

Insuficiencia renal crónica e hiperparatiroidismo secundario en ratas: valoración bioquímica e histológica*

M. J. Virgós, P. Menéndez-Rodríguez, M. Serrano, A. González-Carcedo, S. Braga¹ y J. B. Cannata**

Unidad de Investigación, Metabolismo Óseo y Mineral y
¹Servicio de Bioquímica
Hospital Central de Asturias, Universidad de Oviedo
33080 Oviedo (España)

(Recibido el 28 de abril de 1993)

M. J. VIRGÓS, P. MENÉNDEZ-RODRÍGUEZ, M. SERRANO, A. GONZÁLEZ-CARCEDO, S. BRAGA and J. B. CANNATA. *Chronic Renal Failure and Secondary Hyperparathyroidism in Rats: Biochemical and Histological Parameters*. Rev. esp. Fisiol., 49 (4), 241-248, 1993.

Chronic renal failure (CRF) in rats (surgical nephrectomy, 5/6) as well as its derived bone lesions have been studied. Eighty-five male Wistar rats were used, to which chronic renal failure was induced in 1 or 2 surgical times, the parameters of renal function in basal conditions and at different times after surgery being determined. With the method used chronic renal failure is induced with values of creatinine clearance 2/3 times lower than the initial ones ($p < 0.05$), which stabilize at the 7th week. On the other hand the parathyroid hormone levels (PTH) in serum triple (from 125 ± 49 to 395 ± 191 , $p < 0.05$), and a decrease in the tubular phosphate reabsorption is produced ($p < 0.001$). In bone histology an increase in resorption and bone formation is observed as well as paratrabeular fibrosis, all of which is compatible with the histological diagnosis of hyperparathyroidism. The model of surgical renal insufficiency with ablation of 5/6 of the renal mass, reduces renal function to 1/3 of the initial values after 7 weeks, this procedure having a 20 % global mortality without differences being observed between the carrying out of nephrectomies in 1 or 2 surgical times. This degree of CRF was accompanied by secondary hyperparathyroidism both at the biochemical and histological levels, findings which are of great usefulness for future experimental studies.

Key words: Bone, Hyperparathyroidism, Chronic renal failure.

* Estudio subvencionado en parte por FICYT (1989-1992) y CICYT (PM 88-0183).

** A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

Desde hace años se utilizan modelos experimentales en los que se reproducen los trastornos metabólicos que acompañan a la

insuficiencia renal crónica (IRC) (4, 6, 8, 14, 16).

Está comprobada la validez de los muridos en general y las ratas en particular como modelos de insuficiencia renal crónica (9, 22, 23), pero existen dudas respecto de la capacidad de reproducir en estos animales las alteraciones óseas que acompañan a la insuficiencia renal crónica en el humano. Gracias a los trabajos de BARON *et al.* (2), hoy se conoce que el remodelado óseo en estos animales sigue un esquema de activación-resorción-formación similar al observado en el humano, lo que indica que pueden ser válidos para el estudio de las enfermedades metabólicas óseas, en que se produce alteración del equilibrio entre los procesos de resorción y formación ósea (13).

En este trabajo se han analizado las alteraciones bioquímicas e histológicas del hiperparatiroidismo secundario a la insuficiencia renal crónica conseguida mediante modelo de nefrectomía 5/6 en ratas.

Material y Métodos

Diseño del estudio. — Se utilizaron 85 ratas Wistar macho (353 ± 57 g) repartidas en tres grupos: 1) Animales a los que se les provocó IRC en un tiempo quirúrgico (N=50); 2) Animales a los que se les indujo IRC en dos tiempos quirúrgicos (N=25); y 3) Animales con función renal normal (FRN) (N=10).

La IRC se provocó mediante nefrectomía bipolar izquierda seguida de nefrectomía total derecha (nefrectomía 5/6) en 1 o 2 tiempos quirúrgicos; en este último caso la nefrectomía total derecha se realizó una semana después de la nefrectomía bipolar izquierda (9, 22, 23).

En el grupo 1 se practicó control bioquímico en situación basal, y a las 7 y 16 semanas de la insuficiencia renal. A los animales del grupo 2 se les realizaron controles basales, a la semana de la primera operación (coincidiendo con la nefrecto-

mía total), y a las 4 y 7 semanas de la nefrectomía total.

