

ORIGINALES

Modelo experimental de hipocrecimiento secundario a acidosis metabólica crónica en ratas jóvenes

F. A. Ordóñez, P. Fernández González, J. Rodríguez Suárez, A. Medina, V. Martínez Suárez y F. Santos
Pediatria. Hospital Central de Asturias y Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo. Oviedo. Asturias (España).

RESUMEN

Con el fin de crear un modelo experimental de hipocrecimiento secundario a acidosis metabólica crónica, aportamos ClNH_4 durante 14 días en concentraciones crecientes (1,8, 2 y 2,2%) a ratas jóvenes Sprague-Dawley, hembras, de 65 ± 5 g de peso, comparando los resultados con un grupo con alimentación pareada («pair fed») y un grupo control. La acidosis metabólica, confirmada por un descenso del pH ($7,12 \pm 0,02$) y bicarbonato ($12,8 \pm 0,6$ mEq/l) sanguíneos al final del estudio, provocó una menor ganancia de peso ($15,8 \pm 3,3$ g vs $87,0 \pm 4,3$ g; $p = 0,0001$) y longitud ($4,0 \pm 0,3$ cm vs $8,8 \pm 0,2$ cm; $p = 0,0001$) en las ratas tratadas con respecto a las controles. Este retraso de crecimiento del grupo acidosis fue significativamente más severo que el presentado por los animales con alimentación pareada, tanto en peso como en longitud. El aporte de ClNH_4 se asoció a un marcado descenso en la ingesta de alimento y agua (56,8 y 43,8% de las controles, respectivamente) y a un incremento en los valores séricos de urea (24 ± 2 mg/dl vs 11 ± 1 mg/dl; $p = 0,0001$) y cloro (112 ± 1 mg/dl vs 104 ± 1 mg/dl; $p = 0,0001$). En resumen, la acidosis metabólica mantenida generada en este estudio provocó un marcado retraso de crecimiento, sin provocar alteraciones bioquímicas severas o enfermedad clínica grave. El modelo experimental propuesto puede ser útil para el estudio de los mecanismos del hipocrecimiento secundario a acidosis metabólica crónica en niños.

Palabras clave: **Acidosis. Crecimiento. Ratas**

EXPERIMENTAL MODEL OF GROWTH RETARDATION SECONDARY TO CHRONIC METABOLIC ACIDOSIS IN YOUNG RATS

SUMMARY

To develop an experimental model of chronic metabolic acidosis, young female Sprague-Dawley rats (65 ± 5 g body weight and 25 ± 3 days of age) were given NH_4Cl in increasing concentrations (1.8, 2 and 2.2% in a 5% dextrose drinking solution with deionized water) for 14 days. Results were compared with those

Recibido: 11-II-97.

En versión definitiva: 4-VI-97.

Aceptado: 7-VI-97.

Correspondencia: Dr. F. Santos.
Pediatria. Facultad de Medicina.
Julián Clavería, 6.
33006 Asturias (España).

obtained in pair fed and control rats. At the end of study, metabolic acidosis, confirmed by reduced blood pH (7.12 ± 0.02) and bicarbonate (12.8 ± 0.6 mEq/L), resulted in decreased weight (15.8 ± 3.3 g vs 87.0 ± 4.3 g; $p = 0.0001$) and length (4.0 ± 0.3 cm vs 8.8 ± 0.2 cm; $p = 0.0001$) gains as compared to control rats. This growth retardation was significantly more severe than that observed in pair fed rats. The acidotic group ingested less food and water than controls (56.8% and 43.8%, respectively) and its serum concentrations of urea (24 ± 2 mg/dl vs 11 ± 1 mg/dl; $p = 0.0001$) and chloride (112 ± 1 mg/dl vs 104 ± 1 mg/dl; $p = 0.0001$) were higher. In summary, chronic metabolic acidosis resulted in a marked growth retardation as compared to animals with normal acid-base status, without causing significant biochemical or clinical disorders. Thus, this experimental model may be used to study the pathogenic mechanisms of chronic metabolic acidosis-associated growth impairment in children.

Key words: **Acidosis Growth. Rats**

INTRODUCCION

La acidosis metabólica es un trastorno frecuente en la clínica que se caracteriza por un descenso del pH sanguíneo y una reducción de la concentración extracelular de bicarbonato¹, consecuencia, básicamente, de un excesivo ingreso de ácidos o de una exagerada pérdida de bases. Las causas que provocan acidosis metabólica son diversas^{1,2}.

