

Sección IV. Investigación y Ciencias Básicas

La Caracterización Biomecánica e Histológica de Metástasis Oseas Inducidas Experimentalmente

Dr. Carlos A. Leal*, Dr. John A. Hipp**, Dr. Steven Gladstone**, Dr. Wilson C. Hayes**

Resumen

El propósito de esta investigación fue el de desarrollar un modelo animal que permita el estudio de los efectos directos de los tumores líticos en la enfermedad ósea metastásica. Las fracturas patológicas son el resultado de una pérdida de la resistencia ósea causada por resorción directa e indirecta. La evaluación de estos efectos suele ser caracterizada indirectamente mediante las mediciones de niveles séricos y urinarios de calcio, exámenes radiológicos o tasas de supervivencia. En este modelo utilizamos células Walker 256 de cáncinoma de seno que fueron cultivadas en un gel de agarosa de baja temperatura enriquecido con medio de cultivo. De esta mezcla se tomaron cilindros de 0.5mm x 1.8mm que fueron implantados en el fémur derecho de 32 ratas Sprague Dawley. Los fémures contralaterales fueron operados sin implante y sirvieron de controles. Cuatro grupos de 8 ratas fueron sacrificadas a los 15, 30, 45 y 60 días postimplante. Seis fémures de cada grupo fueron sometidos a torsión para determinar el punto de falla en torque. Los fémures implantados fueron 19.06% más débiles que sus contralaterales. A los 30 y 60 días los fémures implantados mostraron la mayor debilidad, y a los 45 días se encontró una paradójica recuperación en su resistencia. El análisis histológico reveló invasión del canal medular con alta actividad osteoclástica, frentes de resorción y microfracturas. La severidad radiológica aumentó progresivamente en el tiempo. Tanto la radiología como la histología mostraron un compromiso primordial de la diáfisis y metáfisis distales. La osteodensitometría no mostró cambios significativos en la región diafisaria. La resonancia nuclear magnética permitió ver el tamaño y distribución intramedular del tumor. Nuestras investigaciones indican que con este nuevo modelo animal es posible determinar patrones reproducibles de pérdida de la resistencia ósea y así proporcionar una base para comparar los efectos de agentes terapéuticos en la enfermedad metastásica ósea.

Palabras Clave: Metástasis Osea, Rata, Agarosa, Fémur, Torsión, Torque, Biomecánica

Introducción

La enfermedad metastásica es uno de los aspectos más serios y mortales del cáncer, siendo el sistema músculoesquelético el tercer sitio más común de invasión tanto en términos de frecuencia como de efectos clínicos.^{2,6,14} Las metástasis óseas son mucho más frecuentes que los tumores óseos primarios, son usualmente múltiples y comprometen la salud del paciente al causar un intenso dolor, al interferir con las estructuras neuromusculares adyacentes, al causar fracturas patológicas y al alterar la función de la mé-

dula ósea.^{18,25,27} A pesar de que el tratamiento de la enfermedad metastásica ósea no altera la expectativa de vida del paciente con cáncer, si mejora significativamente su calidad de vida. En la medida en que los pacientes con cáncer viven por más tiempo gracias a los avances en el tratamiento de las neoplasias primarias, el manejo de las complicaciones metastásicas se hace cada vez más importante.^{10,27,28} La historia natural de la enfermedad metastásica ósea humana se ve afectada por muchos factores. La incidencia de metástasis óseas varía de acuerdo con el tipo de tumor primario, siendo los carcinomas de seno y bronquial quienes tienen los más altos índices de invasión a hueso. Las células tumorales se siembran en la medula ósea a través del torrente sanguíneo y crecen en la cavidad medular invadiendo el hueso esponjoso y cortical. El crecimiento, vascularización y desarrollo del nuevo foco tumoral depende probablemente de agen-

*Laboratorio de Investigación en Ortopedia, Postgrado de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Escuela Colombiana de Medicina, Santafé de Bogotá, DC.

**Orthopaedic Biomechanics Laboratory Department of Orthopaedic Surgery Beth Israel Hospital and Harvard Medical School Boston, MA.

tes químicos derivados de las mismas células tumorales, así como de factores humorales locales responsables del activo metabolismo que implica el recambio óseo permanente. Las altas concentraciones de factores de crecimiento, proteínas no colagénicas, enzimas proteolíticas y otros terceros mensajeros intercelulares son un atractivo medio ambiente para las células tumorales embólicas.²⁵ Si a esto se le agrega el lento flujo sanguíneo de los capilares metafisiarios y los inmensos poros endoteliales en esta zona, se puede comprender la avidez de los tumores por metastatizar el hueso. El ataque osteolítico inicial es causado por la activación y la proliferación de osteoclastos en un frente de resorción que precede el avance de células tumorales. La osteolisis comienza en las superficies óseas del canal medular y se extiende a la superficie endóstica del hueso cortical. En las fases más tardías, el tumor prolifera y rodea las trabéculas óseas remanentes continuando el proceso de resorción a través de una osteolisis mediada directamente por las células tumorales. La integridad estructural del hueso se compromete progresivamente en la medida que las lesiones perforan las corticales y se extienden en la longitud del hueso.²⁵

Los tumores metastásicos tienden a ser de comportamiento osteolítico, y existen numerosos frentes de investigación que se han centrado en prevenir la destrucción ósea que generan. Sin embargo, existen pocos modelos experimentales que permitan el estudio de la historia natural y el tratamiento de las metástasis óseas, así como la evaluación de los efectos de la intervención farmacológica sobre esta enfermedad. La mayoría de los modelos descritos implican la evaluación indirecta de los efectos de agentes antiosteolíticos y antitumorales mediante la medición de niveles de calcio en orina y suero, o estudiando y clasificando sus cambios radiológicos.^{1,4,7,16,19,20,21} Con frecuencia la evaluación de los beneficios de un tratamiento se limita a la determinación de las tasas de supervivencia.^{9,13,15,30} No existen hasta el momento reportes de un modelo que pueda ser utilizado para describir cambios directos y cuantificables sobre el hueso.

