



Efecto de la PTH, fosfato y acidosis metabólica en la progresión de la insuficiencia renal en la rata azotémica

A. Jara, C. Chacón, A. Valdivieso y M. Ibaceta

Departamento de Nefrología. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

RESUMEN

Se ha demostrado que la acidosis metabólica (AM) inducida por cloruro de amonio (NH_4Cl) enlentece la progresión del daño renal en ratas con nefrectomía 5/6 (NFX) y dieta alta en fósforo (P).

Objetivo: Evaluar el rol de una dieta restringida en fósforo, 0,05%P (DBP) y de la paratiroidectomía (PTX) en el efecto protector de la AM inducida por NH_4Cl sobre la progresión del daño renal en ratas azotémicas.

Resultados: Las ratas azotémicas sometidas a una DBP tuvieron niveles de PTH más bajos que ratas normales con 0,6%P en la dieta ($39,0 \pm 12$ vs $64,6 \pm 12$ pg/ml; $p < 0,05$). La administración de ácido por 30 días a ratas con DBP o PTX disminuyó la creatinemia (DBP: $0,67 \pm 0,03$ vs $0,54 \pm 0,02$ mg/dl, $p < 0,05$; PTX: $0,80 \pm 0,06$ vs $0,6 \pm 0,04$ mg/dl, $p < 0,05$) y mejoró el aclaramiento de creatinina (DBP: $2,6 \pm 0,2$ vs $3,5 \pm 0,2$ ml/min, $p < 0,05$; PTX: $2,4 \pm 0,2$ vs $3,5 \pm 0,2$ ml/min, $p < 0,05$). La PTX no evitó la progresión del daño renal y el contenido de calcio renal (KCa) fue el doble del observado en ratas azotémicas con DBP y 100 veces mayor al de ratas normales (103 ± 18 vs 48 ± 13 y $0,80 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/g}$ respectivamente, $p < 0,01$). La carga de ácido disminuyó el KCa en ratas con DBP o PTX ($32 \pm 9,0$ vs 48 ± 13 $\mu\text{mol/g}$ y $53,9 \pm 9,8$ vs 103 ± 18 $\mu\text{mol/g}$ respectivamente; $p < 0,05$). El peso del tejido renal remanente (kwt) fue significativamente mayor en las ratas que recibieron ácido (DBP: $5,4 \pm 0,3$ vs $4,1 \pm 0,2$ mg/g; $p < 0,05$; PTX: $8,9 \pm 0,5$ vs $4,8 \pm 0,4$ mg/g; $p < 0,05$).

Conclusiones: 1) la AM mejoró la función renal, disminuyó el contenido de calcio renal (KCa) y aumentó el peso del riñón remanente (kwt) en ratas azotémicas con DBP o PTX; 2) la PTX no evitó la progresión del daño renal ni el depósito de calcio renal; 3) una DBP en ratas azotémicas no evitó del aumento de contenido de calcio renal.

Palabras clave: PTH. Acidosis metabólica. Paratiroidectomía. Insuficiencia renal crónica.

ROLE OF PTH, PHOSPHATE, AND METABOLIC ACIDOSIS IN THE PROGRESSION OF RENAL DISEASE IN AZOTEMIC RATS

SUMMARY

In a previous study we have observed that NH₄Cl-induced metabolic acidosis halted the progression of renal disease in azotemic rats with a high phosphate diet. We hypothesized that NH₄Cl-induced metabolic acidosis may exert its protective effect by decreasing renal calcium content independent of serum levels of PTH and phosphate loading. To test this hypothesis we studied azotemic rats with very low phosphate diet or parathyroidectomy. Rats with low phosphate diet and parathyroidectomized rats developed renal failure after 5/6 nephrectomy, and in both groups the acid loading significantly decreased the progression of renal disease. Calcium renal content increased in both groups, even in rats with low phosphate diet, and this effect was also significantly decreased after an acid loading. Rats with acid loading developed greater hypertrophy of renal tissue than rats without acid loading. We conclude that NH₄Cl-induced metabolic acidosis halted the progression of renal disease by decreasing calcium precipitation on renal tissue. Parathyroidectomy did not prevent progression of renal disease nor calcium precipitation, and a low phosphate diet in azotemic rats did not prevent increased calcium content on remnant renal tissue.

Key words: PTH. Phosphorous. Metabolic acidosis. Parathyroidectomy. Chronic renal failure.