Las enfermedades que cursan con acidosis metabólica crónica se asocian a retraso de crecimiento, tanto en animales de experimentación como en la especie humana³⁻⁵, implicándose en la etiopatogenia de este hipocrecimiento múltiples factores, pero poco aclarados⁶⁻⁸.

La administración de cloruro amónico (CINH_4) es el método habitual de inducción de acidosis metabólica en ratas⁹⁻¹¹. Sin embargo, una de las mayores limitaciones de este modelo experimental surge cuando se intenta crear un estado mantenido y prolongado de acidosis. Datos previos no publicados de nuestro laboratorio reafirman este problema, ya que hemos comprobado cómo el aporte de una sobrecarga ácida constante como CINH_4 al 1,5% en el agua de bebida, método habitualmente empleado en la literatura^{7,12}, únicamente provoca acidosis metabólica transitoria, siguiéndose de una etapa de adaptación y normalización de estado ácido-base. Por otra parte, el empleo de dosis más altas de ácido son o ineficaces, porque el animal rechaza la bebida, o peligrosas, porque pueden inducir un estado de acidosis severa amenazante para la vida.

La adaptación de las ratas a la ingesta crónica de ácido se debe, sobre todo, a mecanismos renales, como ha podido ser puesto de manifiesto en trabajos experimentales como el de Sleeper y cols.¹³, quienes demostraron un importante incremento en la excreción urinaria de amonio tras un período de

tres o cuatro días de recibir CINH_4 , o el de Yamada y cols.¹⁴, quienes, además, destacaron el mayor poder de adaptación de los animales jóvenes respecto a los de más edad. Esto puede justificar el que en la literatura existan pocos estudios a largo plazo sobre hipocrecimiento secundario a acidosis metabólica en ratas jóvenes.

Así pues, el presente trabajo se llevó a cabo con el fin de desarrollar un modelo experimental de acidosis metabólica mantenida en ratas en fase de crecimiento rápido, analizando su repercusión en el crecimiento, las modificaciones en los hábitos dietéticos y los presumibles cambios en la bioquímica sanguínea.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron ratas hembra Sprague-Dawley, de aproximadamente 25 días de edad y un peso inicial en el momento de la incorporación al estudio de 65 ± 5 g. Las ratas fueron alojadas en jaulas individuales, a una temperatura ambiente constante de 22°C y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Recibieron pienso estándar comercial (PANLAB AO3[®]), con un contenido proteico del 23,9% y 3.200 calorías/kg.

Tras un período de adaptación de tres días (día cero del estudio), los animales fueron distribuidos en tres grupos: 1. Grupo control ($n = 9$), ratas alimentadas con pienso «ad libitum» y como bebida una solución de glucosa al 5% en agua desionizada, también «ad libitum». 2. Grupo acidosis ($n = 12$), ratas alimentadas con pienso «ad libitum» y acceso libre a una solución de glucosa al 5% en agua desionizada, a la que se añadió CINH_4 al 1,8% (0,33M); al sexto y undécimo días de estudio esta concentración de CINH_4 se aumentó al 2 y 2,2% (0,37 y 0,41 M), respectivamente. 3. Grupo «pair fed» ($n =$

12), ratas emparejadas individualmente por el peso del primer día de estudio con las ratas acidóticas, recibiendo a través del pienso un aporte isocalórico con respecto a aquéllas (incluyendo el aporte calórico de la glucosa del agua) y accediendo libremente a agua desionizada (sin glucosa).

Al decimocuarto día del estudio las ratas fueron sacrificadas por exanguinación a través de la aorta abdominal, bajo anestesia general con pentotal sódico (4 mg/100 g) y ketamina (1,25 mg/100 g), administradas ambas por vía intraperitoneal. En el suero obtenido se determinaron las concentraciones de urea, creatinina, calcio, fósforo, fosfatasa alcalina (FA), sodio, potasio y cloro con un analizador Kodak Ektachem KT 60[®]. Previamente al sacrificio se obtuvo una muestra de sangre capilar en el plexo ocular, con la que se valoró el estado ácido-base (analizador de gases Ciba Corning 855[®]). Se definió como rata acidótica aquella cuyo bicarbonato sérico fue inferior a la media menos dos desviaciones estándar de los valores hallados en el grupo control.