En suero se determinó: Ca^{2+} , calcio total (Ca), fósforo (P), hormona paratiroidea (PTH), proteínas, creatinina (Cr), y urea. En orina se determinó calcio total y fósforo. Se calcularon los índices de excreción de calcio y fósforo en 24 horas, reabsorción tubular de fosfato (RTP) y aclaramiento de creatinina (CCr), mediante los algoritmos Ca/Cr , P/Cr , $\text{RTP} = 1 - [\text{Cr orina} \times \text{P suero} / \text{P orina} \times \text{Cr suero}]$ y $\text{CCr} = [\text{Cr orina} / 14,4] / \text{Cr suero}$.

Al finalizar las 7 semanas (8 semanas desde la primera operación), se sacrificaron 5 animales del grupo 2 y se les extrajo, para estudio histológico, el tercio proximal de la tibia izquierda.

Los animales con función renal normal tenían la misma edad que los del grupo 2 y se utilizaron como grupo control para histología ósea.

Aspectos metodológicos. — En los animales del grupo 1 las extracciones se efectuaron mediante punción en la vena yugular izquierda, y en los del grupo 2, por estar sometidos a un número mayor de controles de función renal, en la cola, mediante cortes sucesivos de su extremo distal.

Todos los procedimientos invasivos se llevaron a cabo bajo anestesia (éter inhalado o pentobarbital, por vía intraperitoneal).

Estudio bioquímico: La PTH se determinó por RIA utilizando el kit rat PTH-MM de INC, que utiliza un anticuerpo específico frente a la región 44-68 de la PTH humana y tiene reacción cruzada con la PTH-MM de rata. Los estándares liofilizados pertenecen a distintas concentraciones de PTH-MM de rata. Este kit permite determinar variaciones en la concentración de PTH secundarias a cambios agudos de la calcemia (7). Las muestras se analizaron por duplicado. El coeficiente de variación intraensayo, medido en 23 muestras, fue de 1,5 % y la sensibilidad de 20 pmol/l.

El Ca^{2+} se midió por duplicado, mediante electrodo selectivo de iones Ciba-

Corning 634 (3, 21). El coeficiente de variación resultó siempre inferior al 1,5 % para 10 replicados de la misma muestra.

El calcio total y el fósforo se determinaron en un autoanalizador Hitachi 705 (Boehringer Mannheim); la creatinina y la urea en el autoanalizador de química seca Kodak Ektachem DT-60; las proteínas se analizaron, en suero y orina, en un refractómetro Bausch-Lomb; y el microhematocrito se midió en microcapilares mediante las tablas estandarizadas.

Estudio histológico. — Las muestras se incluyeron en metil-metacrilato sin descalcificación previa. Se hicieron cortes de 5-7 μm y se tiñeron con Von Kossa y Tricrómico de Masson-Goldner (1). En el examen microscópico se valoraron cualitativamente el volumen trabecular, las superficies cubiertas de osteoide con y sin osteoblastos, que indican presencia de formación ósea, las superficies con lagunas de resorción con y sin osteoclastos, que indican resorción ósea y la existencia de fibrosis paratrabecular.

Análisis estadístico. — El análisis estadístico se realizó mediante el test de la «t» de Student para datos pareados en el seguimiento de cada grupo y para datos no pareados cuando se compararon dos grupos diferentes. También se utilizó el test de comparación de porcentajes. Se consideraron diferencias significativas para $p < 0,05$.

Resultados

La supervivencia de los animales a las 7 semanas de la operación en 1 ó 2 tiempos osciló entre el 72 y el 80 %, respectivamente, sin que se apreciaran diferencias significativas entre las dos técnicas empleadas. Se registraron las causas posibles de muerte, en los animales del grupo 2: 57,1 % por uremia y otras causas derivadas de la misma, 28,6 % como consecuencia directa de la anestesia con éter; y, 14,3 % por desligadura del pedículo renal en el periodo intraoperatorio.