Hemos desarrollado un modelo animal que permite la medición directa de las propiedades estructurales del hueso metastásico. Mediante la creación de una metástasis diafisiaria logramos

estudiar los cambios en el comportamiento mecánico del hueso afectado. Para lograr este objetivo, utilizamos un cáncinoma de alta malignidad Walker 256 de seno de rata cultivado en agar enriquecido e insertado en cápsulas cilíndricas dentro del canal medular del fémur de ratas Sprague Dawley. La caracterización biomecánica se realizó mediante la determinación de la falla en torque. La evaluación histológica describe la presencia de lesiones corticales, frentes de resorción y microfracturas, así como la determinación de la actividad celular osteoblástica, osteoclástica y tumoral. Se evaluó la evolución clínica y radiológica, así como la medición de contenido y densidad mineral ósea. El tamaño del tumor se evaluó mediante resonancia nuclear magnética.

Este estudio fue diseñado para contestar las siguientes preguntas de investigación:

- 1)- ¿Es la historia natural de las metástasis óseas inducidas experimentalmente en ratas similar al cuadro patológico del humano?
- 2)- ¿Está asociado el crecimiento de estas metástasis con una pérdida predecible y reproducible de la resistencia ósea?
- 3)- ¿Podría el uso de este modelo ser implementado para el estudio de posibles tratamientos de la enfermedad metastásica ósea?

Nuestro modelo permite la descripción de la historia natural de las metástasis diafisiarias inducidas experimentalmente en ratas y la caracterización de su evolución biomecánica e histológica.

Materiales y Métodos

La línea celular utilizada fue la Walker 256 (W256), un cáncinoma maligno de seno de rata obtenido del Pathology and Oncology Research Group de la Universidad de McMaster en Hamilton, Ontario. Este tipo celular ha sido desarrollado por el grupo de Orr y cols. y ha sido ampliamente utilizado en la investigación de la fisiopatología de la enfermedad metastásica ósea.^{9,16,19,21,25} Las células tumorales fueron cultivadas en medio HEPES buffer RPMI con un contenido de 10% de suero fetal bovino (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Las células se utilizaron en fase

de crecimiento. Un gel de agarosa de baja temperatura de consolidación a una concentración de 2% (Sigma Chemical, St. Louis, MO) fue disuelto en solución DPBS y mantenido como solución de base a 4 grados centígrados. A necesidad, esta solución base se funde nuevamente y se lleva a licuefacción a 37 grados centígrados. La densidad celular tumoral se llevó a una concentración de 2×10^6 con medio de cultivo, y un mililitro de esta mezcla fué llevado a una caja de Petri de poliestireno estéril de 35 x 10 mm. (Corning Products, Corning, NY). Se agregó un mililitro de la solución de agarosa a la solución celular y se mezcló mediante oscilación. La caja de Petri con la mezcla definitiva se bajó a 4 grados centígrados durante 10 minutos para facilitar la consolidación del gel.²² Todo el proceso se realizó bajo estrictas condiciones asépticas para evitar contaminación. Una vez consolidado el gel, se obtuvieron cápsulas cilíndricas de 0.5mm. x 1.8mm. utilizando un trócar romo calibre 18. La viabilidad y la capacidad reproductiva de las células tumorales dentro del transportador de gel se confirmó in-vitro mediante la implantación de las cápsulas en una caja de petri con medio de cultivo en fase líquida. Las células tumorales son liberadas de la cápsula transportadora a las 72 horas y muestran un comportamiento reproductivo y una viabilidad similar a las células cultivadas directamente.

Para este estudio fueron utilizadas ratas Sprague Dawley de tres meses de edad con un peso promedio de 300 gramos (Teconic Laboratories, Germantown, NY). Los animales fueron mantenidos en jaulas separadas y en una habitación de aislamiento para evitar contaminación viral. Fueron alimentadas con concentrado para roedores y agua ad-libitum siguiendo los parametros de cuidado y ética en animales de experimentación del departamento de estudios animales del Beth Israel Hospital y Harvard Medical School. Un estudio piloto realizado con 8 ratas mostró resultados iniciales satisfactorios, y basados en esta experiencia preliminar, se realizó el estudio de potencia y el análisis de tamaño de muestra. De acuerdo a este estudio, la muestra mínima es de cinco ratas por grupo para el estudio biomecánico. Fueron sometidos cuatro grupos de 8 ratas a la inserción quirúrgica de las cápsulas transportadoras de W256 en el fémur derecho. Los animales fueron anestesiados mediante la utilización de 50 mg/kg de Pentobarbital sódico por vía intraperitoneal.

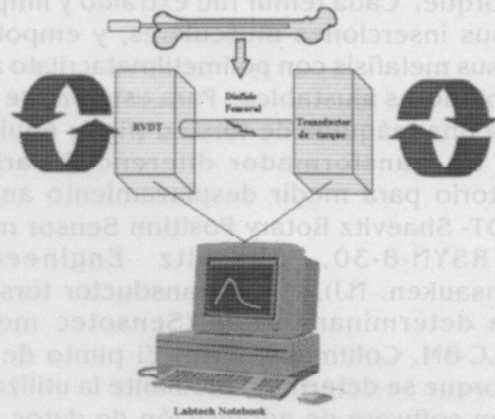


Fig.1: Los fémures recibieron el implante de gel transportador W256 mediante la inserción de las cápsulas con un trócar romo calibre 18 a través del surco intercondíleo. Los extremos proximal y distal de todos los fémures se empotraron con polimetilmetacrilato a adaptadores, que, a su vez, se conectaban a la máquina de torsión. Un extremo posee un transformador diferencial variable rotatorio (RVDT) y el otro un Transductor de torque. La fuerza la provee un motor a 6 grados por segundo en torsión. El sistema está conectado a un computador equipado con software de Labtech Notebook para la digitalización de los datos.