Diariamente se midió el peso de cada rata y el pienso y bebida consumidas. La longitud de los animales, desde el hocico hasta el extremo distal de la cola, se determinó el día cero (bajo anestesia general con éter) e inmediatamente antes del sacrificio. Con los datos obtenidos se calculó la eficacia del alimento ingerido (cociente entre la ganancia de peso, en g, y pienso consumido, también en g).

En el manejo de las ratas se respetó en todo momento la normativa sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, recogida en el Real Decreto 223/1988 del 14 de marzo y en la Orden del 13 de octubre de 1989.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media ($\bar{X} \pm$ EEM). La comparación entre los grupos de los datos obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Para la posterior comparación entre grupos se empleó el «F test» de Scheffé. Un valor de «p» igual o inferior a 0,05 se consideró como indicativo de significación estadística.

RESULTADOS

No existieron diferencias al comienzo del estudio entre los grupos en lo que se refiere al peso (grupo control: $82,1 \pm 1,5$ g; grupo acidosis: $82,4 \pm 0,8$ g; grupo «pair fed»: $81,6 \pm 1$ g) y longitud (grupo control: $23,8 \pm 0,1$ cm; grupo acidosis: $23,9 \pm 0,1$ cm; grupo «pair fed»: $24,0 \pm 0,1$ cm).

La presencia de acidosis metabólica en las ratas tratadas con CINH_4 se confirmó por un descenso del bicarbonato sanguíneo respecto a los otros dos grupos ($12,8 \pm 0,6$ mEq/l en el grupo acidosis, frente a $22,8 \pm 0,8$ mEq/l y $24,6 \pm 1,0$ mEq/l en los grupos control y «pair fed», respectivamente; $p = 0,0001$ (tabla I).

Al sacrificio, las ratas del grupo control pesaban más que las acidóticas y «pair fed» ($169,1 \pm 4,4$ g para el grupo control; $98,2 \pm 3,4$ g para el grupo acidosis; $126,1 \pm 3,4$ g para el grupo «pair fed»). En lo que se refiere a la longitud hocico-extremo distal de la cola, las ratas acidóticas y «pair fed» fueron hipoprecidas al final del estudio respecto a las del grupo control (grupo acidosis: $27,9 \pm 0,3$ cm; grupo «pair fed»: $30,2 \pm 0,2$ cm; grupo control: $32,6 \pm 0,1$

Tabla I. Estado ácido-base y determinaciones bioquímicas en sangre analizadas en los grupos de estudio. Los datos se expresan como $\bar{X} \pm$ EEM.

	Grupo control (n = 9)	Grupo acidosis (n = 12)	Grupo «pair fed» (n = 12)	p
pH	7,37 \pm 0,01	7,12 \pm 0,02	7,40 \pm 0,01	0,0001
Bicarbonato (mEq/l)	22,8 \pm 0,8	12,8 \pm 0,6	24,6 \pm 1	0,0001
Urea (mg/dl)	11 \pm 1	24 \pm 2	11 \pm 1	0,0001
Creatinina (mg/dl)	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	NS
Sodio (mEq/l)	139 \pm 1	145 \pm 3	142,2 \pm 2	NS
Potasio (mEq/l)	3,6 \pm 0,2	4,1 \pm 0,2	4,2 \pm 0,3	NS
Cloro (mEq/l)	104 \pm 1	112 \pm 1	99 \pm 1	0,0001
Calcio (mg/dl)	8,9 \pm 0,2	8,3 \pm 0,1	9,4 \pm 0,4	0,02
Fósforo (mg/dl)	7,1 \pm 0,4	7,4 \pm 0,3	6,4 \pm 0,4	NS
FA (U/l)	332 \pm 16	310 \pm 16	289 \pm 19	NS

*Fosfatasa alcalina. NS: no significativa.

Diferencias significativas ($p < 0,01$) para pH, bicarbonato y urea, entre grupos: acidosis vs control, acidosis vs «pair fed»; cloro: acidosis vs control, acidosis vs «pair fed». Diferencias significativas ($p < 0,05$) para cloro: control vs «pair-fed»; calcio: acidosis vs «pair fed».

cm; $p = 0,0001$). La evolución gráfica del peso de los animales aparece en la [figura 1](#).