En la tabla I se muestran los resultados

Tabla I. *Evolución de la función renal en los animales del grupo 1 en situación basal y a las 7 y 16 semanas de provocar la insuficiencia renal*

Los valores representan la media \pm DS. n = número de casos por grupo. Abreviaturas: (BUN), creatinina sérica (CrS), aclaramiento de creatinina (CCr), microhematocrito (μHto). * $p < 0,05$, ** $p < 0,025$ y *** $p < 0,001$.

	n	BUN (mg/dl)	CrS	CCr	μHto
Basal	(6)	16 \pm 3	0,53 \pm 0,2	2,1 \pm 1,0	50 \pm 8
7 Semanas	(5)	44 \pm 19***	1,08 \pm 0,5*	0,7 \pm 0,6*	51 \pm 9
16 Semanas	(5)	48 \pm 25*	1,02 \pm 0,55*	0,59 \pm 0,4**	—

Tabla II. *Evolución a lo largo de 7 semanas de los distintos parámetros de función renal en el grupo 2 tras provocar la insuficiencia renal en 2 tiempos quirúrgicos.*

Los valores son la media \pm DS. Entre paréntesis número de experimentos por grupo. Abreviaturas como en tabla I. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

	BUN (mg/dl)	CrS (mg/dl)	CCr (mg/dl)	μHto (%)	Proteinuria (mg/24 h)
Basal	17 \pm 6 (15)	0,47 \pm 0,2 (15)	2,12 \pm 1,7 (10)	56 \pm 5 (16)	17 \pm 6 (18)
4 Semanas	51 \pm 17** (13)	1,65 \pm 0,8** (18)	0,59 \pm 0,29** (18)	50 \pm 5* (18)	—
7 Semanas	58 \pm 21** (14)	1,44 \pm 0,7** (16)	0,68 \pm 0,34* (14)	56 \pm 9 (16)	110 \pm 75** (16)

Tabla III. Resultados del grupo 2 en el tiempo basal y a las 7 semanas de provocar la insuficiencia renal. Calcio iónico (Ca^{2+}), calcio sérico (CaS), fósforo sérico (PS), hormona paratiroidea (PTH) y reabsorción tubular de fosfatos (RTP). Los valores representan la media \pm DS. Número de datos entre paréntesis. ** $p < 0,001$.

	Ca^{2+} (mmol/l)	CaS (mg/dl)	PS (mg/dl)	PTH (pmol/l)	RTP (%)
Basal	$1,25 \pm 0,05$ (7)	$9,4 \pm 0,34$ (14)	$8,7 \pm 2,1$ (14)	125 ± 49 (10)	98 ± 10 (13)
7 Semanas	$1,25 \pm 0,06$ (14)	$9,6 \pm 0,70$ (16)	$8,1 \pm 1,9$ (16)	$395 \pm 191^{**}$ (12)	$85 \pm 8^{**}$ (14)

a las 7 y las 16 semanas de la cirugía en los animales del grupo 1. En los animales del grupo 2, al cabo de una semana de realizarse la nefrectomía bipolar izquierda, el aclaramiento de creatinina descendió de $2,12 \pm 1,7$ a $0,73 \pm 0,26$ ml/min ($p < 0,05$). Tras la segunda intervención (nefrectomía total derecha), el aclaramiento de creatinina alcanzó sus valores más bajos a las 4 semanas, y posteriormente la función renal se estabilizó en valores 3 veces por debajo de los observados al inicio del experimento (tabla II). No se observaron diferencias en el grado de la función renal entre los animales a los que se realizó la nefrectomía en 1 ó 2 tiempos quirúrgicos.

La IRC se acompañó de incremento significativo en la PTH y descenso de la RTP, sin que se observaran variaciones significativas en el Ca^{2+} ni en los valores séricos de calcio total y fósforo (tabla III).

La excreción urinaria de fósforo aumentó de $3,38 \pm 1,17$ a $9,49 \pm 1,21$ mg/24 h ($p < 0,001$). Debido a la poliuria existente en este modelo de IRC, y a pesar del efecto ahorrador de calcio que ejerce la PTH, la calciuria en 24 horas se elevó de $1,12 \pm 0,16$ a $1,98 \pm 0,27$ mg/24 h ($p < 0,05$). A las 7 semanas de insuficiencia renal la proteinuria estaba en el intervalo de los valores observados en la IRC (tabla II).

