chem Toxicol* 2004;42(1):135-53.
32. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 1980;51(4):595-600.
33. Bourque WT, Gross M, Hall BK. A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* 1992;42(4):369-74.
34. Urist MR MF. Calcification in the callus in healing fractures in normal rats. *J Bone Joint Surg Am* 1941;XXIII(1):1-15.
35. Stanitski DF. Treatment of deformity secondary to metabolic bone disease with the Ilizarov technique. *Clin Orthop Relat Res* 1994(301):38-41.
36. Davids JR, Fisher R, Lum G, Von Glinski S. Angular deformity of the lower extremity in children with renal osteodystrophy. *J Pediatr Orthop* 1992;12(3):291-9.

37. Oppenheim WL, Fischer SR, Salusky IB. Surgical correction of angular deformity of the knee in children with renal osteodystrophy. *J Pediatr Orthop* 1997;17(1):41-9.
38. Brown KM, Saunders MM, Kirsch T, Donahue HJ, Reid JS. Effect of COX-2-specific inhibition on fracture-healing in the rat femur. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A(1):116-23.
39. Gerstenfeld LC, Thiede M, Seibert K, Mielke C, Phippard D, Svagr B, et al. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Orthop Res* 2003;21(4):670-5.
40. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 2005;20(10):1715-22.
41. Bushinsky DA. Acid-base imbalance and the skeleton. *Eur J Nutr* 2001;40(5):238-44.
42. Bushinsky DA, Frick KK. The effects of acid on bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9(4):369-79.
43. Bushinsky DA, Smith SB, Gavrillov KL, Gavrillov LF, Li J, Levi-Setti R. Chronic acidosis-induced alteration in bone bicarbonate and phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(3):F532-9.
44. Frick KK, Bushinsky DA. Metabolic acidosis stimulates RANKL RNA expression in bone through a cyclo-oxygenase-dependent mechanism. *J Bone Miner Res* 2003;18(7):1317-25.
45. Krieger NS, Bushinsky DA, Frick KK. Cellular mechanisms of bone resorption induced by metabolic acidosis. *Semin Dial* 2003;16(6):463-6.
46. Krieger NS, Sessler NE, Bushinsky DA. Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro. *Am J Physiol* 1992;262(3 Pt 2):F442-8.
47. Bushinsky DA, Wolbach W, Sessler NE, Mogilevsky R, Levi-Setti R. Physicochemical effects of acidosis on bone calcium flux and surface ion composition. *J Bone Miner Res* 1993;8(1):93-102.
48. Bushinsky DA. Net proton influx into bone during metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol* 1988;254(3 Pt 2):F306-10.
49. Bushinsky DA. Net calcium efflux from live bone during chronic metabolic, but not respiratory, acidosis. *Am J Physiol* 1989;256(5 Pt 2):F836-42.

50. Bushinsky DA, Krieger NS, Geisser DI, Grossman EB, Coe FL. Effects of pH on bone calcium and proton fluxes in vitro. *Am J Physiol* 1983;245(2):F204-9.
51. Bushinsky DA, Lechleider RJ. Mechanism of proton-induced bone calcium release: calcium carbonate-dissolution. *Am J Physiol* 1987;253(5 Pt 2):F998-1005.
52. Disthabanchong S, Martin KJ, McConkey CL, Gonzalez EA. Metabolic acidosis up-regulates PTH/PTHrP receptors in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Kidney Int* 2002;62(4):1171-7.
53. Frick KK, Jiang L, Bushinsky DA. Acute metabolic acidosis inhibits the induction of osteoblastic egr-1 and type 1 collagen. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):C1450-6.
54. Frick KK, Bushinsky DA. Chronic metabolic acidosis reversibly inhibits extracellular matrix gene expression in mouse osteoblasts. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt 2):F840-7.
55. Frick KK, Bushinsky DA. In vitro metabolic and respiratory acidosis selectively inhibit osteoblastic matrix gene expression. *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 2):F750-5.

Figure 1 - Blood gas parameters in acidotic (AC) and control (C) rats.

Panel A: pH levels at 14 and 42 protocol day.



* $p < 0.05$; Paired Student t-test.

Figure 1 Panel B: Bicarbonate levels at 14 and 42 protocol day.

* $p < 0.05$; Paired Student t-test.

