

## ORIGINALES

# *Características de un modelo tumoral de rata inductor de alteraciones del metabolismo mineral*

**P. Esbrit, C. Gómez, S. Serrano \*, F. de Miguel, J. Hurtado y A. Rapado.**

Laboratorio de la Unidad Metabólica. Fundación Jiménez Díaz. Centro Asociado al Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.

\* Servicio de Patología. Hospital Nuestra Señora del Mar, Barcelona.

### RESUMEN

*Se han estudiado las alteraciones del metabolismo mineral en ratas con implante intramuscular de una cepa de tumor de Walker 256. Hemos encontrado que el tumor induce en los animales hipofosfatemia (a partir del cuarto día postimplante) e hipercalcemia (a partir del octavo día postimplante), junto con un aumento de la excreción renal de estos iones, anteriores al deterioro de la función renal (desde el décimo día tras el implante). Además, a los ocho-diez días después del implante las ratas excretan menos sodio en la orina respecto al grupo control. No hemos encontrado alteraciones en el magnesio, sodio, potasio, bicarbonato y en cociente cloro/fosfato séricos ni en el magnesio y potasio en la orina de las ratas a los ocho-diez días del implante. Tampoco encontramos niveles de fosfatasa alcalina sérica distintos de los del grupo control. El estudio histomorfométrico del fémur de rata reveló un aumento de los parámetros de reabsorción ósea inducido por el implante. Estas características son similares a las observadas en ciertos pacientes con hipercalcemia tumoral.*

Palabras clave: **Metabolismo mineral. Hipercalcemia tumoral. Tumor de Walker 256.**

### CHARACTERIZATION OF A RAT TUMOR INDUCING CHANGES IN MINERAL METABOLISM

#### SUMMARY

*Certain features of mineral metabolism have been studied in rats bearing an intramuscularly transplanted strain of Walker 256 carcinosarcoma. The tumor induced hypophosphatemia and hypercalcemia by days 4 and 8, respectively, after*

Correspondencia: Dr. P. Esbrit.  
Laboratorio Unidad Metabólica.  
Fundación Jiménez Díaz.  
Avda. Reyes Católicos, 2.  
28040 Madrid.

Recibido: 10-IX-87.  
Versión definitiva: 18-XI-87.  
Aceptado: 20-XI-87.

*tumor transplantation. An increased renal excretion of calcium and phosphate was also observed before renal impairment appeared from day 10 in the tumor-bearing animals.*

*In addition, by 8-10 days, the tumor-bearing group excreted less sodium in urine compared to the control group. By this time, magnesium, sodium, potassium, bicarbonate and chloride/phosphate ratio in serum and renal magnesium and potassium excretion were unchanged in tumor-bearing rats. Moreover, serum alkaline phosphatase levels did not differ between the two groups of rats. Quantitative bone histomorphometry showed increased indices of bone resorption in the tumor-bearing rats. These findings are similar to those described in humoral hypercalcemia of malignancy in humans.*

## Introducción

Una diversidad de tumores de distinto origen se asocian comúnmente con hipercalcemia en ausencia de signos de metástasis óseas o hipercalcemia de tipo humoral (HTH). Algunas características, aunque no todas, de este síndrome implican alteraciones de la función renal que son comunes a las del hiperparatiroidismo primario. Aunque aún se desconoce con exactitud la naturaleza del agente (o agentes) responsable de las alteraciones observadas en este síndrome, estudios recientes sugieren que posee algunas de las propiedades de la parathormona (PTH), pero es de peso molecular mayor<sup>1-3</sup>. En los últimos años se han utilizado algunos tumores animales como modelos experimentales de este síndrome<sup>1, 4, 5</sup>. Entre ellos, el carcinosarcoma Walker 256 es un tumor primario de mama trasplantable en la rata, una de cuyas variedades induce alteraciones similares a las de la HTH. Recientemente se ha conseguido purificar parcialmente de células de esta variedad de tumor un factor con propiedades características de los factores transformantes del crecimiento capaz de reabsorber hueso «in vitro»<sup>8</sup>.

En este trabajo describimos algunas características que afectan al metabolismo mineral; de una cepa perteneciente a la variedad hipercalcemiantes del tumor de Walker 256. Esta línea tumoral ha sido extensamente utilizada en nuestra institución para el estudio del mecanismo responsable de la hipoglucemia asociada a las neoplasias<sup>9</sup>.