En el estudio histológico se comprobó la repercusión ósea del aumento de PTH. Las ratas con IRC presentaron menor proporción de tejido óseo mineralizado, con disminución del grosor y tamaño de las trabéculas, y adelgazamiento de la zona cortical. Se observó aumento del número y profundidad de las lagunas de resorción o

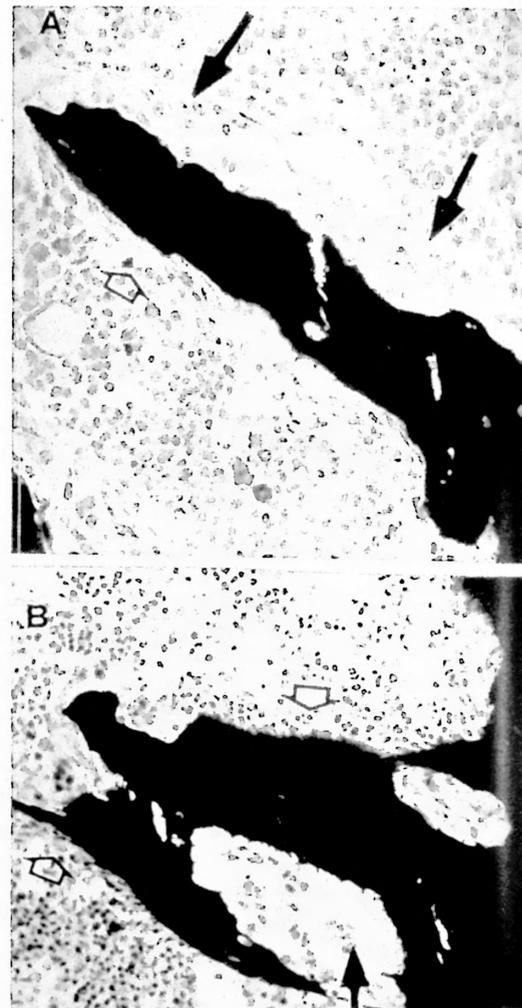


Fig. 1. Biopsia de rata con insuficiencia renal crónica. Tinción de Von Kossa ($\times 250$).

A) Se observa fibrosis paratrabecular (\triangle) así como superficies de resorción cubiertas de osteoclastos (\uparrow). B) Se observa osteoclasia disecante (\uparrow) así como superficies cubiertas de osteoide (\triangle).

de Howship, en ocasiones activas, es decir, con presencia de osteoclastos y osteoclasia disecante (fig. 1). En la superficie perióstica también se apreciaron signos de resorción activa.

En las ratas con IRC se detectó existencia leve (figura 1A) de fibrosis paratrabeccular. Las superficies de osteoide y de osteoide con ribetes osteoblásticos estaban aumentadas, siendo el grosor de los ribetes de aspecto normal (figura 1B).

Discusión

Los métodos quirúrgicos de reducción de masa renal son los más utilizados para provocar IRC experimental, y dentro de ellos, el modelo 5/6 nefrectomía es el de realización más sencilla (23). A pesar de que numerosos aspectos de este modelo ya han sido estudiados (12, 17, 26), existen otros que todavía son poco conocidos, fundamentalmente los relacionados con el metabolismo óseo y con las modificaciones que se producen como consecuencia de la insuficiencia renal. Este último aspecto es de crucial importancia si se pretende usar modelos experimentales, tanto para despejar dudas etiopatogénicas, como para intentar nuevas terapéuticas efectivas en el control de la osteodistrofia renal. Por último, en el aspecto práctico tenía gran interés disponer de datos propios en relación con la mortalidad y, por tanto, con la viabilidad de este modelo (10, 18, 19).

El mayor descenso de la función renal se obtuvo a las 4 semanas de provocar la nefrectomía 5/6, explicable por los cambios secundarios a la cirugía dado que durante este primer período los animales todavía se encontraban en fase de recuperación y compensación del fallo renal agudo provocado. En las semanas siguientes, la función renal mejoró y se estabilizaron. Siete semanas post-cirugía parecen ser el período óptimo para que la función renal se estabilice a 1/3 de los valores iniciales, lo que equivaldría en el humano a un aclaramien-

to de creatinina de aproximadamente 30 ml/min. La prolongación del período experimental a 16 semanas no reportó beneficios respecto al grado y estabilidad de IRC.