INTRODUCCIÓN

En la evolución de la insuficiencia renal crónica se produce progresivamente acidosis metabólica e hiperfosfemia. Se ha sugerido que ambos trastornos podrían jugar un rol en la progresión de la insuficiencia renal^{1,2}. Diversos estudios experimentales y clínicos han demostrado que una dieta elevada en fósforo en animales y en sujetos azotémicos provoca una marcada hiperfosfemia e hipocalcemia, exacerba la magnitud del hiperparatiroidismo secundario e induce un marcado daño óseo de alto recambio, reduce aún más la producción de calcitriol, y acelera la progresión de la insuficiencia renal^{1,3-5}. Por otra parte, se ha señalado que la administración de ácido en sujetos y en animales normales aumenta la excreción de calcio urinario y produce fosfaturia independiente de la hormona paratiroidea (PTH). En sujetos urémicos afectaría directamente el desarrollo de la osteodistrofia renal al aumentar la reabsorción ósea y disminuir la función osteoblástica⁶. El rol que la acidosis metabólica pudiera tener en el daño renal progresivo ha sido menos establecido, aunque se ha sugerido que contribuiría a la progresión de la insuficiencia renal^{2,7}.

Diversos autores han descrito que la carga de fósforo a animales azotémicos y el hiperparatiroidis-

mo aceleran la progresión de la insuficiencia renal³⁻⁵. Se postula que el depósito de calcio-fósforo en el área túbulo-intersticial jugaría un rol importante en el daño renal progresivo^{4,5}. En ratas azotémicas sometidas a una dieta elevada en proteínas, la paratiroidectomía redujo la progresión del daño renal⁸. Se ha sugerido que la acidosis metabólica también podría contribuir a la progresión del daño renal^{2,7}. Se ha propuesto que el aumento en la producción de amonio por las nefronas remanentes produciría el compromiso preferentemente túbulo-intersticial en la insuficiencia renal progresiva⁷⁻⁹. Sin embargo, un estudio previo de nuestro grupo demostró que la inducción de acidosis metabólica por administración de Cloruro de Amonio (NH₄Cl) a ratas con nefrectomía 5/6 y alimentadas con una dieta elevada en fósforo, disminuyó significativamente la progresión de la insuficiencia renal¹⁰. Este efecto se atribuyó a una mayor respuesta fosfática en la rata acidótica, lo que a su vez habría determinado una menor elevación de los niveles de PTH. El objetivo del presente estudio es evaluar si la inducción de acidosis metabólica en ratas azotémicas disminuye la progresión del daño renal aún en presencia de una dieta pobre en fósforo y en ausencia de niveles elevados de PTH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo experimental

A ratas Sprague-Dawley macho de peso entre 160 y 180 g se les efectuó nefrectomía 5/6 (NFX) u operación ficticia (OF). A un grupo se les efectuó paratiroidectomía selectiva (PTX). Los animales se separaron en 5 grupos: *Grupo Normal*: OF-0,6%P; *Grupo DBP*: NFX-0,05%P; *Grupo DBP-Ac*: NFX-0,05%P + Ácido; *Grupo PTX*: NFX-0,6%P-PTX; *Grupo PTX-Ac*: NFX-0,6%P-PTX + Ácido. Todas las ratas fueron mantenidas en cajas individuales y alimentadas pareadamente durante las 4 semanas de estudio. Todas las dietas tenían igual contenido de calcio (0,6%) y de vitamina D, 100 UI/100 g de dieta (ICN, Cleveland, Ohio, USA). El ácido (NH_4Cl 0,75% ó 0,375% en ratas PTX) se administró en el agua de bebida.

Análisis bioquímico

El calcio total y fósforo sérico y urinario fueron medidos por autoanalizador en la forma habitual. El pH, pCO_2 y bicarbonato arterial se determinaron anaeróticamente (Ciba Corning Diagnostica, MA, USA). La PTH sérica fue determinada por análisis inmunoradiométrico (Immunotopics, San Clemente, CA, USA). El contenido renal de calcio se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica y horno de grafito, después de incinerar el tejido renal a 800 °C y disolver el residuo en ácido clorhídrico 1.0 N¹¹.

Análisis estadístico

Los resultados son presentados como media \pm error estándar. Dependiendo de la distribución de los datos se usó ANOVA o el test de Kruskal-Wallis para la comparación entre todos los grupos; cuando se observaron diferencias significativas entre los grupos se efectuó el test de comparación múltiple de Duncan o Conover, respectivamente. Para la comparación de los grupos de acuerdo al aporte de ácido se usó el test de Mann-Whitney. Se utilizó el software estadístico NCSS (California, USA). Una $p < 0,05$ fue considerada significativa.