## Material y métodos

### *Implante del tumor*

Se utilizaron ratas Wistar hembras de unos 200 g. de peso, alimentadas con una dieta estándar y agua «ad libitum». El implante del tumor se realizó por inoculación de fragmentos de 100 mg. de tejido tumoral i.m. en uno de los miembros delanteros del animal. El máximo desarrollo del tumor en estas condiciones se alcanza en un período de doce-trece días

después del implante<sup>10</sup>. No se evidenciaron metástasis esqueléticas o en otros órganos mediante criterios anatomopatológicos o radiológicos.

### *Análisis de variables bioquímicas*

La excreción de los parámetros bioquímicos se estudió colocando a los animales portadores de tumor o controles normales, sin implante de la misma edad y sexo, en jaulas metabólicas para recoger la orina excretada durante dieciocho horas de ayuno. Los diferentes parámetros séricos se analizaron a partir de muestras de sangre tomadas a los animales en ayunas a los diferentes días después del implante.

El calcio y el magnesio en suero y en orina se analizaron por espectroscopia de absorción atómica (Perkin-Elmer, mod. 305B). El fosfato sérico y el urinario se midieron por el método de Fiske-Subbarow<sup>11</sup> y la creatinina en suero y en orina se determinaron por colorimetría, usando la reacción de Jaffé<sup>12</sup>. El resto de las variables bioquímicas estudiadas se determinaron en un autoanalizador SMAC 20 (Technicon) (proteínas y fosfatasa alcalina) y en un autoanalizador ASTRA 4 (Beckman) (sodio, potasio y bicarbonato).

### *Análisis histológicos*

El riñón se fijó en formol 10 % y se incluyó en parafina. Los cortes de 7 µm de espesor, efectuados con micrótopo, se tiñeron con hematoxilina-eosina.

El fémur se fijó en alcohol 70 %, se deshidrató con concentraciones crecientes de acetona y se incluyó en metilmetacrilato de bajo peso molecular. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor mediante un micrótopo tipo K de Jung provisto de una cuchilla con filo de carburo de tungsteno (perfil HK2), que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y tricómico de Goldner. Las medidas morfométricas se realizaron mediante un sistema semiautomático integrado por un microscopio con cámara clara y un tablero digitalizador conectado a un ordenador (Morphomat 30, Zeiss).

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba

de la «t» de Student no emparejada y el análisis de la varianza.

## Resultados

La figura 1 muestra los cambios en los niveles de calcio, de fosfato y de creatinina, en el suero de las ratas, a los diferentes días tras el implante tumoral. Como puede observarse, la calcemia se mantuvo dentro del rango normal hasta el séptimo día, elevándose después de un modo exponencial hasta alcanzar una meseta hacia el duodécimo día tras el implante. Por el contrario, el fosfato sérico disminuyó significativamente respecto al grupo control desde el cuarto día hasta el décimo tras el implante, después del cual se elevó (no significativamente), aunque sin llegar a normalizarse (fig. 1). Las cifras de creatinina en suero fueron aumentando desde el sexto día, sobrepasando el rango normal a partir del décimo día después del implante (fig. 1). Así pues, a los ocho-diez días después del implante las ratas presentaron hipercalcemia e hipofosfatemia, con una función renal normal estimada por los niveles de creatinina sérica y por examen histológico del riñón, que no reveló signos de nefrocalcinosis cortical o medular. Durante este período los animales portadores del tumor perdieron 10-30 g. de peso corporal y sus niveles de proteínas séricas descendieron a  $5,2 \pm 0,1$  g/l. (n = 9), frente al valor del grupo control:  $6,4 \pm 0,1$  g/l. (n = 13) ( $\bar{X} \pm ES$  p < 0,001), mientras que la masa tumoral alcanzó 3-10 g. en el mismo período.

