



Efecto de la hormona de crecimiento y del calcitriol sobre la placa de crecimiento de ratas urémicas

B. Amil, M. Fernández-Fuente, F. Santos, J. Rodríguez, L. Díaz-Tejón, E. García y E. Carbajo

Área de Pediatría y Anatomía. Facultad de Medicina. Hospital Central de Asturias. Universidad de Oviedo y SESPA. Oviedo. Asturias.

RESUMEN

Este estudio analizó la placa de crecimiento de ratas urémicas hipocrecidas tras administración de hormona de crecimiento (GH) y/o calcitriol. Se estudiaron cuatro grupos: sin tratamiento (U), tratadas con GH (U + GH), con calcitriol (U + D), con GH y calcitriol (U + GH + D), diariamente durante la segunda semana de IRC. Estos grupos se compararon con ratas control con dieta ad libitum (C) o pareada con U (CP). La histomorfometría de la tibia proximal reveló en U una menor formación de hueso estimada por el avance del frente óseo (AFO), alargamiento del cartílago de crecimiento y de su zona hipertrófica, y condrocitos terminales más pequeños, en comparación con los grupos C y CP. El grupo U + D tendió a normalizar la altura del cartílago de crecimiento, de la zona hipertrófica, y el tamaño de los condrocitos terminales. En el grupo U + GH mejoró el AFO y se normalizó el tamaño condrocitario, pero el cartílago de crecimiento y la zona hipertrófica permanecieron alargados. El grupo U + GH + D mostró hallazgos similares al U + GH. Estos hallazgos indican que en la IRC el tratamiento con GH no normaliza la morfología de la placa y que el calcitriol facilita la maduración del condrocito. Cuando se administran conjuntamente, el efecto de la GH prevalece.

Palabras clave: *Uremia. Placa de crecimiento. Hormona de crecimiento. Calcitriol. Histomorfometría.*

EFFECT OF GROWTH HORMONE AND CALCITRIOL IN THE GROWTH PLATE OF UREMIC RATS

SUMMARY

This study analyzed the modifications induced by growth hormone (GH) and/or calcitriol treatments in the growth plate of growth retarded uremic rats. Four groups of 5/6 nephrectomized rats were studied: untreated (U), treated with GH (U + GH), treated with calcitriol (U + D), treated with GH and calcitriol (U + GH + D). Treatments were given intraperitoneally during the second week of renal failure. Uremic groups were compared with sham-operated rats fed ad libitum (C) or pair-fed with U (CP). In comparison with C and CP, histomorphometric analysis of tibial proximal ends of U group showed decreased bone formation, as es-

Correspondencia: Dr. Benito Amil Pérez
 Área de Pediatría
 Facultad de Medicina
 C/ Julián Clavería, 6
 33006 Oviedo. Asturias
 E-mail: bamil@correo.uniovi.es

timated by osseous front advance (OFA), elongation of growth cartilage and its hypertrophic zone, and decreased size of most distal chondrocytes. The U + D group tended to normalize growth cartilage height, and that of its hypertrophic zone, as well as the size of chondrocytes. In U + GH group OFA improved and chondrocyte size became normal, but growth cartilage remained elongated. Similar results were found in the U + GH + D group. These findings indicate that, in chronic renal insufficiency, the beneficial effect of GH on growth is not associated with normalization of growth cartilage morphology and that calcitriol facilitates chondrocyte maturation. When given together the effect of GH prevails.

Key words: Chronic renal failure. Growth plate. Growth hormone. Calcitriol. Histomorphometry.

INTRODUCCIÓN

El hipoprecimiento es una de las manifestaciones características de la insuficiencia renal crónica (IRC) en la edad pediátrica¹. Su patogenia es multifactorial, jugando un papel relevante la resistencia a la acción de la hormona de crecimiento (GH), la malnutrición, la osteodistrofia renal, la anemia y la acidosis metabólica²⁻⁴.

El tratamiento con GH a altas dosis ha demostrado que mejora el hipoprecimiento secundario a IRC tanto en estudios experimentales^{5,6} como en la práctica clínica⁷. También se ha demostrado en ratas urémicas el efecto beneficioso sobre el crecimiento de la administración diaria de calcitriol⁸.

Tal como se ha visto en modelos animales, el hipoprecimiento secundario a IRC se acompaña de severas alteraciones de la placa de crecimiento epifisaria de los huesos largos⁹⁻¹². Sin embargo, no se conoce cuál es el efecto que sobre la placa de crecimiento del sujeto urémico puede tener el tratamiento con GH o calcitriol, o el de ambos agentes actuando de forma conjunta.