Se utilizó un abordaje anteromedial sobre la rodilla con exposición del mecanismo extensor, abordaje parapatelar medial y luxación lateral de la rótula para exponer el surco intercondíleo. Utilizando un clavo de Kirschner de 2 mm. de diámetro se practicó un abordaje retrógrado del canal medular perforando en el centro del surco intercondíleo. La cápsula transportadora W256 se insertó a continuación dentro del canal medular a través del abordaje intercondíleo hasta la altura de la región subtrocantérica y mediante la utilización de un trócar romo calibre 18. La cápsula transportadora W256 se liberó dentro del canal al retirar el trócar romo y empujando la cápsula con una guía central. El orificio intercondíleo fué sellado con cera ósea para evitar escape de células tumorales a la rodilla. El mecanismo extensor y la cápsula articular de la rodilla fueron reconstruidas para facilitar la rehabilitación y la piel se suturó con puntos subcuticulares absorbibles para evitar el mordido de las suturas por el animal. Las ratas se sacrificaron a los 15, 30, 45 y 60 días después de la implantación quirúrgica del tumor. Para determinar las consecuencias estructurales del hueso implantado con tumor, ambos fémures de seis ratas de cada grupo fueron estudiados en torsión para determinar su punto de falla

en torque. Cada fémur fue extraído y limpiado de sus inserciones musculares, y empotrado por sus metafisis con polimetilmetacrilato a dos adaptadores ajustables. Para este fin fue diseñada una máquina de torsión (fig. 1) equipada con un transformador diferencial variable rotatorio para medir desplazamiento angular (RVDT- Shaevitz Rotary Position Sensor modelo RSYN-8-30, Shaevitz Engineering, Pennsauken, NJ), y un transductor torsional para determinar torque (Sensotec modelo QWLC-8M, Columbus, OH). El punto de falla en torque se determinó mediante la utilización de un software de adquisición de datos automatizado (Labtech Notebook, Laboratory Technologies, Wilmington, DE). La evaluación histológica se realizó mediante cortes longitudinales de hueso decalcificado y teñido con Hematoxilina y Eosina para la determinación de frentes de resorción, microfracturas y actividad celular. La evaluación radiológica se realizó al momento del sacrificio utilizando una máquina de rayos-X Hewlett Packard tipo Faxitron. Las radiografías fueron analizadas en forma ciega por tres observadores independientes y clasificadas de acuerdo a la escala de Wingen,³⁰ en la que las lesiones se clasifican como leves (1 punto), moderadas (2 puntos) o severas (3 puntos). Para este estudio se definió leve como cambios localizados, moderado como cambios intramedulares sin compromiso cortical y severo como compromiso de hueso cortical, deformidad ósea o fractura patológica. La densidad y el contenido mineral óseo se realizaron mediante la utilización de un densitómetro de absorptiometría RX dual tipo Hologic QDR-2000, y analizando la densidad ósea en una ventana correspondiente a la región diafisaria con el software de pequeños especímenes. Se realizó la resonancia nuclear magnética en seis ratas de cada grupo utilizando un magneto de cuerpo entero de 5-Tesla (Radiology Research Laboratory, Deaconess Hospital, Boston, MA). Se diseñó un molde de polimetilmetacrilato a la medida de la rata, de manera que se controlara y reprodujera la posición de cada espécimen dentro del magneto. El procedimiento se realizó bajo anestesia general con Pentobarbital sódico.

Se utilizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para determinar las variaciones de falla en torque. Los dos factores de estudio fueron la presencia de tumor y el tiempo (4 grupos). Las comparaciones Post-Hoc se realizaron con la uti-

lización de un análisis tipo Student-Neuman-Keuls con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Para controlar la variabilidad entre especímenes, se realizó un ANOVA de una vía de mediciones repetidas con el objeto de determinar las diferencias entre los fémures con implantación tumoral y sus controles contralaterales. Las diferencias de falla en torque entre los fémures implantados con tumor y los controles contralaterales fue analizado además mediante un ANOVA de una vía con los datos normalizados, o sea con la diferencia existente entre implantados y controles. Se realizó un ANOVA de dos vías en la determinación de las diferencias en densidad y contenido mineral óseo, utilizando la presencia de tumor y tiempo como factores. Los valores de la escala de Wingen de cada espécimen fueron comparados utilizando un ANOVA de una vía.

Resultados

Un total de 6 ratas murieron entre los días 30 y 45 después del implante. Se realizó una autopsia en estos especímenes encontrando una gran masa de tejidos blandos en el muslo derecho. El fémur estaba claramente afectado, especialmente en el tercio distal, aunque no se encontraron fracturas patológicas macroscópicamente. Tres fémures implantados presentaban necrosis del tercio distal, por lo que fueron retirados del estudio. Los pulmones presentaban evidencia de invasión tumoral, lo que, probablemente, causó la muerte. Las radiografías de cuerpo entero no mostraron evidencia de metástasis en ningún otro hueso del cuerpo. Algunas ratas desarrollaron un tumor de tejidos blandos de gran tamaño sobre el muslo y la cadera que les ocasionó lesión medular espinal invasiva con paraplegia. Estos especímenes debieron ser sacrificados de acuerdo al protocolo de ética en cirugía animal. Un total de 6 ratas no presentaron evidencia de masa al examen físico (15%).