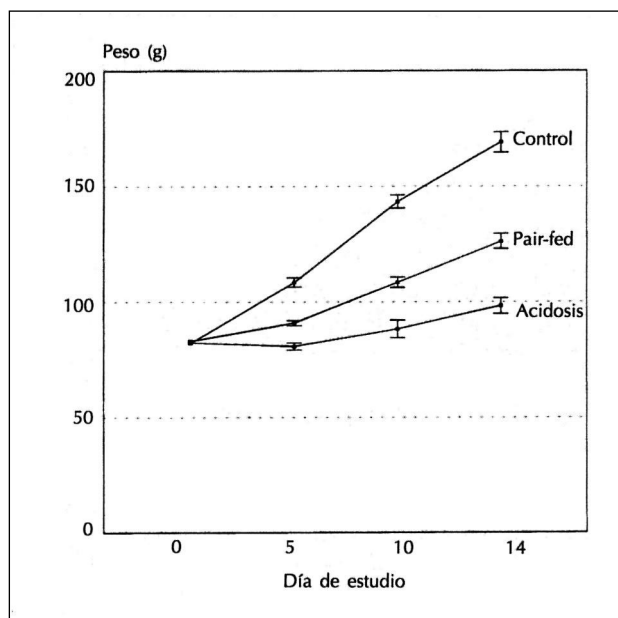


Fig. 1.—Evolución del peso ($\bar{X} \pm EEM$) en los grupos acidosis, «pair-fed» y control entre los días cero y catorce del estudio.

La ingesta diaria de pienso fue de $16,2 \pm 0,2$, $9,2 \pm 0,3$ y $10,5 \pm 0,3$ g/día para las ratas controles, acidóticas y «pair fed», respectivamente. De esta forma, respecto a la ingesta de pienso de los controles, los animales del grupo acidosis consumieron el 56,8% y 64,8% los «pair fed». La eficacia del alimento también fue desigual entre los tres grupos: la mayor eficacia se observó en el grupo control ($0,38 \pm 0,01$

g/g), seguido por el grupo «pair fed» ($0,30 \pm 0,02$ g/g), y correspondiendo la más pobre al grupo de las ratas acidóticas, con $0,11 \pm 0,02$ g/g ($p = 0,0001$ entre los grupos de estudio). Asimismo, la acidosis conllevó un marcado descenso de la ingesta líquida. Los datos somatométricos y dietéticos de los grupos al final del estudio se recogen en la [tabla II](#).

Los animales acidóticos presentaron una concentración de urea sérica superior al doble de la hallada en los grupos control y «pair fed» (grupo acidosis: 24 ± 2 mg/dl; grupo control: 11 ± 1 mg/dl; grupo «pair fed»: 11 ± 1 mg/dl; $p = 0,0001$), siendo también más alto el cloro sérico del grupo acidosis (112 ± 1 mg/dl), frente a 104 ± 1 mg/dl y 99 ± 1 mg/dl de los grupos control y «pair fed», respectivamente; $p = 0,0001$. La calcemia fue ligeramente inferior en las ratas que recibieron CINH_4 . Estos datos bioquímicos y el resto de los analizados en el estudio aparecen reflejados en la [tabla I](#).

DISCUSION

En las ratas es difícil provocar un estado mantenido de acidosis mediante el aporte diario de una sobrecarga ácida, ya que estos animales tienen la facultad de incrementar extremadamente la eliminación urinaria de hidrogeniones, con lo que se suelen adaptar al aporte recibido. Sleeper¹³ ha notificado que con aportes constantes de CINH_4 durante un período de 4 días, la eliminación de amonio en la orina de las ratas supera, al final del estudio, tres o cuatro veces la inicial. Pero, además, es de especial interés el destacar el estudio de Yamada y cols.¹⁴ en ratas de distinta edad con acidosis metabólica generada por aporte de CINH_4 , donde se demuestra que la máxima excreción urinaria de amonio se observa en las

Tabla II. Datos somatométricos y dietéticos de los grupos control, acidosis y «pair fed» al final del estudio. Se presentan como $X \pm EEM$.