El presente estudio se planteó para caracterizar los efectos del tratamiento con GH y calcitriol, administrados de forma separada o conjunta, sobre el crecimiento y la estructura y dinámica de la placa de crecimiento de ratas urémicas hipoprecidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra Sprague-Dawley de 28 a 30 días de edad y 100 ± 5 g de peso al inicio del estudio, procedentes del animalario de la Universidad de Oviedo. Los animales se mantuvieron en condiciones de luz (ciclos de luz-oscuridad de 12) y temperatura (21 ± 2 °C) controladas. Tras 3 días de aclimatación al área de experimentación en jaulas individuales, los animales fueron sometidos a una ne-

frectomía 5/6 en dos tiempos⁹, los días 0 y 4 del protocolo, y fueron agrupados en cuatro grupos diferentes: urémico sin tratamiento (U), urémico sometido a tratamiento con GH (U + GH), urémico tratado con calcitriol (U + D) y urémico tratado con GH y calcitriol (U + GH + D). Los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal los días 11 al 17 del protocolo, a razón de 10 UI/kg/día de GH en dos dosis (9 h y 17 h), y 50 ng/kg/día de calcitriol en una dosis diaria. Las ratas recibieron pienso (A04 PANLAB, Barcelona) con un 14% de proteínas *ad libitum*. Los animales urémicos fueron comparados con dos grupos control sometidos a una operación simulada (decapsulación renal), uno alimentado *ad libitum* (C) y otro con ingesta restringida igualada con el pienso ingerido por el grupo urémico sin tratamiento (CP). El día 16 de protocolo todos los animales recibieron una dosis intraperitoneal de calceína (20 mg/kg) y el día 18 fueron sacrificados. Se obtuvo suero para valorar la función renal mediante la determinación de la concentración de nitrógeno ureico sérico. Los extremos proximales de ambas tibias fueron fijados en etanol e incluidos en metilmetacrilato según protocolo descrito previamente¹³. El ritmo de crecimiento longitudinal, expresado como avance del frente óseo (AFO) en $\mu\text{m}/\text{día}$, se valoró en secciones de 10 μm de grosor analizando la distancia entre el extremo proximal del frente de fluorescencia de calceína y el límite distal del cartílago de crecimiento. La morfología del cartílago de crecimiento se valoró en secciones de 5 μm de grosor teñidas con azul alcian y safranina. Imágenes digitalizadas del cartílago de crecimiento fueron analizadas con el programa Scion Image[®] para el cálculo de la altura del cartílago de crecimiento (μm) y de la zona hipertrófica (μm) y de la altura (μm) y área de sección (μm^2) de los condrocitos hipertróficos terminales. Se utilizaron muestras de al menos cinco animales por grupo experimental. Los datos obtenidos se expresan como media \pm EEM y fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) y posterior-

mente con el test Student-Newman-Keuls para comparaciones entre pares de grupos. Una $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Los valores numéricos de las distintas variables registradas quedan recogidos en la tabla I.

Los distintos grupos de ratas urémicas presentaron valores de nitrógeno ureico similares entre sí, siendo en todo caso 3 y 4 veces superiores a los encontrados en los grupos control (tabla I).

El AFO fue menor en el grupo urémico sin tratamiento que en cualquiera de los otros grupos del estudio, entre los que no existieron diferencias significativas.

La altura del cartílago de crecimiento (fig. 1) fue mayor en el grupo urémico sin tratamiento y en los tratados con GH. Diferencias similares se observaron al analizar la altura de la zona hipertrófica (fig. 1).

El área de sección de los condrocitos hipertróficos terminales fue menor en el grupo urémico sin tratamiento que en el resto de los grupos, entre los que no se encontraron diferencias significativas. La altura de los condrocitos terminales siguió el patrón de la relación descrita para el área de sección.

Discusión

Las cifras de nitrógeno ureico triplicando las de los controles aseguran según datos de nuestro grupo¹⁴ un hipocrecimiento en los animales del grupo urémico U, lo que se vio reflejado en un menor AFO. Además el grupo U presentó un cartílago de crecimiento alargado y condrocitos terminales más pequeños en comparación con el grupo control. Estas alteraciones no fueron debidas a la malnutrición puesto que el grupo malnutrido (CP)