Los fémures que recibieron implantes de tumor mostraron una falla en torque significativamente menor que sus controles contralaterales en un promedio de 19.06%. Se evidenció además una interacción estadísticamente significativa entre la reducción de la resistencia ósea y el tiempo ($p=0.013$). Los fémures implantados con tumor fueron más débiles que sus controles contralaterales por un promedio de 4.49% a los 15 días, 47.75% a los 30 días y 33.08% a los 60 días (fig. 2). En el grupo de 45 días se encontró que los fémures implantados con tumor fueron

11% más fuertes que sus controles contralaterales; sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas en resistencia ósea entre los fémures implantados y los contralaterales en este grupo. El ANOVA de una vía con mediciones repetidas mostró una diferencia significativa de falla en torque entre los fémures implantados con tumor y los controles contralaterales en los grupos de 30 días y 60 días postimplante (fig.3). En la medida que pasa el tiempo, los fémures implantados se hacen más débiles con respecto a sus contralaterales, salvo en el grupo de 45 días en que hay una reacción paradójica. El grupo de 30 días postimplante presenta la mayor diferencia en resistencia, teniendo los fémures implantados casi la mitad de la resistencia de sus contralaterales.

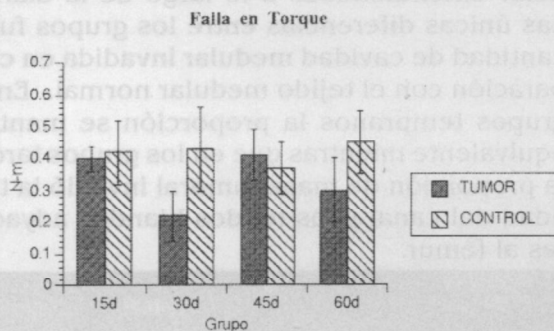


Fig.2: La falla en torque de los diferentes grupos muestra los fémures implantados más débiles que sus contralaterales en todos los grupos de estudio, salvo a los 45 días. Los valores de fuerza están representados en Newtons-metro (N-m). A los 30 días los fémures implantados muestran una debilidad de un 47.75% con respecto de sus contralaterales. Hay diferencias significativas entre los fémures implantados y sus controles a los 30 y 60 días ($p < 0.05$).

La evaluación histológica reveló la presencia de células tumorales en todos los fémures implantados y en todos los grupos de estudio. El tumor causó resorción ósea en las áreas implantadas con una alta actividad osteoclástica. Las metástasis produjeron varios frentes de resorción ósea mediados por osteoclastos sobre la superficie endóstica de la diáfisis y metáfisis distales (fig.4). Los osteoclastos se encontraron en lagunas de Howship de gran tamaño, mientras que las células tumorales estaban libres en el canal medular. Existió además, una severa reacción perióstica sobre el área del tumor. A partir de los 30 días se evidenciaron las primeras microfracturas patológicas que se hicieron más frecuen-

tes y severas al pasar a los grupos de 45 y 60 días (fig.5). En varios sitios se encontraron trabéculas óseas necróticas rodeadas de tumor y sin evidencia de vascularidad. Las lagunas osteocíticas se notaron vacías o con células pequeñas y picnóticas. La severidad histológica era evidentemente progresiva: a los 15 días las lesiones se localizaron en el canal medular sin mayor evidencia de lesión cortical. A los 30 días la proliferación fue global en el canal medular, había alta celularidad tumoral y osteoclástica en metáfisis distal y aparecieron las primeras microfracturas. A los 45 días se encontró un compromiso severo de la metáfisis con proliferación de células hacia los tejidos blandos adyacentes y a los 60 días hubo mayor número de microfracturas con adelgazamiento severo de las corticales.

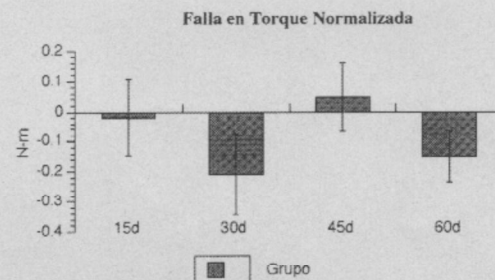


Fig.3: Los datos normalizados representan las diferencias entre los valores en Newton-metro (N-m) de los fémures implantados y los fémures controles. Los valores representados como negativos implican que los fémures implantados son más débiles que los controles, mientras que los valores positivos representan lo contrario. El grupo de 30 días presenta la mayor diferencia, mientras que el de 45 días muestra un valor paradójico.

En la evaluación radiológica se encontró evidencia de cambios tumorales en los fémures implantados que se extendía en un amplio rango entre las regiones supracondílea e intertrocanterica a través del canal medular, con mayor severidad y frecuencia entre más avanzado el proceso. No se evidenciaron grandes fracturas patológicas radiológicamente. El compromiso más severo se encontró a nivel de la metáfisis distal, así como del tercio distal de la diáfisis, especialmente en los grupos más tardíos (45 y 60 días). No se evidenciaron lesiones quísticas. La severidad radiológica de las lesiones aumentó con el tiempo, de acuerdo con la escala de Wingen.³⁰ El menor grado de severidad se encontró en el grupo de 15 días mientras que los cambios más severos en el grupo de 60 días (fig.6).

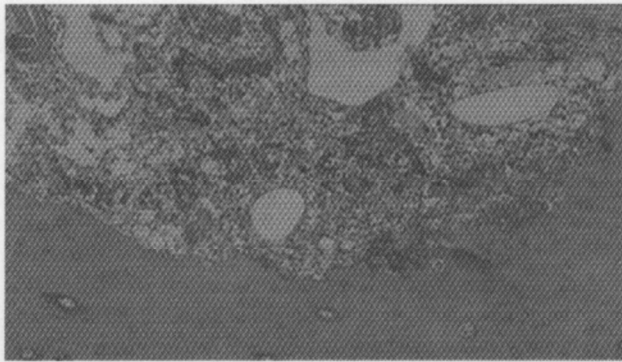


Fig. 4: Los frentes de resorción ósea son amplios y organizados, con una gran cantidad de osteoclastos en actividad sobre la superficie ósea y con las células tumorales en la cavidad medular. En la parte superior se encuentra el interior de la cavidad medular, con la presencia de conglomerados de células tumorales. En la parte central se ve el patrón en sacabocado del frente de resorción sobre la cortical. En la parte inferior se ve la reacción perióstica.