Resultados

Como era de esperar, el pH y el bicarbonato sérico fueron más bajos en los grupos de ratas que recibieron ácido (pH: $7,38 \pm 0,02$ y $7,32 \pm 0,02$ vs

$7,23 \pm 0,04$ y $7,29 \pm 0,01$; $p < 0,05$; HCO_3^- : $23,6 \pm 1,1$ y $23,2 \pm 0,9$ vs $22,0 \pm 1,5$ y $20,2 \pm 0,8$ mmol/L; NFX-0,05%P y NFX-0,6%P-PTX respectivamente). La creatinemia (Cr) fue menor y el aclaramiento de creatinina (Clcr) fue mayor en los dos grupos de ratas azotémicas que recibieron la carga de ácido (tabla I). Como se esperaba, los niveles de PTH sérica no se elevaron en el grupo de ratas azotémicas con dieta muy baja en fósforo. Se observó una disminución significativa en los niveles de PTH en las ratas azotémicas que recibieron ácido (39 ± 12 vs $23,3 \pm 8$ pg/ml, $p < 0,05$) (tabla I). En estas ratas, la significativa disminución de los niveles de PTH cuando los animales reciben ácido se debería al menor compromiso de la función renal. Del mismo modo, las ratas con PTX que recibieron ácido también tuvieron un menor deterioro de la función renal (Clcr $3,5 \pm 0,2$ vs $2,4 \pm 0,2$ ml/min, $p < 0,05$). Las ratas PTX tuvieron una marcada hiperfosfatemia, aunque significativamente menor en el grupo que recibió ácido ($10,9 \pm 0,5$ vs $12,5 \pm 0,4$ mg/dl, $p < 0,05$) (tabla I). Este grupo tuvo niveles de fósforo sérico marcadamente elevados comparados con las ratas NFX con paratiroides intactas que recibieron una dieta muy baja en fósforo; pese a ello la función renal fue significativamente mejor (Clcr $3,5 \pm 0,2$ vs $2,6 \pm 0,2$ ml/min, $p < 0,05$).

En los grupos de ratas con nefrectomía 5/6 (NFX), sea con dieta muy baja en fósforo o paratiroidectomizadas, el peso fue menor en aquellos animales que recibieron ácido lo que pudo estar determinado por el aumento del catabolismo inducido por la acidosis metabólica, como se evidencia en el aumento significativo de la excreción urinaria de nitrógeno ureico comparado con las ratas que no recibieron NH_4Cl (tabla II).

Los hallazgos más destacables fueron el aumento del contenido de calcio tisular renal en las ratas azotémicas, donde se observaron valores mayores de 50 veces lo detectado en ratas normales ($0,80 \pm 0,09$ vs 48 ± 13 $\mu\text{mol/g}$, NFX-0,05%P y 103 ± 18 $\mu\text{mol/g}$, NFX-0,6%P-PTX; $p < 0,01$), y como la inducción de acidosis metabólica disminuyó marcadamente el contenido de calcio renal (tabla I).

El volumen urinario fue mayor en los grupos de ratas azotémicas que recibieron ácido comparado con las ratas que no lo recibieron. Esto puede ser explicado en parte por la mayor excreción de calcio urinario observado en los grupos que recibieron ácido (fracción excretada de calcio $0,011 \pm 0,001$ vs $0,007 \pm 0,001$, $p < 0,01$). Otro hallazgo significativo fue el aumento de peso del tejido renal remanente en las ratas que recibieron ácido ($5,4 \pm 0,3$ vs $4,1 \pm 0,2$ mg/g peso, NFX-0,05%P-Ac(+) vs Ac(-), $p < 0,05$; $8,9 \pm 0,5$ vs $4,8 \pm 0,4$ mg/g peso, PTX-Ac(+) vs Ac(-), $p < 0,05$).