A las 7 semanas de provocar la insuficiencia renal, las cifras de PTH-MM alcanzaron valores medios tres veces por encima de los normales, encontrándose diferencias significativas respecto a los valores basales. En otros trabajos en los que se utiliza la determinación de PTH intacta o de PTH NH₂-terminal (7, 11, 20, 24), se han descrito elevaciones superiores a las observadas en nuestro estudio, lo que podría deberse a la conocida mayor sensibilidad de estas últimas determinaciones en el diagnóstico del hiperparatiroidismo secundario. Sin embargo, la objeción metodológica que podría hacerse a estos ensayos radica en la necesidad de diluir la muestra que se va a cuantificar, asumiendo que en ella se van a observar incrementos de 5 a 10 veces en los niveles de parathormona que permitirían trabajar en los intervalos de mayor sensibilidad del método.

El análisis de PTH-MM, si bien menos sensible, ha demostrado su especificidad sin manipulaciones de la muestra, siendo capaz de detectar cambios agudos o crónicos en la secreción de PTH (7, 25).

Paralelamente al aumento de PTH-MM y como consecuencia del mismo, se observó un descenso significativo de la reabsorción tubular de fosfatos ($p < 0,01$). En suero, los valores de calcio y fósforo no se modificaron y el hiperparatiroidismo secundario generado por la IRC mantuvo la homeostasis a expensas de la modificación en el manejo tubular de dichos iones.

Los hallazgos obtenidos en la histología ósea corroboraron los datos bioquímicos de hiperparatiroidismo secundario. Los resultados cualitativos fueron suficientes para confirmar las diferencias entre el grupo con FRN y el de IRC. Este último grupo mostró signos de aumento de formación y resorción ósea, así como aparición de fibrosis paratrabeccular, demos-

trando que este modelo de IRC es suficiente para poner en marcha los mecanismos homeostáticos que conducen a un estímulo continuado de las glándulas paratiroides y, por tanto, a la instauración de un hiperparatiroidismo secundario con repercusiones no sólo funcionales sino también morfológicas.

Estos hallazgos coinciden con los observados por otros autores en humanos, describiéndose la presencia de hiperparatiroidismo con evidencia de cambios morfológicos en etapas de IRC similares, e incluso anteriores a las observadas en este estudio. En estas circunstancias se han descrito aumento de las superficies de resorción y de las superficies recubiertas de osteoide con aclaramientos de creatinina de 50 ml/minuto, y fibrosis endostal con niveles del mismo inferior a 30 ml/minuto (5, 15).

Resumen

Se profundiza en el conocimiento de la insuficiencia renal crónica (IRC) en ratas (modelo 5/6 de nefrectomía) así como en el estudio de las lesiones óseas que se derivan del mismo. Se utilizaron 85 ratas Wistar macho a las que se provocó la IRC en 1 ó 2 tiempos quirúrgicos, y se determinaron los parámetros de función renal en situación basal y en diferentes tiempos tras la cirugía. Con el método utilizado se provoca una IRC con valores de aclaramiento de creatinina 2/3 inferiores a los iniciales ($p < 0,05$), que se estabiliza a las 7 semanas. Por otra parte los niveles de parathormona (PTH) en suero se triplican (de 125 ± 49 a 395 ± 191 , $p < 0,05$), y se produce una reducción en la reabsorción tubular de fosfato ($p < 0,001$). En la histología ósea se aprecia un aumento de la resorción y formación ósea, así como fibrosis paratrabecular, todo ello compatible con el diagnóstico histológico de hiperparatiroidismo. El modelo de insuficiencia renal quirúrgica con ablación de 5/6 de la masa renal, reduce a las 7 semanas la función renal a 1/3 de los valores iniciales, y este procedimiento tiene una mortalidad global del 20 % sin que se observen diferencias entre la

realización de nefrectomías en 1 ó 2 tiempos quirúrgicos. Este grado de IRC se acompaña de hiperparatiroidismo secundario tanto a nivel bioquímico como histológico, hallazgos que resultan de gran utilidad para futuros estudios experimentales.

Palabras clave: Hueso, Hiperparatiroidismo, Insuficiencia renal crónica.