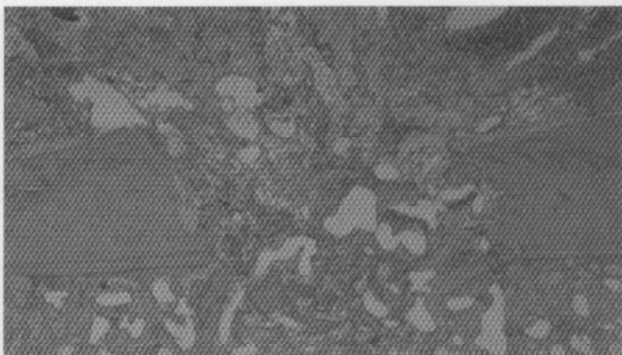


Fig. 5: En la medida en que los frentes de resorción avanzan, la cortical es perforada y se produce una microfractura. Las células tumorales escapan a la periferia e invaden el tejido adyacente. La falla es más un orificio que una fractura completa. Los bordes de la fractura son claros pero no existen los fragmentos faltantes en vista de que se han reabsorbido.

Evaluación Radiológica

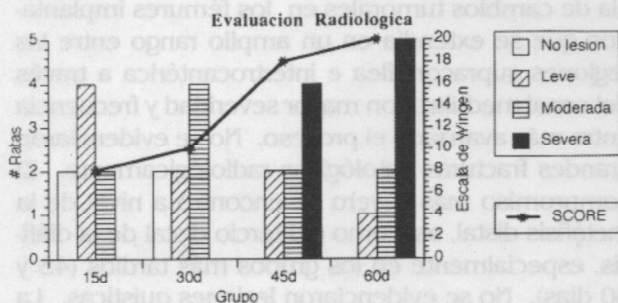


Fig. 6: Los resultados de la evaluación radiológica muestran un aumento progresivo de la severidad con el tiempo. Los grupos de 15 y 30 días no muestran compromisos severos, mientras que los de 45 y 60 días tienen evidencia radiológica de lesión en todos los especímenes. El puntaje de severidad de acuerdo con la escala de Wingin muestra un aumento de la severidad con el tiempo, con el mayor puntaje a los 60 días.

No se encontraron diferencias significativas en contenido mineral óseo ni en densidad mineral ósea entre los femures implantados con tumor y sus controles contralaterales, ni tampoco entre los diferentes grupos de estudio. Estos valores no cambiaron significativamente en el tiempo. Los estudios de resonancia nuclear magnética fueron enfocados hacia la determinación de una adecuada adquisición para lograr un contraste claro entre tumor, tejido medular y tejido óseo. Las mejores imágenes se obtuvieron utilizando un Tr de 2040/80 y un Ts de 34'49. Utilizando esta estrategia con adquisición en T2, se obtuvieron imágenes del tumor en contraste con el hueso y los tejidos blandos adyacentes (fig.7). En este momento pudimos detectar la presencia de masa tumoral en el interior de la cavidad medular extendiéndose a lo largo de la diáfisis. Las únicas diferencias entre los grupos fue la cantidad de cavidad medular invadida en comparación con el tejido medular normal. En los grupos tempranos la proporción se mantuvo equivalente mientras que en los grupos tardíos la proporción de masa tumoral invadió la totalidad del canal y los tejidos blandos adyacentes al fémur.

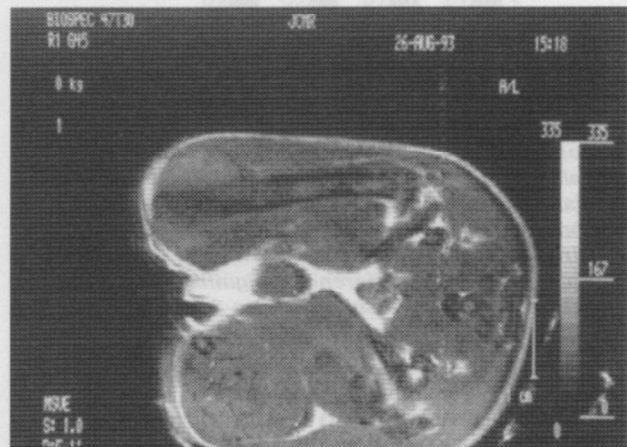


Fig. 7: Las imágenes de resonancia nuclear magnética muestran el compromiso intramedular del fémur y denota la diferencia entre la médula ósea normal (oscura) y el tumor (claro). La imagen es pequeña en la antena de cuerpo entero y no permite una evaluación precisa de los cambios en hueso cortical. Sin embargo, se evidencia la lesión con mayor compromiso de la metáfisis distal.

Discusión

Este estudio describe un modelo para la investigación de las propiedades estructurales del hueso metastásico. Este modelo analiza el comportamiento biomecánico de un tumor maligno de seno implantado en la diáfisis femoral utilizando el