	Grupo control (n = 9)	Grupo acidosis (n = 12)	Grupo «pair fed» (n = 12)	p
Ganancia absoluta de peso (g)	$87,0 \pm 4,3$	$15,8 \pm 3,3$	$44,5 \pm 3,3$	0,0001
Ganancia absoluta de longitud (cm)	$8,8 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,2$	0,0001
Ingesta de pienso (g/día)	$16,2 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,3$	$10,5 \pm 0,3$	0,0001
Ingesta proteica (g/día)	$3,8 \pm 0,06$	$2,2 \pm 0,09$	$2,5 \pm 0,09$	0,0001
Ingesta de agua (ml/día)	$54,8 \pm 4,3$	$24,0 \pm 0,8$	$23,5 \pm 1,1$	0,0001
Ingesta calórica (cal/día).....	$62,8 \pm 1,1$	$34,5 \pm 1,3$	$34,0 \pm 1,2$	0,0001
Eficacia del alimento (g/g)	$0,38 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,02$	0,0001

Diferencias significativas ($p < 0,01$) para ganancia absoluta de peso, ganancia absoluta de longitud y eficacia entre grupos: control vs acidosis, control vs «pair fed» y acidosis vs «pair fed». Diferencias significativas ($p < 0,01$) para ingesta de pienso, ingesta proteica, ingesta de agua e ingesta calórica entre grupos: acidosis vs control y control vs «pair-fed». Diferencias significativas ($p < 0,05$) para ingesta proteica e ingesta de pienso entre grupos: acidosis vs «pair-fed».

ratas más jóvenes, siendo, por lo tanto, más resistentes a la acidosis. Todo esto motiva que sean escasos los trabajos experimentales de la literatura en los que se consigue crear un estado prolongado de acidosis metabólica en ratas muy jóvenes¹⁵.

Por otra parte, existe el riesgo de ocasionar la muerte del animal o un estado de enfermedad grave si se incrementa mucho, o de forma brusca, la carga ácida administrada. Tanto este obstáculo como el de la adaptación se presentaron antes de llegar a las dosis de CINH_4 empleadas en este protocolo de trabajo, ya que las ratas o bien se acostumbraban a la sobrecarga ácida al cabo de unos días y no se diferenciaban de las controles en cuanto a la ganancia de peso y consumo de alimento o, por el contrario, fallecían en los primeros días si se intentaban utilizar dosis altas de CINH_4 desde el inicio.

Con el protocolo descrito se consiguió un significativo descenso de la cifra sérica de bicarbonato en los animales sometidos al aporte oral de CINH_4 . Estos mismos animales no mostraron otras anomalías bioquímicas significativas en las variables analizadas, salvo la hipercloremia, en clara relación con el CINH_4 ingerido, y la elevación de la urea sérica, encontrada también en otros estudios¹⁶ y presumiblemente relacionada, en gran parte, con el estado catabólico que acompaña a la acidosis metabólica^{10,17-19}. Sin embargo, la afectación secundaria del crecimiento fue evidente a lo largo del corto período de estudio, manteniendo los animales acidóticos durante el mismo un buen aspecto, comportamiento activo y ausencia de signos de deshidratación.

El hipercatabolismo proteico generado por la acidosis metabólica y no compensado por un aumento de la síntesis proteica²⁰ queda bien reflejado en nuestro trabajo por la menor eficacia de la alimentación consumida para generar aumento de peso. Así, las ratas acidóticas no sólo fueron anoréxicas, como se demuestra por la menor ingesta de pienso, sino que además utilizaron peor la alimentación consumida. Esto explica que su crecimiento fuera inferior no sólo al del grupo control, sino también al de las ratas «pair fed».

El estado catabólico que acompaña a la acidosis metabólica ha sido también puesto de manifiesto en humanos. Así, Williams y cols.¹⁹, en adultos sometidos a una dieta restringida en proteínas, encontraron una diferencia en la excreción urinaria de nitrógeno de 49,2 mmol/día, que viene a representar 7,4 gramos de proteínas (1,18 gramos de nitrógeno/día), entre antes y después de corregir la acidosis metabólica. Si se tiene en cuenta que el 80% del músculo esquelético es agua, se perderían 37 gramos de masa muscular en un día y 1 kilogramo en un mes.