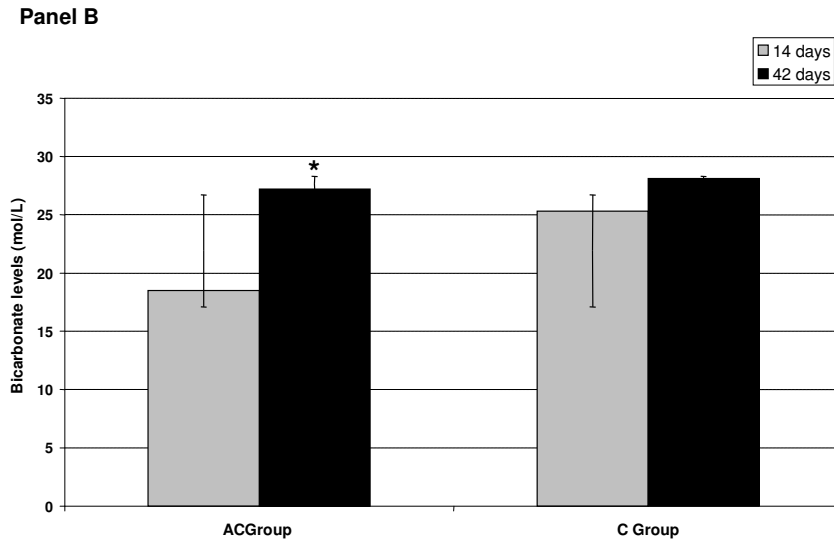
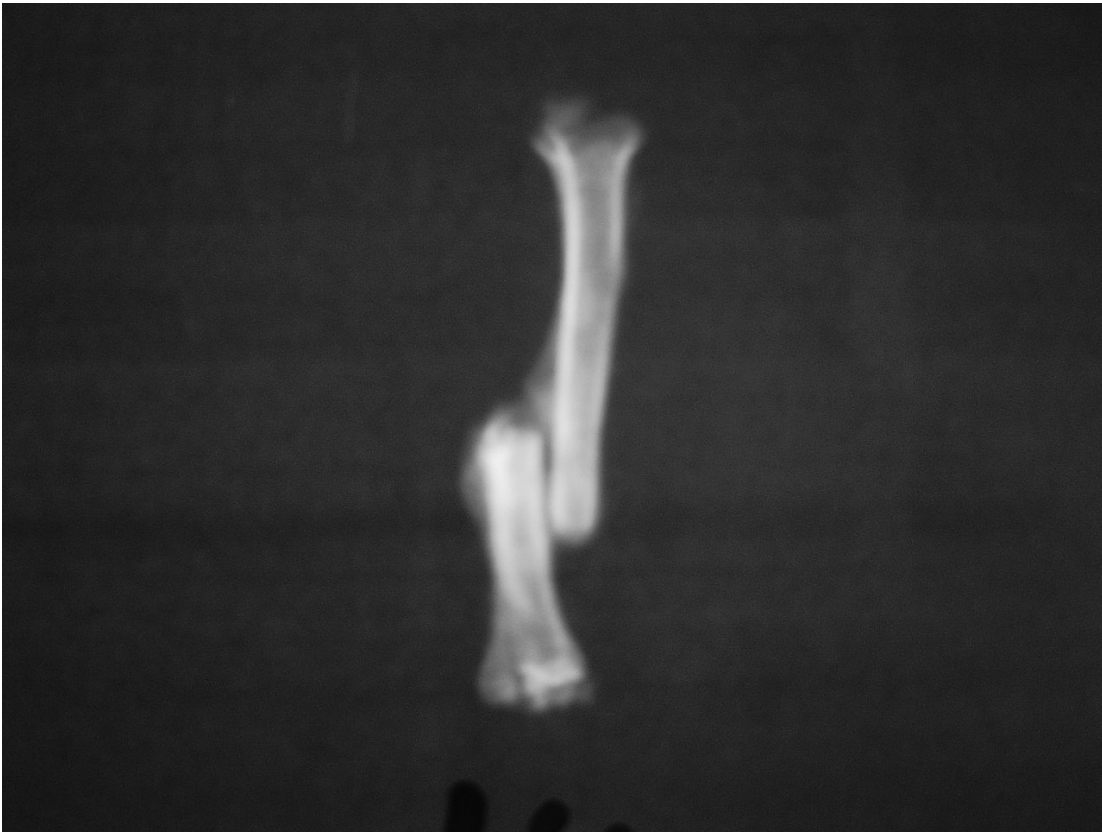


Figure 2 – Representative radiographs of isolated tibia four weeks after the fracture.

Panel A: control group.