Como puede observarse en la tabla I, las variaciones en el calcio y en el fosfato sérico se reflejan en aumentos muy significativos en la excreción urinaria de ambos iones a los ocho-diez días tras el implante tumoral. Al mismo tiempo, no observamos variaciones estadísticamente significativas respecto a los controles en el magnesio sérico y en el excretado en la orina, en el cociente cloro sérico/fosfato sérico y en el bicarbonato sérico (tabla I). Tampoco encontramos diferencias significativas en el potasio y en el sodio séricos (datos no mostrados) ni en la excreción de potasio en las ratas a los ocho-diez días tras el implante, aunque la excreción de sodio disminuyó por debajo del límite de detección del autoanalizador (< 10 mmol/l.) respecto al grupo control ( $0,61 \pm 0,05$  mmol/l. FG,  $\bar{X} \pm ES$ , n = 14). La fosfatasa alcalina en el suero de los animales portadores del tumor durante ocho-diez días fue indistinguible de la del grupo control (tabla I).

Los fémures de rata durante este período tras el implante no mostraron signos de metástasis tumoral. En cambio, presentaron un marcado aumento del número de osteoclastos y de las superficies de reabsorción, especialmente en la cortical cercana al tumor (10 y cinco veces mayor que en el hueso de rata nor-

mal, respectivamente) (fig. 2). Al mismo tiempo, en el hueso de rata con tumor, el volumen trabecular era unas dos veces inferior al del hueso normal.

## Discusión

Actualmente se conocen pocos modelos de tumores experimentales productores de alteraciones en el metabolismo mineral similares a las observadas en sujetos con ciertas neoplasias, conocido como síndrome de HTH<sup>1, 4, 5</sup>. Uno de estos modelos es una variedad del carcinosarcoma de Walker 256, inductor de este síndrome en la rata a través de un mecanismo aún incompletamente caracterizado<sup>6, 7</sup>.

En el presente estudio hemos encontrado que el implante i.m. de una cepa tumoral de Walker 256 induce en las ratas portadoras hipercalcemia e hipofosfatemia, junto con un aumento de excreción renal de estos iones, asociadas al desarrollo del tumor. Así, la hipercalcemia se observó a partir del octavo día, alcanzando un máximo hacia el duodécimo día después del implante. Los niveles de fosfato sérico fueron inferiores a los del grupo control desde el cuarto hasta el duodécimo día después del implante, independiente de la calcemia, y sólo tendieron hacia los de los controles al duodécimo día, cuando la creatinina sérica estaba elevada indicando el deterioro de la función renal.

Nuestros resultados están de acuerdo con los de Minne y cols.<sup>6</sup> y de Schmidt-Gayk y cols.<sup>7</sup>, aunque los cambios que observan en la calcemia y en la fosfatemia estos grupos son más precoces que los de nuestro estudio, quizá debido a diferencias en la cepa tumoral y/o en la estirpe de rata receptora del implante. Estos cambios en los niveles séricos y urinarios de calcio y de fosfato reflejan alteraciones en el metabolismo de estos iones similares a los que se observan en sujetos con HTH o hiperparatiroidismo primario<sup>2</sup>. Estas alteraciones son al parecer inducidas por una familia de factores con capacidad para reabsorber hueso y/o alterar la reabsorción tubular del calcio y del fosfato, alguno de los cuales, aunque no todos, actúan en parte a través de receptores para la PTH<sup>13, 14</sup>. Sin embargo, al igual que otros grupos, no hemos encontrado en nuestras ratas con implante, alteraciones en el bicarbonato o en la relación cloro sérico/fosfato sérico, parámetros bioquímicos alterados en los estados hiperparatiroides<sup>2, 15</sup>. En nuestro estudio las ratas a los ocho-diez días del implante, cuando la función renal es aún normal, no presentan alteraciones ni en la magnesemia ni en la excreción urinaria de magnesio a pesar de la hipercalcemia. Este hecho podría deberse a un aumento de la reabsorción proximal del magnesio como consecuencia de la depleción de volumen en las ratas con implante (ver más adelante)<sup>16</sup>. Aunque tampoco podría