Bibliografía

1. Baron, R., Tross, R. y Vignery, A.: *Anat. Rec.*, 202, 445-451. 1982.
2. Baron, R., Vignery, A., Neff, L., Silverplate, A. y Santa María, A.: «Bone histomorphometry, Techniques and interpretation» (R. Recker, ed.). CRC Press, Inc., Boca Ratón, Fl, 1983. pp 1-37.
3. Bowers, Jr. G. N., Brassard, C. y Sena, S. F.: *Clin. Chem.*, 32, 1437-1447. 1986.
4. Brown, E. M., Wilson, R. E., Eastman, R. C., Pallota, J. y Marynick, S. P.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54, 172-179, 1982.
5. Coburn, J. W. y Slatopolsky, E.: «The Kidney» (Brenner, B. M. y Rector, F. C.). Saunders, W. S. Co. Filadelfia, 1986, pp. 1657-1729.
6. Coe, F. L.: En «The Kidney» (Brenner, B. M. y Rector, F. C., eds.). Saunders, W. S. Co., Filadelfia, 1986, pp. 703-734.
7. Díaz-López, J. B., Cannata, J. B., D'Haese, P. C., Nouewen, E. J., Díaz de Greñu, M. C., Allende, M. T. y De Broe, M. E.: *Trace Elem. Human Health Dis.*, 20, 43-46, 1987.
8. Eknoyan, G.: «Nephrology» (Robinson, R. R., ed.). Springer-Verlag, Nueva York, 1986. pp. 1223-1333.
9. Gretz, N., Meisinger, E., Waldherr, R. y Strauch, M.: *Contrib. Nephrol.*, 60, 56-63, 1988.
10. Grond, J., Schilthuis, M. S., Koudstaal, J. y Elema J. D.: *Kidney Int.*, 22, 338-343, 1982.
11. Hirschel-Scholz, S., Charlon, S., Rizzoli, R., Caverzasio, J., Paunier, L. y Bonjour, J. P.: *Kidney Int.*, 33, 934-941, 1988.
12. Kleinknecht, C. Laouari, D. y Burtin, M.: *Contrib. Nephrol.*, 60, 27-38, 1988.
13. Kraft, K., Barsotti, G., Giovannetti, S., Wetzel, E., Gretz, N. y Strauch, M.: *Contrib. Nephrol.*, 60, 214-219, 1988.
14. Llach, F.: «Insuficiencia renal crónica. Diálisis y

- trasplante renal» (Llach, F. y Valderrábano F., eds.). Norma, Madrid, 1990, pp. 203-245.
15. Malluche, H. y Faugere, M. C.: *Kidney Int.*, 38, 193-211, 1971.
 16. Malluche, H. H., Ritz, E., Lange, H. P., Kutscher, J., Hodgson, M., Seiffert, V. y Schoeppe, W.: *Kidney Int.*, 9, 355-362, 1976.
 17. Moriconi, L., Barsotti, G., Paleologo, G., Cupisti, A., Dani, L. y Giovannetti, S.: *Contrib. Nephrol.*, 60, 126-134, 1988.
 18. Neugarten, J., Feiner, H. D., Schacht, R. G. y Baldwin, D.: *Kidney Int.*, 24, 595-601, 1983.
 19. Olson, J. L., Hostetter, T. H., Rennke, H. G., Brenner, B. H. y Venkatachalam, M. A.: *Kidney Int.*, 22, 112-126, 1982.
 20. Rodriguez, M., Felsenfeld, J. y Llach, F.: *Bone Min. Res.*, 5, 59-67, 1990.
 21. Schwartz, H. D.: *Clin. Chem.*, 22, 461-467, 1976.
 22. Sterner, G. y Wennberg, A.: *Contrib. Nephrol.*, 60, 39-45, 1988.
 23. Strauch, M. y Gretz, N.: *Contrib. Nephrol.*, 60, 1-8, 1988.
 24. Toverud, S. U., Boass, A., Garner, S. C. y Endres, D. B.: *Bone Min. Res.*, 1, 145-155, 1986.
 25. Virgós, M. J., Díaz-López, J. B., Allande, M. T., Gómez-Alonso, C. y Cannata, J. B.: *Nefrología*, 9, 54-59, 1989.
 26. Waldherr, R. y Gretz, N.: *Contrib. Nephrol.*, 60, 64-72, 1988.