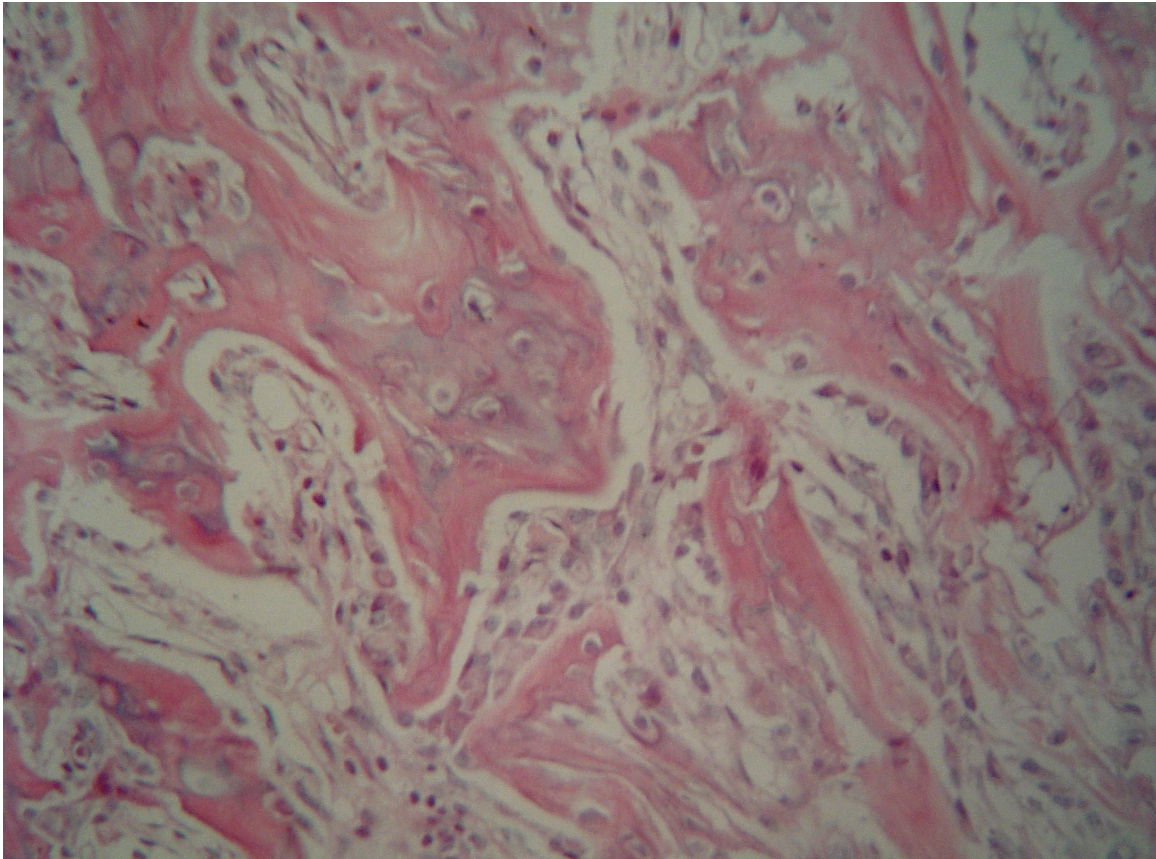


Panel B: acidotic rats.



\

Figure 3 – Representative histological sections of isolated tibia four weeks after the fracture. Panel A: complete bone union (grade 4) in a control rat. Immature bone trabeculae are observed outlined by numerous active osteoblasts in rows and osteoclasts in resorption activity. (HE, 20X).



Panel B: fracture nonunion in an acidotic rat. There is pseudoarthrosis formation with a cavity with a wall formed by chondroid and granulation tissue (HE, 20X).