cárcinosarcoma W256. Este tipo celular es ampliamente utilizado y reconocido como altamente metastásico y como causante de osteopenia significativa. Son muchos las especies animales y los modelos experimentales descritos en el estudio de la enfermedad metastásica ósea.^{1,4,7,16,19,20,21} La inmensa mayoría de estudios han sido enfocados hacia el entendimiento del comportamiento biológico y la fisiopatología de las metastásis, analizando desde los patrones de invasión hasta los cambios en el metabolismo óseo.^{9,13,15,25,30} Sin embargo, el estudio de la enfermedad metastásica ósea en modelos animales tiene su principal limitante en la dificultad de la interpretación de las variables, que suelen ser imprecisas o indirectas. La pérdida de la resistencia ósea, que es finalmente la causa fundamental de las fracturas patológicas, suele ser asumida indirectamente mediante la evaluación de imágenes radiológicas, los cambios en la morfología ósea o las variaciones en niveles de calcio en sangre y en orina. No se han descrito, hasta el momento, estudios in-vivo para la evaluación directa de los efectos mecánicos y estructurales de estos tumores en hueso. Una de las limitantes para lograr este objetivo es la vía natural de siembra de las metástasis. La embolia tumoral y los factores celulares y humorales de trofismo que permiten el crecimiento de las metástasis en el hueso hacen que su localización anatómica sea fundamentalmente metafisiaria. El análisis biomecánico de los extremos de los huesos largos es difícil y su interpretación muy complicada. Al utilizar un medio de cultivo gelatinoso que permita la liberación controlada de células tumorales a las 72 horas, podemos tener la facilidad de proporcionar el medio ambiente adecuado para la formación de un tumor metastásico en el sitio deseado.^{22,24} Esta ventaja nos permitió la creación de una metástasis diafisiaria femoral con una línea celular de reconocido poder metastásico y así realizar análisis biomecánicos de torsión buscando el punto de falla por el lugar más débil. Este modelo proporciona el método más directo de evaluación de los efectos mecánicos y estructurales de un tumor lítico metastático, así como de evaluación de agentes terapéuticos en el manejo y prevención de fracturas patológicas.

Nuestros resultados muestran una disminución de la resistencia ósea de 19% en los fémures implantados con tumor. Es de esperarse que la resistencia ósea disminuya progresivamente en la medida que crece un tumor lítico. En nuestro modelo experimental, la resistencia disminuyó proporcionalmente con el tiempo, teniendo los

fémures más fuertes a los 15 días postimplante y los más débiles a los 60 días postimplante. Sin embargo, el comportamiento mecánico de los fémures implantados a los 45 días mostró una recuperación de la resistencia, al compararse con el grupo anterior. Una posible explicación es la reacción ósea ante el estímulo de un invasor lítico generando un aumento en la producción de matriz ósea por parte de los osteoblastos, además de la invasión vascular en los focos de microfracturas con el subsecuente proceso de reparación y aumento relativo de la resistencia ósea como efecto final. La posibilidad de un efecto hormonal sistémico es poco probable ya que no se encontraron cambios significativos en los fémures de control de este grupo al ser comparados con los de los demás. Este interrogante nos abre una ventana de investigación para determinar las causas de este efecto paradójico a los 45 días de implante. El hecho de tener unos fémures implantados casi 50% más débiles que sus controles a los 30 días, sin presentar una devastación masiva o fracturas mayores que no permitirían el estudio en aparatos de análisis biomecánico, nos permite tener un modelo para la evaluación de agentes terapéuticos a corto plazo y a bajos costos con resultados sólidos y de fácil análisis. Una vez demostrada en forma cuantificable la pérdida de resistencia ósea, se realizarán estudios en los que se incluyan otras coelaciones biomecánicas como rigidez ósea y energía en torsión.

Los hallazgos histológicos son consistentes con los cambios reportados en la literatura para los tumores metastásicos W256 en modelos animales. En nuestro modelo pudimos evaluar los efectos diafisiarios del tumor encontrando un patrón reproducible de frentes de resorción osteoclástica sobre las superficies endósticas, y microfracturas que liberan las células tumorales al exterior del hueso atacando los tejidos blandos y el músculo adyacente. La reacción ósea tiende a ser localizada y la lisis osteoclastica organizada en frentes de resorción. Los hallazgos histológicos semejan el cuadro encontrado en las metástasis óseas del humano, con reacción perióstica, localización predominante metafisiaria, proliferación tumoral con reemplazo del tejido medular, necrosis ósea y microfracturas.

La evaluación radiológica se corresponde con los hallazgos histológicos y biomecánicos en los diferentes grupos. La escala de Wingen es una

herramienta objetiva para comparar las lesiones detectables radiológicamente. En este estudio se demostró un aumento progresivo de la severidad con el tiempo. La osteodensitometría ósea no mostró cambios significativos en los fémures implantados, probablemente por haber hecho las mediciones solamente en la diáfisis y no en todo el fémur. Este tipo de estudios permite una cierta determinación de la cantidad de mineral óseo del hueso. Sin embargo, los principales efectos sobre la mineralización se vieron en la región metafisiaria, tal como lo demostraron los estudios radiológicos e histológicos. Los cambios en la matriz ósea mineral del hueso cortical diafisario no sufrieron tantos cambios de acuerdo a el estudio densitométrico. Son de esperarse cambios dramáticos en el contenido y densidad mineral ósea en la región metafisiaria, pero este estudio se centró en los cambios densitométricos en la zona en que se realizaron los análisis biomecánicos en torsión. Los análisis de la resonancia magnética en los fémures implantados nos permitieron, después de muchas pruebas, lograr las adquisiciones adecuadas para obtener el contraste ideal y determinar la magnitud exacta de la masa tumoral. La principal limitante de este estudio es que todos los tumores implantados endomedularmente invaden la totalidad del canal medular y son, por consiguiente, semejantes en tamaño y forma. La digitalización de estas imágenes para su manejo tridimensional utilizando software de manejo de imágenes diagnósticas nos permite observar el tamaño del tumor, pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Los próximos estudios con resonancia magnética serán enfocados hacia la determinación de la pérdida de volumen óseo con adquisiciones que muestren un claro contraste de hueso y utilizando antenas de resonancia para miembros en vez de antenas de cuerpo entero. De esta manera podremos determinar el efecto lítico del tumor sobre la diáfisis y no el tamaño del tumor que suele ser invariable.