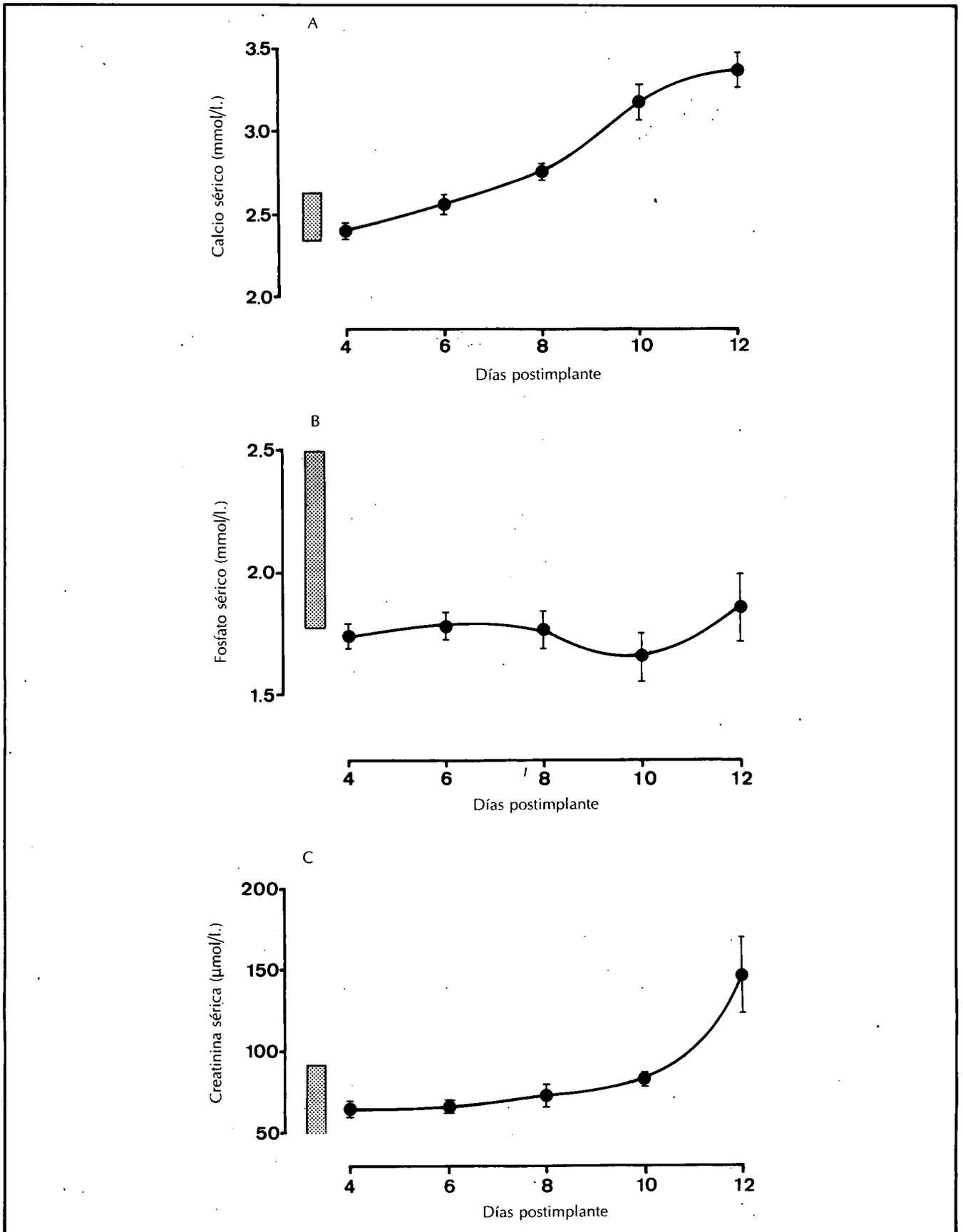


Fig. 1.—Variaciones en el calcio (A), fosfato (B) y creatinina (C) séricos en ratas portadoras i.m. de tumor de Walker 256. Las zonas sombreadas corresponden al rango normal respectivo. Cada punto representa la media  $\pm$  ES.

**Tabla I.** Variables bioquímicas en ratas portadoras de carcinoma de Walker 256 a los ocho-diez días del implante y en ratas controles ( $\bar{X} \pm ES$ )