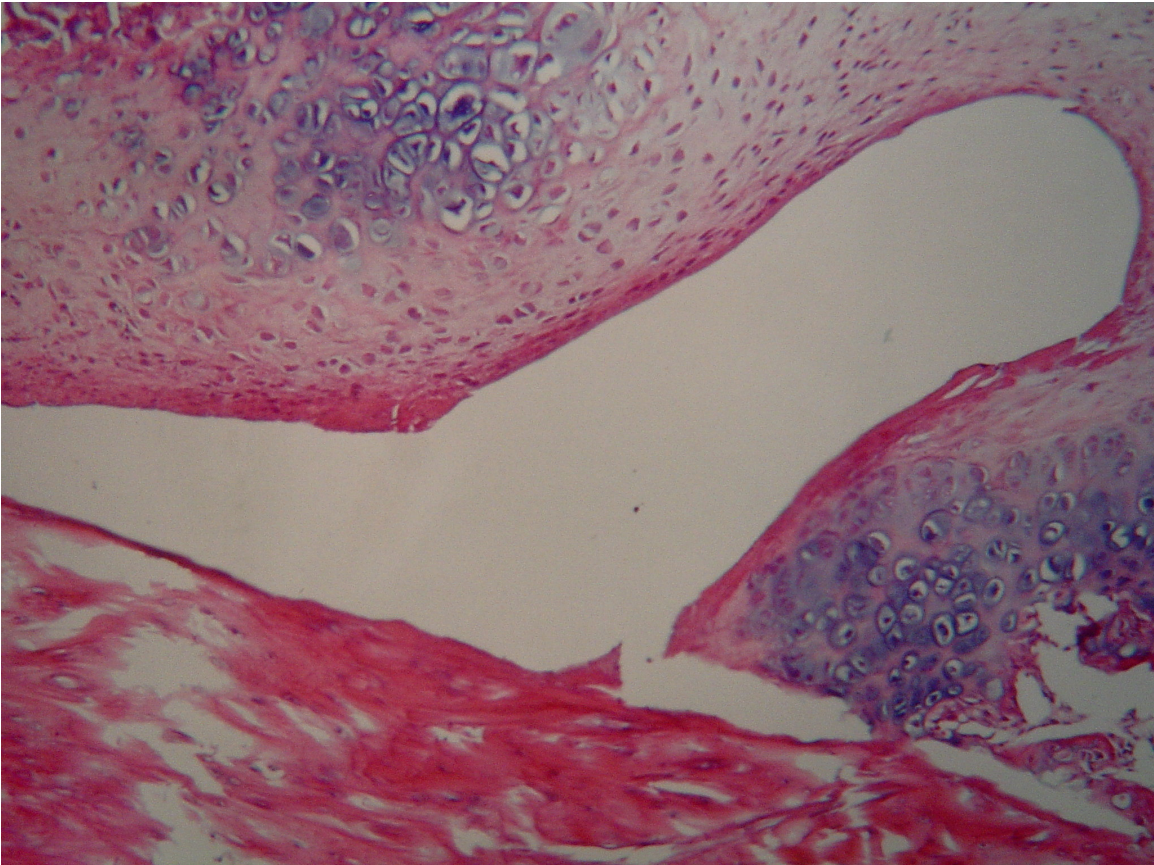


Table 1 – Biochemical parameters in acidotic (AC) and control (C) rats at the end of the experiment.

	C rats	AC rats
Creatinine mg/dL	0.36±0.084	0.37±0.142
Phosphate mg/dL	7.6±0.9	5.9±1.0 *
Ionic calcium mmol/L	1.33±0.035	1.32±0.07
Sodium mmol/L	5.8±0.89	5.6±0.95
Potassium mmol/L	137.9±1.6	137.8±1.7

* $p < 0.05$; Non-paired Student t-test.

Table 2 – Distribution of fracture repair grades and comparison between mean fracture healing score in acidotic and control rats.

	Pseudo-arthrosis formation 0	Incomplete cartilaginous union 1	Complete cartilaginous union 2	Incomplete bone union 3	Complete bone union 4	Mean fracture healing score
Control	1	0	2	4	3	2.8 ± 1.3
Acidotic	5	1	0	4	0	1.3 ± 1.5 *

P<0.05, Non-paired Student t-test.

Comentários finais

Os resultados desse estudo sugerem que a acidose metabólica crônica exerce efeito negativo sobre o processo de consolidação de uma fratura óssea. Nossos dados mostraram a capacidade do organismo em compensar a acidose metabólica provocada por uma sobrecarga ácida crônica paralelamente ao retardo de consolidação de uma fratura. O papel do tecido ósseo no controle da homeostase ácido-básica através de reabsorção de massa óssea é demonstrado nesse estudo.

Em concordância com estudos experimentais anteriores, esse estudo mostrou efeitos sistêmicos da acidose metabólica relacionados ao crescimento e ganho de peso. (1-3). Em comparação com o grupo controle, os ratos submetidos à sobrecarga de ácido não ganharam peso ao longo do estudo, mesmo recebendo uma dieta similar qualitativa e quantitativamente. Do ponto de vista clínico, a acidose metabólica atua como importante fator na inibição do crescimento em pacientes portadores de doenças renais como a IRC e a ATR (4-9). A inibição do crescimento exercida pela acidose metabólica tem sido atribuída ao efeito anti-anabólico nas fases de crescimento, relacionado à resistência ao GH e IGF-1. (1, 2, 10, 11). A acidose metabólica afeta ainda o metabolismo de proteínas, em alguns casos promovendo inibição de síntese de proteínas e, em outros, proteólise e oxidação de aminoácidos (12, 13). Tal efeito catabólico está diretamente relacionado com a desnutrição protéica, redução do crescimento e perda de massa muscular em crianças portadoras de doenças crônicas que cursam com acidose metabólica (11, 14).

Uma importante informação desse estudo diz respeito ao fosfato. Ao final do experimento, os animais do grupo AC apresentaram fosfato sérico reduzido comparativamente com os animais não acidóticos. A acidose metabólica causa perda

urinária de fosfato através da redução da reabsorção nos túbulos proximais independentemente do paratormônio (15, 16). No passado, alguns estudos não foram capazes de evidenciar redução nos níveis de fosfato relacionados com acidose crônica (17). Todavia, Krapf et al. (18) mostraram que a sobrecarga ácida provocada pela ingestão de NH_4Cl em humanos reduz os níveis séricos de fosfato. A hipofosfatemia provocada foi diretamente relacionada aos níveis de bicarbonato. A depleção leve de fosfato por si só estimula reabsorção e diminui a mineralização óssea (19, 20). A hipofosfatemia estimula ainda a produção do metabólico ativo da vitamina D ($1,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}$) que por sua vez é um importante estímulo para reabsorção óssea. Dessa forma, alterações no metabolismo do fosfato durante acidose metabólica desempenham importante papel na etiopatogênese da doença óssea associada com a acidose metabólica.