Los recientes avances en el tratamiento y pronóstico de las neoplasias malignas han llevado a una prolongación de la expectativa de vida del paciente con cáncer. La incidencia relativa de las metástasis óseas ha aumentado y sus complicaciones crean difíciles problemas de tratamiento. Es de gran importancia la evaluación de los diferentes tratamientos disponibles, así como el desarrollo de nuevos métodos y técnicas para mejorar

los. La prevención de las fracturas patológicas utilizando agentes antiosteolíticos y otras herramientas terapéuticas pueden ser evaluados solamente a través de un modelo in-vivo que permita la valoración directa y sólida de sus efectos mecánicos. Nuestro plan de investigación en el estudio de la enfermedad ósea metastásica demostró en una primera fase la posibilidad de crear un transportador celular tumoral que permite la liberación controlada de células en un sitio anatómico blanco predeterminado. En la segunda fase logramos la formación de una lesión metastásica metafisiaria y diafisaria que semeja clínica, radiológica e histológicamente a las lesiones encontradas en el cáncer óseo metastásico humano. Los análisis biomecánicos muestran con claridad las diferencias en resistencia ósea en los diferentes grupos de estudio. Nuestras investigaciones indican que es posible determinar patrones reproducibles en la pérdida de esta resistencia ósea, y proporcionar una base para comparar los efectos de agentes físicos y farmacológicos sobre el hueso metastásico.

En la actualidad hemos comenzado una tercera fase del estudio de metástasis óseas, en el que se determinan los efectos de agentes terapéuticos sobre el hueso metastásico. Se utilizó el mismo protocolo quirúrgico, la misma línea celular y animal, y se estudió el efecto del Alendronato, un potente Bifosfonato inhibidor de la actividad osteoclástica utilizado experimentalmente en osteoporosis. De los diferentes grupos de estudio de la segunda fase se escogió el sacrificio de los animales a los 30 días, ya que existen en este momento suficientes cambios comparativos sin lesiones mayores que puedan sesgar la información. Los resultados preliminares demostraron una pérdida de la resistencia ósea similar a la del estudio inicial en 80 ratas, demostrando, una vez más, la solidez de nuestro modelo animal. La utilización de Alendronato resultó en una disminución significativa de los efectos líticos del tumor metastásico sobre hueso al ser utilizado como prevención y como tratamiento. Las posibilidades de utilización de nuestro modelo son ilimitadas en el estudio de agentes terapéuticos en metástasis óseas. El estudio de los efectos de agentes citostáticos y de la radiación sobre estos tumores son el siguiente paso esta línea de investigación.

Abstract

The purpose of this investigation was to develop an animal model to study the direct effects of lytic tumors in metastatic bone disease. Pathologic fractures are the result of a loss of bone strength caused by direct and indirect bone resorption in metastatic tumors. The evaluation of these effects are often characterized indirectly by measuring calcium levels, radiological images or survival rates. Walker 256 cells were cultured in a low gelling agarose enriched with culture media and implanted in 0.5 x 1.8 mm cylinders into the right femoral shaft of Sprague Dawley rats. The contralateral femora were sham operated and used as controls. Four groups of eight rats were sacrificed at 15, 30, 45 and 60 days. Six femurs of each group were tested to failure in torsion, finding a significantly lower ultimate load as compared with their contralateral controls by a mean of 19.06%. By day 30 and 60, the tumor bearing femurs were significantly weaker, but at 45 days there was an apparent rise in strength. Histological examination revealed invasion of the medullary canal with high osteoclastic reaction in resorption fronts, and microfractures after 30 days. Radiological severity of the lesions increased with time and no cystic patterns or gross pathologic fractures were found. Both histological and radiological patterns showed distal diaphyseal and metaphyseal compromise. Bone densitometry of the femoral shaft did not show significant differences between tumor bearing femurs and controls. MRI evaluations showed a clear contrast of tumor with surrounding tissues and confirmed the intramedullary growth of the tumor. Our investigations indicate that with this new animal model it is possible to determine repeatable patterns in the loss of bone strength and provide a baseline to compare the effects of pharmacological and physical agents on metastatic bone disease.

Keywords: Metastatic Bone Disease, Rat, Femur, Agarose, Torsion, Torque, Biomechanics.

Agradecimientos

Escuela Colombiana de Medicina
Centro de Investigaciones
Consejo Directivo
Hernando Matiz M.D.
Carlos Leal Urrea M.D.
Gerardo Aristizabal M.D.

Orthopaedic Oncology Group, Massachusetts
General Hospital
Dempsey Springfield M.D.
Henry Mankin M.D.
Eduardo Ortiz M.D.

Orthopaedic Biomechanics Laboratory,
Harvard Medical School
Marie Shea M.S.
Douglas Patterson H.M.S.
Tania Pinilla M.I.T.
Jeff Guy H.M.S.
Elizabeth Myers Ph.D.
Aaron Hecker
Mary Boussein M.I.T. /H.M.S.
Jeanine Goldwin
Meredith Lobo

National Institutes of Health
National Institute of Cancer
Federico Welsch

Bibliografía

1. **Arguello F, Baggs R, Franz Ch.** A Murine Model for Experimental Metastases to Bone and Bone Marrow. *Cancer Res* 48: 6876-6881, 1988
2. **Berrettoni B A, Carter J R.** Mechanisms of Cancer Metastasis to Bone. *Current Concepts Review. J Bone Joint Surg* 68A(2): 308-311, 1986
3. **Coerkamp E G, Kroon H M.** Cortical Bone Metastases. *Radiology* 169(2): 525-528, 1988
4. **Faccinni J M.** The Mode of Growth of Experimental Metastases in Rabbit Femora. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 364(3): 249-63, 1974
5. **Foxall D L, Cohen J S, Mitchell J B.** Continuous Perfusion of Mammalian Cells Embedded in Agarose Gel Threads. *Exp Cancer Res* 154: 521-529, 1984
6. **Galasko C S B, Bennett A.** Mechanisms of Bone Destruction in the development of Skeletal Metastases. *Nature* 263: 507-510, 1976
7. **Galasko C S B** Bone Metastases Studied in Experimental Animals. *Clin Orthop* 155: 269-285, 1981
8. **Galasko C S B,** Mechanisms of Lytic and Blastic Metastatic Disease of Bone. *Clin Orthop* 169: 20-27, 1982
9. **Guaiani A, Sabatini M, Coccioli G, Cristina S, Garattini S, Bartosek I.** An Experimental Rat Model of Local Bone Cancer Invasion and its Responsiveness to Ethane-1-hydroxy-1, 1-bis(phosphonate). *Cancer Res* 45: 2206-2209, 1985
10. **Habermann E T, Sachs R, Stern R, Hirsh D M, Anderson W J.** The Pathology and Treatment of Metastatic Disease of the Femur. *Clin Orthop* 169: 70-82, 1982
11. **Hayes WC:** Biomechanics of cortical and cancellous bone: Implications for Assessment of Fracture Risk. In: *Basic Orthopaedic Biomechanics* (eds., V.C. Mow, and W.C. Hayes) Raven Press, New York, 93-142, 1991.
12. **Hipp J A, McBroom R J, Cheal E J, Hayes W C.** Structural Consequences of Endosteal Metastatic Lesions in Long Bones. *J Orthop Res* 7(6): 828-837, 1989
13. **Hough A, Seyberth H, Oates H, Hartmann W.** Changes in Bone and Bone Marrow of Rabbits Bearing the VX-2 Carcinoma. *Am J Pathol* 87(3) 537-547, 1977