|   | Controles            | Walker 256           | P       |
|---|----------------------|----------------------|---------|
| Aclaramiento de creatinina (ml/min.)              | 0,48 $\pm$ 0,03 (18) | 0,42 $\pm$ 0,04 (10) | NS      |
| Excreción urinaria de calcio ( $\mu$ mol/l. FG)   | 14 $\pm$ 3 (16)      | 152 $\pm$ 38 (9)     | < 0,001 |
| Excreción urinaria de magnesio ( $\mu$ mol/l. FG) | 177 $\pm$ 21 (14)    | 133 $\pm$ 21 (10)    | NS      |
| Excreción fraccional de fosfato (%)               | 19 $\pm$ 2 (13)      | 41 $\pm$ 4 (11)      | < 0,001 |
| Excreción urinaria de potasio (mmol/l. FG)        | 1,28 $\pm$ 0,05 (17) | 1,42 $\pm$ 0,12 (10) | NS      |
| Calcio sérico (mmol/l.)                           | 2,50 $\pm$ 0,02 (17) | 2,95 $\pm$ 0,06 (10) | < 0,001 |
| Magnesio sérico (mmol/l.)                         | 0,89 $\pm$ 0,02 (18) | 0,84 $\pm$ 0,03 (9)  | NS      |
| Fosfato sérico (mmol/l.)                          | 2,03 $\pm$ 0,10 (13) | 1,80 $\pm$ 0,07 (11) | < 0,05  |
| Cloro sérico/fosfato sérico                       | 18,6 $\pm$ 0,9 (13)  | 20,1 $\pm$ 1,4 (6)   | NS      |
| Bicarbonato sérico (mmol/l.)                      | 20,8 $\pm$ 0,6 (22)  | 20,5 $\pm$ 0,8 (7)   | NS      |
| Fosfatasa alcalina (U/l.)                         | 103 $\pm$ 7 (7)      | 99 $\pm$ 11 (8)      | NS      |

Los valores entre paréntesis indican el número de casos analizados. FG: Filtrado glomerular.



descartarse un posible efecto directo de alguno de los factores segregados por el tumor sobre la reabsorción tubular del magnesio. Tal efecto sobre la reabsorción tubular del magnesio y/o del calcio es difícil de evaluar con los datos mostrados en este estudio, ya que en este síndrome existe un aumento de carga filtrada de calcio y ambos cationes parecen compartir, al menos parcialmente, un mecanismo común de transporte en el túbulo renal<sup>17</sup>. No hemos encontrado cambios en los niveles de potasio en suero y en orina en las ratas con implante. Aunque el sodio en suero de estas ratas era normal, los niveles de este catión en la orina fueron inferiores a los del grupo control.

Este efecto está posiblemente en relación con una mayor reabsorción proximal del sodio inducida por la hipercalcemia, que ocurre como una compensación al efecto diurético inicial sobre el sodio producido por el aumento en la carga filtrada de calcio en las ratas con implante<sup>18</sup>. El aumento de los parámetros de reabsorción ósea, en ausencia de metástasis en el fémur de rata a los ocho-diez días del implante, indica una acción humoral del tumor sobre el hueso. Al mismo tiempo, el hallazgo de un volumen trabecular disminuido en la rata con implante podría ser consecuencia tanto de un aumento de reabsorción ósea como de una disminución de formación de hueso.

so, o de ambos, como ocurre en la HTH humana<sup>19</sup>. Los niveles de fosfatasa alcalina, un marcador de la actividad de formación ósea, fueron normales (y no elevados) en el suero de las ratas a los ocho-diez días del implante, aunque este parámetro es normal en un porcentaje variable de casos en que existe un recambio óseo aumentado<sup>2</sup>. Por tanto, sin una cuantificación de parámetros osteoblásticos, no podemos establecer definitivamente la existencia de un desacoplamiento óseo en nuestro modelo tumoral.

De estos datos se deduce que, en nuestra experiencia, el carcinosarcoma de Walker 256 implantado en rata exhibe características bioquímicas e histomorfométricas, algunas comunes a los estados hiperparatiroides, desarrolladas en un período de tiempo corto (ocho-diez días), que lo hacen un modelo idóneo para el estudio de los mecanismos inductores de las alteraciones del metabolismo mineral asociadas a ciertas neoplasias.

#### Agradecimientos

Queremos agradecer la colaboración del doctor A. Barat, del Departamento de Anatomía Patológica, por llevar a cabo el estudio histológico de las biopsias renales, así como de los laboratorios de Nefrología y de Bioquímica Clínica de la Fundación Jiménez Díaz, donde se realizaron los análisis de las muestras de sangre y orina en autoanálizador. También agradecemos la asistencia técnica de A. de Blas y C. Palomino. Finalmente agradecemos a L. Gulliksen por la mecanografía del manuscrito.