Relatos sobre o comportamento da vitamina D e do paratormônio na acidose metabólica, ambos diretamente relacionados com a concentração sérica de fosfato, são contraditórios. De modo geral, em estudos com animais, a acidose metabólica tem sido associada com redução da vitamina D (21). Entretanto, a acidose metabólica em humanos estimula a produção de vitamina D (18, 22). Investigações sobre os efeitos da acidose metabólica sobre o PTH não têm apresentado resultados consistentes. Em humanos a acidose metabólica parece reduzir a produção de PTH (17, 18). Alguns estudos experimentais, em contrapartida, demonstraram estímulo para produção de paratormônio, assim como aumento em seus efeitos biológicos na acidose metabólica (23, 24). Lopez et al. (25) avaliaram a resposta do PTH à acidose metabólica e respiratória prevenindo alterações na concentração do cálcio iônico. Os autores mostraram que indução de acidose aguda estimula a produção do PTH. Por outro lado, Kraut et al. (26) mostraram aumento da reabsorção e diminuição na formação óssea em ratos operados para ressecção

da glândula paratireóide e submetidos à acidose metabólica. Em outro estudo independente, Madias et al. (27) mostraram que ratos submetidos à ressecção da paratireóide e nefrectomia subtotal foram capazes de compensar acidose metabólica induzida por sobrecarga ácida. Considera-se, portanto, que a redução na formação e aumento da reabsorção óssea na acidose metabólica não seja mediada por alterações na secreção de PTH.

A consolidação de uma fratura óssea envolve a resposta celular de pelo menos quatro diferentes tecidos orgânicos: o osso cortical, o periósteo, a medula óssea e os tecidos miofasciais que envolvem o osso (28, 29). A consolidação de uma fratura é um processo dinâmico. Vários autores descrevem a seqüência de consolidação de uma fratura em ratos, didaticamente dividida em quatro fases distintas (29-33). Inicialmente ocorre uma resposta inflamatória com produção de citocinas. Nos primeiros 7-10 dias ocorre a maior atividade celular com proliferação de células mesenquimais, principalmente fibroblastos do periósteo. Nessa fase se inicia o processo de condrogênese com formação de cartilagem adjacente à fratura e formação óssea sob o periósteo. Durante a segunda semana o calo de fratura é composto basicamente por cartilagem rica em colágeno. Os condrócitos liberam proteases e fosfatases, dois grupos importantes de enzimas para preparar a matriz cartilaginosa para o processo de calcificação. Numa terceira fase, dita osteogênica, (aproximadamente três semanas pós-fratura) o calo ósseo é composto de cartilagem calcificada que gradualmente é removida e substituída por osso, em um processo semelhante à ossificação endocondral presente no embrião e na cartilagem epifisária de crescimento. A rica rede vascular do calo de fratura permite a invasão de células mesenquimais totipotentes que se diferenciam em células de linhagem osteoprogenitora para a formação dos osteoblastos. Finalmente, na quarta semana o calo

de fratura é composto de uma combinação entre cartilagem calcificada e tecido ósseo imaturo não lamelar recém formado. Nessa fase os osteoclastos são responsáveis pela remodelação do calo ósseo convergindo o osso imaturo em osso lamelar de maior resistência mecânica.

Através desse estudo, não foi possível esclarecer os mecanismos patofisiológicos pelos quais a acidose pode ser capaz de atrasar ou impedir a consolidação de uma fratura ou osteotomia óssea. No entanto algumas considerações devem ser feitas e algumas hipóteses consideradas, uma vez que a acidose metabólica provoca diversas alterações que podem exercer efeitos em distintas fases do processo de consolidação. A acidose metabólica tem efeito inibitório sobre a atividade dos osteoblastos e estimula as a atividade dos osteoclastos, favorecendo a absorção óssea em detrimento da neoformação de tecido osteóide, essencial para a consolidação de uma fratura (4, 16, 20, 34-50). Deficiência de cálcio e especialmente fosfato está relacionada com atraso na formação do calo de fratura (51). Como demonstrado nesse estudo, os níveis mais baixos de fosfato nos ratos acidóticos, comparados ao controle, podem ter contribuído para mineralização mais precária do calo de fratura e para o atraso na consolidação. Carbajo et al. (1) mostraram efeito inibitório da acidose metabólica sobre a proliferação celular cartilaginosa e sobre a formação óssea endocondral na placa fisária de crescimento em ratos. A ossificação endocondral é parte essencial no processo de consolidação de uma fratura. Dessa forma, o efeito da acidose no processo de ossificação endocondral pode ter sido outro fator responsável pelo menor índice médio de consolidação nos ratos acidóticos. Alguns fatores de crescimento celular são importantes na regulação do processo de consolidação de uma fratura. Deficiência de hormônio do crescimento, por exemplo, foi descrita como causa de pseudartrose por Misol et al. (52). A acidose

metabólica tem sido associada à resistência parcial a alguns fatores de crescimento, como o hormônio de crescimento e o fator de crescimento insulina símile tipo 1 culminando em um efeito anti-anabólico nos centros de crescimento ósseo com inibição da diferenciação e proliferação condroblástica (10) (2, 53). Esse efeito inibitório sobre os condrócitos pode ter sido outro fator para a menor taxa de consolidação dos ratos acidóticos.