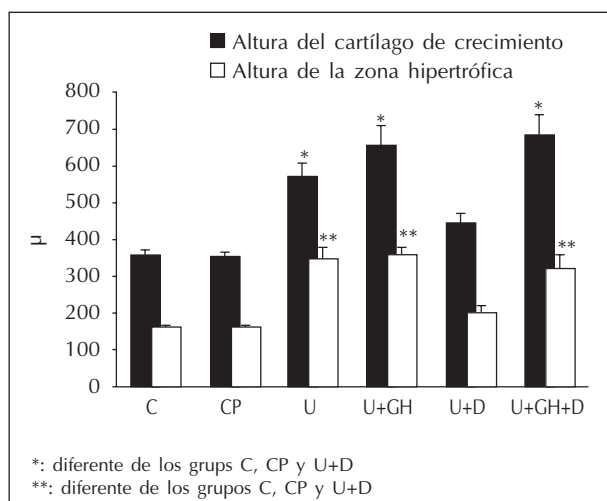


Fig. 1.—Representación gráfica de las alturas (media ± EEM) del cartílago de crecimiento y de la zona hipertrófica de los grupos estudiados.

presentó hallazgos muy similares al control alimentado *ad libitum*.

En el grupo tratado con calcitriol (U + D) tendió a mejorar el crecimiento y las alteraciones del cartílago encontradas en la uremia. Mehls y cols.¹² ya demostraron la eficacia del calcitriol diario para mejorar el crecimiento en ratas urémicas. En nuestro estudio, destacó además la normalización de la altura del cartílago de crecimiento y del tamaño de los condrocitos. El incremento de la altura del cartílago de crecimiento fundamentalmente a expensas de la zona hipertrófica, es una característica descrita tanto en animales urémicos como en ratas con raquitismo por déficit de vitamina D. Las alteraciones descritas en el modelo raquítico se normalizan con la administración de calcitriol¹⁵. Cabría pensar que las alteraciones descritas en la uremia son debidas a alteraciones en el me-

Tabla I. Histomorfometría y función renal de los grupos analizados. Valores como media ± EEM

	C	CP	U	U + GH	U + D	U + GH + D	ANOVA p
Nitrógeno ureico sérico (mg/dl)	11,7±1,2	12,9±0,6	50,2±4,3 ^{ab}	46,8±2,7 ^{ab}	45,0±3,8 ^{ab}	51,4±3,6 ^{ab}	0,000
Avance del frente óseo (µ/día)	143 ±12	108±10	60±13 ^{abdef}	132±17	99±6	106±8	0,000
Altura del cartílago de crecimiento (µ)	359±14 ^{cdf}	351±18 ^{cdf}	571±37	657±55	447±25 ^{cdf}	682±57	0,000
Altura de la zona hipertrófica (µ)	160±7 ^{cdf}	157±7 ^{cdf}	348±31	360±20	202±20	325±35	0,000
Área de condrocitos terminales (µ²)	477±23	465 ±32	360±23 ^{abdef}	540±20	528±15	588±35	0,000
Altura de condrocitos terminales (µ)	21±0,8	20±1,0	15,6±1,6 ^{abdef}	22±0,9	22±0,4	23±1,2	0,000

p < 0,005 indica diferencias estadísticamente significativas. ^a: diferente del grupo C; ^b: diferente del grupo CP; ^c: diferente del grupo U; ^d: diferente del grupo U + GH; ^e: diferente del grupo U + D; ^f: diferente del grupo U + GH + D.

tabolismo de la vitamina D. Sin embargo, en el modelo raquítrico los condrocitos terminales son de gran volumen¹⁶, al contrario que en la uremia, donde son más pequeños tal como se ha descrito en este estudio y en estudios previos¹². Cabría pensar que en el modelo raquítrico hay un defecto primario de la mineralización de la matriz que dificulta y entorpece la formación de hueso nuevo, con el consiguiente acúmulo de condrocitos en el lado cartilaginoso de la placa. En el modelo urémico, la alteración del tamaño de los condrocitos terminales apunta hacia una alteración del normal proceso de maduración de los condrocitos que, a su vez, dificultaría la sustitución de cartílago por hueso. Se constata que la administración de calcitriol es capaz de revertir tanto las alteraciones descritas en el modelo de raquitismo carencial, como las que se encuentran en la uremia.