A. JARA y cols.

Tabla I. Valores sanguíneos, contenido de calcio renal y peso de tejido renal remanente de ratas normales, azotémicas y paratiroidectomizadas con o sin aporte de calcio

	Cr mg/dl	Cl Cr ml/min	Ca mg/dl	PO4 mg/dl	PTH pg/ml	KCa μmol/g	kWt g 100 g
PF-0,6%P-Ac(-)	0,28 ± 0,01	6,65 ± 0,6	10,2 ± 0,15	6,15 ± 0,14	64,6 ± 12	0,80 ± 0,09	3,5 ± 0,1
NFX-0,05%P-Ac(-)	0,67 ± 0,03#	2,60 ± 0,2#	11,6 ± 0,20	8,20 ± 0,52#	39,0 ± 12#	48,0 ± 13#	4,1 ± 0,2#
NFX-0,05%P-Ac(+)	0,54 ± 0,02*#	3,50 ± 0,2*#	10,8 ± 0,30	6,20 ± 0,47#	23,3 ± 8,0*#	32,0 ± 9*#	5,4 ± 0,3*#
PTX-0,6%P-Ac(-)	0,80 ± 0,06#	2,38 ± 0,2#	6,44 ± 0,20#	12,5 ± 0,40#	7,08 ± 1,6#	103 ± 18#	4,8 ± 0,4*#
PTX-0,6%P-Ac(+)	0,60 ± 0,04*#	3,50 ± 0,2*#	6,70 ± 0,20#	10,9 ± 0,50*#	4,18 ± 1,6#	53,9 ± 9,8*	8,9 ± 0,5*#

Resultados se muestran como promedio ± error estándar.

Abreviaturas son: OF: operación ficticia; Ac: ácido (NH₄Cl); NFX: nefrectomía 5/6; %P: contenido de fósforo en la dieta; PTX: paratiroidectomía; Ca: calcemia; PO4: fosfemia; KCa: contenido de calcio en el tejido renal; kWt: peso del tejido renal remanente.

* p < 0,01 vs grupo sin ácido.

p < 0,05 vs OF-Ac(-).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que la inducción de acidosis metabólica en ratas con nefrectomía 5/6 desacelera la progresión de la insuficiencia renal y demuestran que la acidosis minimiza el depósito de calcio en el tejido renal, lo que explicaría el rol protector de la acidosis metabólica sobre la función renal en nuestras ratas azotémicas.

La protección sobre la función renal inducida por la acidosis metabólica en nuestro estudio fue observada en ratas azotémicas aun cuando recibieron una dieta muy restringida en fósforo. El rol del fósforo en la progresión de la insuficiencia renal ha sido postulado desde hace mucho tiempo. Sin embargo, aunque varios estudios experimentales señalan que una restricción de fósforo en la dieta disminuiría la progresión del daño renal, ha sido difícil demostrar que el menor deterioro en la filtración glomerular observado con una dieta baja en fósforo no estuvo determinado por la simultánea restricción proteica en la dieta. Por otra parte, hay evidencias de que el fósforo sería nefrotóxico *per se*, independiente de la carga proteica. En estos estudios, las ratas que reci-

bieron menor ingesta de fósforo tuvieron un menor contenido renal de calcio y fósforo y una mayor supervivencia. De este modo, pareciera que el depósito de calcio y fósforo precede al deterioro de la función renal.

Por otro lado, estudios en modelos de riñón remanente demostraron que un contenido elevado de fósforo en la dieta aceleraría la progresión del daño renal. Sin embargo, al interpretar estos resultados se debe considerar que estas ratas recibieron además un mayor contenido de sodio y proteínas¹²⁻¹⁵. En el estudio de Haut y cols., en ratas con nefrectomía 1/3, se pudo observar a las 7 semanas de seguimiento, un aclaramiento de creatinina significativamente menor en el grupo que recibió una dieta con alto contenido de fósforo (2,0% vs 0,5%)⁴. Este mayor deterioro funcional se asoció a un mayor depósito de calcio y fósforo en el riñón remanente. Estas calcificaciones tubulares fueron más prominentes cerca de la unión corticomedular. La gravedad de las lesiones histológicas y el peso del riñón remanente se correlacionó positivamente con el contenido de calcio y fósforo en el riñón. La incidencia de glomeruloesclerosis, daño túbulo-intersticial, y el contenido de

Tabla II. Valores urinarios de ratas normales, azotémicas y paratiroidectomizadas con o sin aporte de ácido