Este trabajo ha sido financiado en parte con una ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (exp. n.º 86/749).

#### Bibliografía

1. Esbrit P y Rapado A: Hipercalcemia tumoral. *Rev Clín Esp* 177:361-363, 1985.
2. Godsall JW, Burtis WJ, Insogna KL, Broadus AE y Stewart AF: Nephrogenous cyclic AMP, adenylate cyclase-stimulating activity and the humoral hypercalcemia of malignancy. *Recent Prog Horm Res* 42:705-750, 1986.
3. Mundy GR: The hypercalcemia of malignancy. *Kidney Int* 31:142-155, 1987.
4. Insogna KL, Stewart AF, Vignery AM-C, Weir EC, Namnum PA, Baron RE, Kirkwood JM, Deftos LM y Broadus AE: Biochemical and histomorphometric characterization of a rat model for humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology* 114:888-896, 1984.
5. Mathews PN, Nisbet J, Grant AG y Herman-Taylor J: Tumor cachexia and hypercalcemia in nude rats and mice bearing human renal carcinomas. *J Urol* 135:1308-1311, 1986.
6. Minne H, Raue F, Bellwinkel S y Ziegler R: The hypercalcemic syndrome in rats bearing the Walker carcinosarcoma 256. *Acta Endocrinol* 78:613-624, 1978.
7. Schmidt-Gayk H, Löhrke H, Fischkal A, Goertler K y Hofmann F: Urinary cyclic AMP and bone histology in Walker carcinosarcoma: evidence of parathyroid hormone-like activity. *Eur J Cancer* 15:1211-1218, 1979.
8. D'Souza SM, Ibbotson KJ, Smith DD y Mundy GR: Production of a macromolecular bone-resorbing factor by the hypercalcemic variant of the Walker rat carcinosarcoma. *Endocrinology* 115:1746-1752, 1984.
9. Piedra C de la, Rubert LD, Jerez E y Castro Mendoza HJ: Giucagon and epinephrine effect on blood glucose levels in rats carrying Yoshida solid sarcoma and Walker 256 carcinosarcoma. *Biomedicine* 31:139-141, 1979.
10. Gómez C, Montañés I y Vicente J: Biosíntesis del DNA en el hígado de animales portadores de tumores extrahepáticos: papel de la timidilato sintetasa. *Rev Clín Esp* 159:163-166, 1980.
11. Fiske C y Subbarow T: The colorimetric determination of phosphorous. *J Biol Chem* 66:375-400, 1925.
12. Taussky HH: A microcolorimetric determination of creatinine in urine by the Jaffé reaction. *J Biol Chem* 208:853-861, 1954.
13. Mundy GR: Pathogenesis of hypercalcemia of malignancy. *Clin Endocrinol* 23:705-714, 1985.
14. D'Souza SM, Ibbotson KJ y Mundy GR: Failure of parathyroid hormone antagonists to inhibit in vitro bone resorbing activity produced by two animal models of the humoral hypercalcemia of malignancy. *J Clin Invest* 74:1104-1107, 1984.
15. Díaz Curiel M, Castrillo JM y Rapado A: Chloride/phosphorous ratio and hyperparathyroidism. *Ann Int Med* 87:251, 1977.
16. Quamme GA y Dirks JH: Renal handling of magnesium. En Brenner BM y Stein JH, eds: Divalent ion homeostasis, pp. 53-82: Churchill Livingstone, Londres, 1983.
17. Klahr S y Hruska K: Effects of parathyroid hormone on the renal reabsorption of phosphorous and divalent cations. En Peck WA, ed: Bone and Mineral Research, pp. 65-124: Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, 1983.
18. Harinck HJJ, Bijvoet OLM, Plantingh AST, Body J-J, Elte JWF, Sleebom HP, Wildiers J y Neijjt JP: Role of bone and kidney in tumor-induced hypercalcemia and its treatment with bisphosphonate and sodium chloride. *Am J Med* 82:1133-1142, 1987.
19. Stewart AF, Vignery A, Silvergate A, Ravin ND, Livolsi V, Broadus AE y Baron R: Quantitative bone histomorphometry in humoral hypercalcemia of malignancy: uncoupling of bone cell activity. *J Clin Endocrinol Metab* 55:219-227, 1982.