Por otra parte, ya fue comentado que la resistencia a la acción de la GH parece tener un papel de mayor relevancia que el déficit de calcitriol en el hipocrecimiento asociado al FRC. El aumento del AFO en las ratas urémicas tratadas con GH es más patente que tras el tratamiento con calcitriol, aunque en este estudio la diferencia no alcance el grado de significación estadística, tal vez por el reducido tamaño de muestra. La GH no normalizó la altura del cartílago de crecimiento, sino que la aumentó aún más como ya ha sido expuesto por otros autores^{9,10}. Es de notar que el tratamiento con GH normalizó el tamaño de los condrocitos hipertróficos, lo que indica una acción favorable sobre la maduración condrocitaria. Al recibir tratamiento combinado (U + GH + D) persistió la tendencia a la mejoría del crecimiento y del tamaño condrocitario. Sin embargo, el efecto del calcitriol no se vio reflejado en un acortamiento del cartílago de crecimiento prevaleciendo así los hallazgos del grupo tratado con GH.

Así pues se ha observado que en la uremia, la GH promueve la formación ósea aunque mantiene el cartílago de crecimiento alargado. Aunque el calcitriol como único tratamiento tiende a normalizar la altura del cartílago de crecimiento y el tamaño de los condrocitos, con discreta mejora del AFO, el tratamiento combinado con la GH no se acompaña de un acortamiento del cartílago de crecimiento. Los hallazgos obtenidos apuntan hacia un probable efecto del calcitriol a dosis baja en la maduración de los condrocitos en la placa de crecimiento urémica sin afectar al efecto proliferativo a la GH.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fine RN, Kohaut EC, Brown D, Perlman AJ: Growth after recombinant human growth hormone treatment in children with chronic renal failure: report of a multicenter randomized double-blind placebo-controlled study. Genentech Cooperative Study Group. *J Pediatr* 124: 374-382, 1994.
2. Broyer M: Growth in children with renal insufficiency. *Pediatr Clin North Am* 29: 991-1003, 1982.
3. Hanna JD, Foreman JW, Chan JCM: Growth in chronic renal disease. *Current Opinion in Pediatrics* 4: 259-263, 1992.
4. Cobo A, Santos F, García E, Crespo M: Patogenia del hipocrecimiento en el fracaso renal crónico. Conceptos actuales. *An Esp Pediatr* 40: 241-245, 1994.
5. Mehls O, Ritz E, Hunziker EB, Egli P, Heinrich U, Zapf J: Improvement of growth and food utilization by human recombinant growth hormone in uremia. *Kidney Int* 33: 45-52, 1988.
6. Hanna JD, Santos F, Foreman JW, Chan JC, Han VK: Insulin-like growth factor-I gene expression in the tibial epiphyseal growth plate of growth hormone-treated uremic rats. *Kidney Int* 47: 1374-1382, 1995.
7. Haffner D, Schaefer F, Nissel R, Wuhl E, Tonshoff B, Mehls O: Effect of growth hormone treatment on the adult height of children with chronic renal failure. German Study Group for Growth Hormone Treatment in Chronic Renal Failure. *N Engl J Med* 343: 923-930, 2000.
8. Mehls O, Knoller N, Oh J, Wesch H, Wunsche B, Schmitt CP: Daily but not pulse calcitriol therapy improves growth in experimental uremia. *Pediatr Nephrol* 14: 658-663, 2000.
9. Chantler CE, Lieberman E, Holliday MA: A rat model for the study of growth failure in uremia. *Pediatr Res* 8: 109-113, 1974.
10. Mehls O, Ritz E, Gilli G, Schmidt-Gayk H, Krempien B, Kourist B, Wesch H, Prager P: Skeletal changes and growth in experimental uremia. *Nephron* 18: 288-300, 1977.
11. Cobo A, Carbajo E, Santos F, García E, López JM: Morphometry of uremic rat growth plate. *Miner Electrolyte Metab* 22: 192-195, 1996.
12. Cobo A, López JM, Carbajo E, Santos F, Álvarez J, Fernández M, Weruaga A: Growth plate cartilage formation and resorption are differentially depressed in growth retarded uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 10: 971-979, 1999.
13. Erben RG: Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 45: 307-313, 1997.
14. Santos F, Cobo A, Orejas G, Martínez V, Rey C, Málaga S, Crespo M: Analysis of Growth in Five-Sixths-Nephrectomized Rats. *Miner Electrolyte Metab* 22: 83-87, 1996.
15. Kato Y, Shimazu A, Iwamoto M, Nakashima K, Koike T, Suzuki F, Nishii Y, Sato K: Role of 1,25-dihydroxycholecalciferol in growth-plate cartilage: inhibition of terminal differentiation of chondrocytes *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 87: 6522-6526, 1990.
16. Dean DD, Muñoz OE, Berman I, Pita JC, Carreno MR, Woessner JF, Jr., Howell DS: Localization of collagenase in the growth plate of rachitic rats. *J Clin Invest* 76: 716-722, 1985.