	Vol ml/24 h	NUU mg/dl	NUU mg/24 h/100 g	Ca mg/24 h	FeCa %	Ca mg/24 h/100 g	PO ₄ mg/24 h	FePO ₄ %	PO ₄ mg/24 h/100 g
PF-0,6%P-Ac(-)	7,5 ± 1,6	184 ± 15	70,7 ± 5,7	0,33 ± 0,08	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,03	21,3 ± 1,5	15,1 ± 1,6	8,23 ± 0,6
NFX-0,05%P-Ac(-)	,83 ± 1,2#	230 ± 38	93,1 ± 16	5,76 ± 1,70#	0,007 ± 0,001#	2,25 ± 0,61#	0,025 ± 0,008#	0,014 ± 0,004#	0,009 ± 0,00
NFX-0,05%P-Ac(+)	8,61 ± 0,8*#	293 ± 17*	118 ± 7,4*	7,52 ± 0,97*#	0,011 ± 0,001*#	3,04 ± 0,40*#	0,058 ± 0,006*#	0,034 ± 0,004*#	0,02 ± 0,003
PTX-0,6%P-Ac(-)	10,3 ± 1,6#	192 ± 13	82,7 ± 5,7#	1,51 ± 0,68#	2,88 ± 1,14#	0,64 ± 0,28#	28,0 ± 1,4#	30,8 ± 4,3#	12,0 ± 0,6#
PTX-0,6%P-Ac(+)	12,5 ± 1,2*#	230 ± 12*#	98,7 ± 6,3*#	2,13 ± 0,5*#	2,85 ± 0,55#	0,98 ± 0,23*#	30,3 ± 2,5#	24,8 ± 2,7#	13,0 ± 1,2#

Resultados se muestran como promedio ± error estándar. Abreviaturas son: OF: operación ficticia; Ac: ácido (NH₄Cl); NFX: nefrectomía 5/6; %P: contenido de fósforo en la dieta; PTX: paratiroidectomía.

* p < 0,01 vs grupo sin ácido.

p < 0,05 vs OF-Ac(-).

calcio renal se redujo significativamente en ratas azotémicas que recibieron quelante de fósforo⁵ o 3-fosfocitrato¹⁵, un inhibidor de la precipitación de fosfato de calcio y de la calcificación tisular. De este modo, el mecanismo involucrado en el daño renal por fósforo parece ser el daño túbulo-intersticial inducido por el depósito de calcio-fósforo. Se ha determinado que el capilar peritubular y el intersticio son los sitios más vulnerables para el depósito de calcio y fósforo¹⁶. Es difícil independizar el efecto del fósforo de la hormona paratiroidea (PTH) sobre el daño renal. Shigematsu y cols., demostraron en ratas con nefrectomía 5/6 y sometidas a una dieta con un contenido alto en proteínas (40%), que la paratiroidectomía prevenía el deterioro de la función renal y el aumento del contenido de calcio en el riñón, pese a que el contenido de fósforo en la dieta fue similar (0,8%) que en el grupo de ratas no paratiroidectomizadas⁸. Lamentablemente, la mayoría de los trabajos mencionados no hacen mención al efecto de los diferentes aportes de fósforo sobre la proteinuria y a diferencias en el estado ácido-base.

En relación a la acidosis metabólica, persiste la controversia sobre el efecto de ésta sobre el daño renal progresivo. Algunos autores han señalado que la acidosis metabólica puede acelerar el daño renal al promover injuria túbulo-intersticial por aumento de la amoniogénesis por los nefrones remanentes¹⁷. Sin embargo, otros grupos de investigación, pese a demostrar daño tubular inducido por la acidosis, no encontraron una mayor progresión de la insuficiencia renal en experimentos de corto plazo y en otros de tiempo más prolongado¹⁸. Estudios en ratas no urémicas revelan que la acidosis induce proteinuria y crecimiento renal^{19,20}. La causa de este crecimiento renal inducido por acidosis no ha sido establecida. Aunque se intentó explicar esta anomalía por la mayor carga nitrogenada secundaria al inducir acidosis por NH₄Cl, este efecto también se observó al producir acidosis sin aumentar la carga nitrogenada, usando HCl¹⁹.

El efecto protector de la carga de ácido en nuestro estudio actual no puede explicarse por el efecto fosfatúrico observado en nuestro estudio anterior con dieta elevada de fósforo, sino por minimizar en la célula tubular el depósito de calcio-fósforo que está aumentado incluso en las ratas que recibieron una dieta muy restringida en fósforo. Como la carga ácida disminuye el pH urinario, reduce también el riesgo de precipitación de fosfato de calcio. Además la acidosis aumenta la reabsorción de citrato urinario y es posible que en la célula tubular el citrato pueda funcionar como un inhibidor de la calcificación. Algunos autores han observado que una carga oral de fosfato produce daño tubular renal en ratas

normales cuando están deplecionadas de cloro y con alcalosis metabólica. El aumento del aporte de fósforo al túbulo distal directamente aumenta la acidificación urinaria y también genera una alcalosis metabólica.