O osso é um importante componente do sistema de tamponamento ácido-básico do organismo (34, 36, 39, 54). Nesse estudo, o efeito de tamponamento do tecido ósseo ficou evidenciado pelo comportamento do pH e do bicarbonato no início e no final no grupo acidótico. Após duas semanas de sobrecarga ácida o grupo acidótico apresentou níveis mais baixos de pH e bicarbonato em comparação com o grupo controle. Ao final do experimento, tanto para pH quanto para bicarbonato não foi encontrada diferença estatística significativa entre os dois grupos. Em contrapartida os níveis de pH e bicarbonato encontrados no grupo acidótico no final do experimento foram maiores do que no início do experimento, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Os animais do grupo acidótico ao longo do experimento foram capazes de compensar a sobrecarga ácida crônica à custa de reabsorção de massa óssea concomitantemente com uma menor taxa média de consolidação da fratura. Dessa forma podemos inferir que os animais ao final do experimento estavam em um estado de acidose compensada, não detectável laboratorialmente, mas mantinham reabsorção de massa óssea que atuava como mecanismo tampão. Esse estado de acidose subclínica e não detectável laboratorialmente foi descrita previamente e relacionada com dieta rica em proteína e o processo de envelhecimento atuando como uma possível etiologia da osteoporose senil (7, 14, 36, 54, 55).

Em países ocidentais industrializados a dieta rica em proteína animal gera em média 70 mEq de ácido por dia que são fisiologicamente excretado pelos rins como íons de amônia e ácido titulável (55). Em resposta a um balanço ácido positivo a concentração sérica de bicarbonato e o pH sanguíneo reduzem e mecanismos de homeostase são ativados. O aumento da excreção ácida pelos rins não corresponde à magnitude da sobrecarga ácida gerada por uma dieta enriquecida em proteínas ao longo da vida (55). Assim sendo, a concentração de bicarbonato e o pH são restabelecidos então através do sistema tampão ósseo que continuamente consome massa óssea. Com o processo de envelhecimento ocorre uma diminuição global na função renal, incluindo uma menor capacidade de excreção ácida (55-58). A redução da capacidade de excreção de ácidos pelos rins com o aumento da idade, somada à contínua ingestão de dieta precursora de ácido ao longo da vida resulta em uma discreta, porém significativa, acidemia no indivíduo idoso (7, 36, 54, 55, 57, 58). Tal estado de acidemia com bicarbonato normal foi classificado como “eubicarbonatemic metabolic acidosis” por Alpern e Sakhaee (55) e pode ser encontrado em condições clínicas que cursam com perda gastrintestinal crônica leve de bicarbonato, na acidose tubular renal incompleta, na insuficiência renal leve e incipiente, no processo de envelhecimento em casos de dieta com excesso de proteínas. Esse estudo evidenciou *in vivo* um modelo experimental dessa condição subclínica de acidemia não detectável laboratorialmente e compensada pelo consumo de massa óssea que, paralelamente, culminou em atraso da consolidação de uma fratura óssea.

Finalmente vale ressaltar que o presente trabalho representa o início de uma linha de pesquisa que, em razão de sua relevância, impõe a realização de novos estudos, como por exemplo, a avaliação mais aprofundada da fisiologia renal e óssea na acidose

metabólica. Nesse sentido, pretendemos estudar o efeito da acidose metabólica sobre a consolidação de uma fratura em animais submetidos à nefrectomia unilateral em comparação com um grupo controle de cirurgia fictícia. Outro ponto a ser explorado é a avaliação da força de resistência biomecânica de um osso submetido à acidose metabólica crônica. Também buscamos avançar na avaliação histológica do tecido ósseo, através de aplicação de medidas de morfometria tecidual. Portanto, fica evidenciado que esse estudo abre inúmeras possibilidades para o maior entendimento da fisiopatologia da interação entre o osso e o rim no processo de manutenção do equilíbrio metabólico do organismo humano.

Referências Bibliográficas

1. Carbajo E, Lopez JM, Santos F, Ordonez FA, Nino P, Rodriguez J. Histologic and dynamic changes induced by chronic metabolic acidosis in the rat growth plate. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(6):1228-34.
2. Green J, Maor G. Effect of metabolic acidosis on the growth hormone/IGF-I endocrine axis in skeletal growth centers. *Kidney Int* 2000;57(6):2258-67.