14. **Hulth A, Olerud S.** The Reaction of Bone to Experimental Cancer. *Acta Orthop Scand* 36: 230-240, 1965
15. **Ingall J R.** Model for the Study of Experimental Bone Metastases. *P.S.E.B.M.* 117: 819-822, 1964
16. **Jung A, Bornard J, Mermillod B, Edouard C, Meunier P J.** Inhibition by Diphosphonates of Bone Resorption Induced by the Walker Tumor of the Rat. *Cancer res* 44: 3007-3011, 1984
17. Kenan S, Steiner G C. Experimental Transplantation of the Swarm Rat Chondrosarcoma into Bone: Radiological and Pathological Studies. *J Orthop Res* 9(3): 445-451, 1991
18. **Knutson C O, Spratt J S.** The Natural History and Management of Mammary Cancer Metastatic to the Femur. *Cancer* 26(6): 1199-1203, 1970
19. **Kostenuik P J, Singh G, Suyama K L, Orr F W.** A Quantitative Model for Spontaneous Bone Metastasis: Evidence for a Mitogenic Effect of Bone on Walker 256 Cancer Cells. *Clin Exp Metastasis* 10(6): 403-410, 1992
20. **Kozak S, Rizzoli R, Treschel U, Fleisch H.** Effect of a Single Injection of Two New Bisphosphonates on the Hypercalcemia and Hypercalciuria Induced by Walker Carcinoma 256/B in Thyroparathyroidectomized Rats. *Cancer res* 47: 6193-6197, 1987
21. **Krempien B, Wingen F, Eichmann T, Muller M, Schmahl D.** Protective Effects of a Prophylactic Treatment with the Bisphosphonate 3-Amino-1-Hydroxypropyl-1, 1 Bisphosphonic Acid on the Development of Tumor Osteopathies in the Rat: Experimental Studies with the Walker Carcinoma 256. *Oncology* 45: 41-46, 1988
22. **Li L, Price J E, Fan D, Zang R D, Bucana C D, Fidler I J.** Correlation of Growth Capacity of Human Tumor Cells in Hard Agarose With Their In Vivo Proliferative Capacity at Specific Metastatic Sites. *J Nat Cancer Ins* 81(18): 1406-1412, 1989
23. **McBroom R J, Cheal E J, Hayes W C.** Strength Reduction From Metastatic Cortical Defects in Long Bones. *J Orthop Res* 6(3): 369-378, 1988.
24. **Nicholson G L, Lembo T M, Welch D R.** Growth of Rat Mammary Adenocarcinoma Cells in Semisolid Clonogenic Medium Non Correlated With Spontaneous Metastatic Behavior: Heterogeneity in the Metastatic, Antigenic, Enzymatic, and Drug Sensitivity Properties of Cells From Different Sized Colonies. *Cancer Res* 48: 399-404, 1988
25. **Orr W, Kostenuik P, Sanchez O, Singh G.** Mechanisms Involved in the Metastasis of Cancer to Bone. Personal Communication Reprint., March 1993.
26. **Pugh J, Sherry H, Futterman B, Frankel N.** Biomechanics of Pathologic Fractures. *Clin Orthop* 169: 109-114, 1982
27. **Scher H I, Yagoda A.** Bone Metastases: Pathogenesis, Treatment, and Rationales for Use of Resorption Inhibitors. *Am Jour Med* 82(supl 2A): 6-28
28. **Stoll B A, Parbhoo S.** Bone Metastases Monitoring and Treatment, Raven Press 1983
29. **Toolan BC, Shea M, Myers ER, Borchers RE, Seedor JG, Quartuccio H, Rodan G, and Hayes WC:** Effects of 4-Amino-1-Hydroxybutylidene Bisphosphonate On Bone Biomechanics In Rats. *J Bone Min Res* (7): 1399-1406, 1992.
30. **Wingen F, Eichmann T, Manegold C, Krempien B.** Effects of new Bisphosphonic Acids On Tumor Induced Bone Destruction in the Rat. *J Cancer Res Clin Oncol* 111: 35-41, 1986

Correos de Colombia



Adpostal

Estos son nuestros servicios

¡UTILICELOS!

- Servicio de Correo Ordinario
- Servicio de Correo Certificado
- Servicio de Certificado Especial
- Servicio Encomiendas Aseguradas
- Encomiendas Contra Reembolso
- Servicio Cartas Aseguradas
- Servicio de Filatelia

- Servicio de Giros
- Servicio Electrónico BuroFax
- Servicio Internacional APR/SAL
- Servicio "CORRA"
- Servicio Respuesta Comercial
- Servicio Tarifa Postal Reducida
- Servicios Especiales

TELEFONOS. DE RECLAMOS:

334-0304 y 341-5536

CUENTE CON NOSOTROS

Hay que creer en los correos de Colombia