De nuestros estudios y los trabajos antes mencionados se puede plantear que la carga de ácido a ratas azotémicas aumenta la excreción urinaria de calcio y fósforo, lo que unido a una menor alcalinización del intersticio medular disminuye el depósito de calcio y fósforo, y finalmente, el menor depósito calcio-fósforo inducido por la acidosis, disminuiría el daño túbulo-intersticial y entonces desaceleraría la progresión de la insuficiencia renal en este modelo de uremia experimental.

Trabajo financiado por Proyecto FONDECYT N.º 1000560.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ibels LS, Alfrey AC, Haut L, Huffer WE: Preservation of function in experimental renal disease by dietary restriction of phosphate. *N Engl J Med* 298: 122-126, 1978.
2. Halperin ML, Ethier JH, Kamel KS: Ammonium excretion in chronic metabolic acidosis: Benefits and risks. *Am J Kidney Dis* 14: 267-271, 1989.
3. Bover J, Rodríguez M, Trinidad P, Jara A, Martínez ME, Machado L y cols.: Factors in the development of secondary hyperparathyroidism during graded renal failure in the rat. *Kidney Int* 45: 953-961, 1994.
4. Haut LL, Alfrey AC, Guggenheim S, Buddington B, Schrier N: Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney Int* 17: 722-731, 1980.
5. Lumlergult D, Burke TJ, Gillum DM, Alfrey AC, Harris DC, Hammond WS, Schrier RW: Phosphate depletion arrests progression of chronic renal failure independent of protein intake. *Kidney Int* 29: 658-666, 1986.
6. Bushinsky DA: The contribution of acidosis to renal osteodystrophy. *Kidney Int* 47: 1816-1836, 1995.
7. Nath KA, Hostetter MK, Hostetter TH: Pathophysiology of chronic tubulo-interstitial disease in rats. *J Clin Invest* 76: 667-675, 1985.
8. Shigematsu T, Caverzasio J, Bonjour JP: Parathyroid removal prevents the progression of chronic renal failure induced by high protein diet. *Kidney Int* 44: 173-181, 1993.
9. Buerkert J, Martin D, Trigg D, Simon E: Effect of reduced renal mass on ammonium handling and net acid formation by the superficial and juxtamedullary nephron of the rat. *J Clin Invest* 71: 1661-1675, 1983.
10. 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* 58: 1023-1032, 2000.
11. Tew WP, Malis CD, Walker WG: A rapid extraction technique for atomic absorption determinations of kidney calcium. *Anal Biochem* 112: 346-350, 1981.
12. Laouari D, Kleinknecht C, Witmer GC, Habib R, Mounier F, Broyer M: Beneficial effect of low phosphorus diet in uremic rats: a reappraisal. *Clin Sci* 63: 539-548, 1982.
13. Kikuchi H, Matsushita T, Hirata K: Improved dietary treatment with low protein and phosphorus restriction in uremic rats. *Kidney Int* 24: S254-S258, 1983.

A. JARA y cols.

14. Kleinknecht C, Salusky I, Broyer M, Gubler MC: Effects of various protein diets on growth, renal function, and survival in uremic rats. *Kidney Int* 5: 534-541, 1979.
15. Giménez L, Walker WG, Tew WP, Hermann JA: Prevention of phosphate-induced progression of uremia in rats by 3-phosphocitrate acid. *Kidney Int* 22: 36-41, 1982.
16. Levine DZ, Roy D, Tolnai G, Nash L, Shah BG: Chloride depletion and nephrocalcinosis. *Am J Physiol* 227: 878-883, 1974.
17. Hitchman AJ, Hasany SA, Hitchman A, Harrison JE, Tam C: Phosphate-induced renal calcification in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 57: 92-97, 1979.
18. Throssell D, Brown J, Harris KPG, Walls J: Metabolic acidosis does not contribute to chronic renal injury in the rat. *Clin Sci* 89: 643-650, 1995.
19. Throssell D, Harris KPG, Bevington A, Furness PN, Howie AJ, Walls J: Renal effects of metabolic acidosis in the normal rat. *Nephron* 73: 450-455, 1996.
20. Lotspeich WD: Renal hypertrophy in metabolic acidosis and its relation to ammonia excretion. *Am J Physiol* 208: 1138-1142, 1965.