3. Boirie Y, Broyer M, Gagnadoux MF, Niaudet P, Bresson JL. Alterations of protein metabolism by metabolic acidosis in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 2000;58(1):236-41.
4. Bushinsky DA. The contribution of acidosis to renal osteodystrophy. *Kidney Int* 1995;47(6):1816-32.
5. Domrongkitchaiporn S, Pongsakul C, Stitchantrakul W, Sirikulchayanonta V, Ongphiphadhanakul B, Radinahamed P, et al. Bone mineral density and histology in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2001;59(3):1086-93.
6. Domrongkitchaiporn S, Pongskul C, Sirikulchayanonta V, Stitchantrakul W, Leeprasert V, Ongphiphadhanakul B, et al. Bone histology and bone mineral density after correction of acidosis in distal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2002;62(6):2160-6.
7. Weger W, Kotanko P, Weger M, Deutschmann H, Skrabal F. Prevalence and characterization of renal tubular acidosis in patients with osteopenia and osteoporosis and in non-porotic controls. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(7):975-80.
8. Dabbagh S. Renal osteodystrophy. *Curr Opin Pediatr* 1998;10(2):190-6.
9. Lemann J, Jr., Adams ND, Wilz DR, Brenes LG. Acid and mineral balances and bone in familial proximal renal tubular acidosis. *Kidney Int* 2000;58(3):1267-77.
10. Green J, Goldberg R, Maor G. PTH ameliorates acidosis-induced adverse effects in skeletal growth centers: the PTH-IGF-I axis. *Kidney Int* 2003;63(2):487-500.
11. Wiederkehr M, Krapf R. Metabolic and endocrine effects of metabolic acidosis in humans. *Swiss Med Wkly* 2001;131(9-10):127-32.
12. Reaich D, Channon SM, Scrimgeour CM, Goodship TH. Ammonium chloride-induced acidosis increases protein breakdown and amino acid oxidation in humans. *Am J Physiol* 1992;263(4 Pt 1):E735-9.

13. Price SR, Mitch WE. Metabolic acidosis and uremic toxicity: protein and amino acid metabolism. *Semin Nephrol* 1994;14(3):232-7.
14. Franch HA, Mitch WE. Catabolism in uremia: the impact of metabolic acidosis. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(12 Suppl):S78-81.
15. Ambuhl PM, Zajicek HK, Wang H, Puttaparthi K, Levi M. Regulation of renal phosphate transport by acute and chronic metabolic acidosis in the rat. *Kidney Int* 1998;53(5):1288-98.
16. Disthabanchong S, Domrongkitchaiporn S, Sirikulchayanonta V, Stitchantrakul W, Karnsombut P, Rajatanavin R. Alteration of noncollagenous bone matrix proteins in distal renal tubular acidosis. *Bone* 2004;35(3):604-13.
17. Adams ND, Gray RW, Lemann J, Jr. The calciuria of increased fixed acid production in humans: evidence against a role for parathyroid hormone and 1,25(OH)₂-vitamin D. *Calcif Tissue Int* 1979;28(3):233-8.
18. Krapf R, Vetsch R, Vetsch W, Hulter HN. Chronic metabolic acidosis increases the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D in humans by stimulating its production rate. Critical role of acidosis-induced renal hypophosphatemia. *J Clin Invest* 1992;90(6):2456-63.
19. Baylink D, Wergedal J, Stauffer M. Formation, mineralization, and resorption of bone in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest* 1971;50(12):2519-30.
20. 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(5):694-700.
21. Langman CB. Calcitriol metabolism during chronic metabolic acidosis. *Semin Nephrol* 1989;9(1):65-71.

22. Mahlbacher K, Sicuro A, Gerber H, Hulter HN, Krapf R. Growth hormone corrects acidosis-induced renal nitrogen wasting and renal phosphate depletion and attenuates renal magnesium wasting in humans. *Metabolism* 1999;48(6):763-70.
23. Coe FL, Firpo JJ, Jr., Hollandsworth DL, Segil L, Canterbury JM, Reiss E. Effect of acute and chronic metabolic acidosis on serum immunoreactive parathyroid hormone in man. *Kidney Int* 1975;8(4):263-73.
24. Beck N, Webster SK. Effects of acute metabolic acidosis on parathyroid hormone action and calcium mobilization. *Am J Physiol* 1976;230(1):127-31.
25. Lopez I, Aguilera-Tejero E, Felsenfeld AJ, Estepa JC, Rodriguez M. Direct effect of acute metabolic and respiratory acidosis on parathyroid hormone secretion in the dog. *J Bone Miner Res* 2002;17(9):1691-700.
26. Kraut JA, Gordon EM, Ransom JC, Coburn JW, Kurokawa K. The effect of chronic metabolic acidosis on the end organ responsiveness to parathyroid hormone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56(3):619-22.
27. Madias NE, Johns CA, Homer SM. Independence of the acute acid-buffering response from endogenous parathyroid hormone. *Am J Physiol* 1982;243(2):F141-9.
28. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998(355 Suppl):S7-21.
29. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 2005;19(10 Suppl):S4-6.
30. Udupa KN, Prasad GC. Chemical and Histochemical Studies on the Organic Constituents in Fracture Repair in Rats. *J Bone Joint Surg Br* 1963;45:770-9.
31. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop Relat Res* 1989(248):294-309.

32. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res* 1989(248):283-93.
33. Urist MR MF. Calcification in the callus in healing fractures in normal rats. *J Bone Joint Surg Am* 1941;XXIII(1):1-15.
34. Bushinsky DA. Acidosis and bone. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20(1-2):40-52.
35. Bushinsky DA. Stimulated osteoclastic and suppressed osteoblastic activity in metabolic but not respiratory acidosis. *Am J Physiol* 1995;268(1 Pt 1):C80-8.
36. Bushinsky DA. Acid-base imbalance and the skeleton. *Eur J Nutr* 2001;40(5):238-44.
37. Bushinsky DA, Chabala JM, Gavrillov KL, Levi-Setti R. Effects of in vivo metabolic acidosis on midcortical bone ion composition. *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 2):F813-9.
38. Bushinsky DA, Gavrillov K, Stathopoulos VM, Krieger NS, Chabala JM, Levi-Setti R. Effects of osteoclastic resorption on bone surface ion composition. *Am J Physiol* 1996;271(4 Pt 1):C1025-31.
39. Bushinsky DA, Ori Y. Effects of metabolic and respiratory acidosis on bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993;2(4):588-96.
40. Disthabanchong S, Martin KJ, McConkey CL, Gonzalez EA. Metabolic acidosis up-regulates PTH/PTHrP receptors in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Kidney Int* 2002;62(4):1171-7.
41. Frick KK, Bushinsky DA. Chronic metabolic acidosis reversibly inhibits extracellular matrix gene expression in mouse osteoblasts. *Am J Physiol* 1998;275(5 Pt 2):F840-7.

42. Frick KK, Bushinsky DA. In vitro metabolic and respiratory acidosis selectively inhibit osteoblastic matrix gene expression. *Am J Physiol* 1999;277(5 Pt 2):F750-5.
43. Frick KK, Bushinsky DA. Metabolic acidosis stimulates RANKL RNA expression in bone through a cyclo-oxygenase-dependent mechanism. *J Bone Miner Res* 2003;18(7):1317-25.
44. Frick KK, Jiang L, Bushinsky DA. Acute metabolic acidosis inhibits the induction of osteoblastic egr-1 and type 1 collagen. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):C1450-6.
45. Jara A, Chacon C, Valdivieso A, Ibaceta M. [Effect of PTH, phosphate, and metabolic acidosis on the progression of renal insufficiency in the azotemic rat]. *Nefrologia* 2003;23 Suppl 2:37-42.
46. Kraut JA. The role of metabolic acidosis in the pathogenesis of renal osteodystrophy. *Adv Ren Replace Ther* 1995;2(1):40-51.
47. Krieger NS, Bushinsky DA, Frick KK. Cellular mechanisms of bone resorption induced by metabolic acidosis. *Semin Dial* 2003;16(6):463-6.
48. Krieger NS, Frick KK, Bushinsky DA. Mechanism of acid-induced bone resorption. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13(4):423-36.
49. Krieger NS, Parker WR, Alexander KM, Bushinsky DA. Prostaglandins regulate acid-induced cell-mediated bone resorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(6):F1077-82.
50. Krieger NS, Sessler NE, Bushinsky DA. Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro. *Am J Physiol* 1992;262(3 Pt 2):F442-8.
51. Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL, Jr. Pathophysiology of delayed healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998(355 Suppl):S31-40.

52. Misol S, Samaan N, Ponseti IV. Growth hormone in delayed fracture union. *Clin Orthop Relat Res* 1971;74:206-8.
53. Kuemmerle N, Krieg RJ, Jr., Latta K, Challa A, Hanna JD, Chan JC. Growth hormone and insulin-like growth factor in non-uremic acidosis and uremic acidosis. *Kidney Int Suppl* 1997;58:S102-5.
54. Bushinsky DA, Frick KK. The effects of acid on bone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000;9(4):369-79.
55. Alpern RJ, Sakhaee K. The clinical spectrum of chronic metabolic acidosis: homeostatic mechanisms produce significant morbidity. *Am J Kidney Dis* 1997;29(2):291-302.
56. Levi M RJ. Renal Function and dysfunction in aging. In: Seldim DW GG, editor. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. 2 ed. New York, NY: Raven; 1992. p. 3433-3456.
57. Frassetto L, Sebastian A. Age and systemic acid-base equilibrium: analysis of published data. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996;51(1):B91-9.
58. Frassetto LA, Morris RC, Jr., Sebastian A. Effect of age on blood acid-base composition in adult humans: role of age-related renal functional decline. *Am J Physiol* 1996;271(6 Pt 2):F1114-22.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)