En resumen, el protocolo descrito permitió crear una situación de acidosis metabólica franca y mantenida, sin provocar alteraciones bioquímicas severas o enfermedad clínica grave. Este estado generó en ratas muy jóvenes, con un rápido ritmo de crecimiento, un marcado retraso en el incremento de peso y longitud respecto a otras con un equilibrio ácido-base intacto. Por lo tanto, el protocolo propuesto puede servir como modelo experimental para el estudio de los mecanismos del hipocrecimiento secundario a acidosis metabólica crónica en patología pediátrica.

BIBLIOGRAFIA

1. Schwartz GJ: En: *Pediatric Nephrology*, editado por MA Holliday, RM Barrat y DE Avner. Ed. Williams & Wilkins, 222-246, Baltimore, 1994.
2. Klahr S, Weiner ID: En: *Kidney electrolyte disorders*, editado por JCMChan y JR Gill, Jr; De Churchill Livingstone, 1-58, New York, 1990.
3. Cooke RE, Boyden DG, Haller E: The relationship of acidosis and growth retardation. *J Pediatr* 57: 326-37, 1960.
4. Lightwood R: Calcium infarction of the kidneys. *ArchDis Child* 10: 205, 1935.
5. Albright F, Burnett CH, Parson W, Reifenshtein EC Jr, Roos A: Osteomalacia and late rickets. *Medicine* 25: 399, 1946.
6. Potter DE, Greifer I: Statural growth of children with renal disease. *Kidney Int* 14: 334-9, 1978.
7. Challa A, Krieg RJ Jr, Thabet MA, Veldhuis JD, Chan JCM: Metabolic acidosis inhibits growth hormone secretion in rats: mechanism of growth retardation. *Am J Physiol* 265: E547-53, 1993.
8. McSherry E: Acidosis and growth in no uremic renal disease. *Kidney Int* 14: 349-54, 1978.
9. Chambrey R, Paillard M, Podevin RA: Enzymatic and functional evidence for adaptation of the vacuolar H-ATPase in proximal tubule apical membranes from rats with chronic metabolic acidosis. *J Biol Chem* 269: 3243-50, 1994.
10. May RC, Kelly RA, Mirch WE: Metabolic acidosis stimulates protein degradation in rat muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. *J Clin Invest* 77: 614-21, 1986.
11. Simon EE, Merli C, Herndon J, Cragoe EJ Jr, Hamm LL: Determinants of ammonia entry along the rat proximal tubule during chronic metabolic acidosis. *Am J Physiol* 256: F1104-10, 1989.
12. Langman CB, Bushinsky DA, Favus MJ, Coe FL: Ca and P regulation of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ synthesis by vitamin D-replete rat tubules during acidosis. *Am J Physiol* 251: F911-8, 1986.
13. Sleeper RS, Vertuno LL, Strauss F, Preuss HG: Effects of acid challenge on in vivo and in vitro rat renal ammoniogenesis. *Life Science* 22: 1561-72, 1978.
14. Yamada H, Sacktor B, Kinsella J: Age-associated changes in ammoniogenesis in isolated rat renal tubule segments. *Am J Physiol* 262: F600-5, 1992.
15. Kraut JA, Mishler DR, Singer FR, Goodman WG: The effects of metabolic acidosis on bone formation and bone resorption in the rat. *Kidney Int* 30: 694-700, 1986.
16. Challa A, Krieg RJ Jr, Thabet MA, Veldhuis JD, Chan JCM: Metabolic acidosis inhibits growth hormone secretion in rats: mechanism of growth retardation. *Am J Physiol* 265: E547-53, 1993.

17. Reaich D, Channon SM, Scrimgeour CM, Goodship THJ: Ammonium chloride-induced acidosis increases protein breakdown and amino acid oxidation in humans. *Am J Physiol* 263: E735-9, 1992.
18. May RC, Masud T, Logue B, Bailey J, England BK: Metabolic acidosis accelerates whole body protein degradation and leucine oxidation by a glucocorticoid-dependent mechanism (abstract). *Miner Electrolyte Metab* 18: 245-9, 1992.
19. Williams B, Hattersley J, Layward E, Walls J: Metabolic acidosis and skeletal muscle adaptation to low protein diets in chronic uremia. *Kidney Int* 40: 779-86, 1991.
20. Maniar S, Laouari D, Caldas A, Kleinknecht C: Protein synthesis and growth in uremic rats with and without chronic metabolic acidosis. *Miner Electrolyte Metab* 18: 250-252, 1992.