

TRABAJOS CIENTÍFICOS

Cultivo primario e inmortalización de células de paratiroides para trasplante celular, en hipoparatiroidismo quirúrgico

Drs. PATRICIO CABANÉ T, RICARDO ROSSI F, SOFÍA OVIEDO, CARMEN ROMERO, RAÚL CAVIEDES C, PABLO CAVIEDES F

Departamento de Cirugía y de Endocrinología, Hospital Clínico, Universidad de Chile.
Laboratorio Cultivo de Tejidos, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

RESUMEN

El hipoparatiroidismo permanente ocurre después de tiroidectomía (0,2-4%) o de cirugía paratiroidea. Lamentablemente el autotrasplante no es 100% efectivo para prevención, y los pacientes deben recibir suplementación de vitamina D y calcio de por vida, con un costoso y a veces difícil manejo médico. Poca experiencia hay a nivel mundial de alotrasplantes paratiroides en humanos. Un grupo de investigadores logró un período de sobrevida del injerto de 1 año en 8 pacientes, pero sin consignar los requerimientos de calcio y vitamina D. La dificultad de esta terapia es el rechazo por aloinmunización, y el establecimiento de cultivos primarios duraderos que permita conseguir una masa de células suficiente para el trasplante. Se ha logrado mantener cultivos, y función endocrina de ellos, por 60 días máximo. Nuestro objetivo es modificar y optimizar los cultivos primarios de paratiroides humana para: a) Obtener una línea continua de células paratiroideas, b) caracterizar la línea en cuanto a función endocrina, y c) disminuir la antigenicidad, como fuente futura de trasplante celular. La serie presentada incluye 5 pacientes intervenidas quirúrgicamente por hiperparatiroidismo primario, con diagnóstico definitivo de adenoma paratiroideo. Las muestras fueron sometidas a digestión enzimática y disgregación mecánica, cultivándose finalmente en placas de Petri a 37 °C. Resultados: Todos los cultivos primario fueron efectivos, con morfología típica a la microscopía. El primer cultivo creció y produjo PTH, pero no sobrevivió a contaminación del medio de cultivo. Los otros 4 están aún en período de expansión (crecimiento y multiplicación) con 150, 60, 40 y 35 días de cultivo. La función endocrina de las células en cultivo fue estudiada midiendo PTH en el medio de cultivo. Se obtuvo una producción promedio de 521,6 pg/ml en 24 horas (224-730 pg/ml). Todos los cultivos fueron positivos para esta medición.

PALABRAS CLAVES: *Alotrasplantes paratiroideo, cultivo celular, hipoparatiroidismo quirúrgico*

SUMMARY

Permanent hypoparathyroidism occurs following thyroidectomy (0.2 to 4%) or parathyroid surgery. Unfortunately, auto-transplant is not effective in all cases and patients must receive a lifetime supplement of vitamin D and calcium with the associated cost and difficulties for medical management. There is little world experience in human parathyroid allotransplantation. A group of researchers reported graft survivals up to 1 year in 8 patients. However, there was no mention of calcium or vitamin D requirements. This therapy is difficult due to rejection by alloimmunization. On the other hand, permanent primary cultures to achieve

enough cells for the transplant must be established. So far, cultures with endocrine function have been maintained for a maximum of 60 days. Our goal is to modify and optimize primary cultures of human parathyroid glands to: a) obtain a continuous line of parathyroid cells, b) characterize the endocrine function of this cell line and c) decrease antigenicity. The series includes 5 patients with primary hyperparathyroidism submitted to surgery. The definite diagnosis was parathyroid adenoma. The samples were treated with enzymatic digestion and mechanical dissociation. Cultures were done in Petri dishes at 37 degrees Celsius. Results: all primary cultures were effective with typical morphology at the microscopic level. The first culture grew and produced PTH but did not survive due to contamination of the culture medium. The other four cultures are still in the period of expansion (growth and multiplication) at 150, 60, 40 and 35 days, respectively. The average PTH concentration in the culture medium was 521.6 pg/ml in 24 hours (224-730 pg/ml). All cultures produced PTH.

KEY WORDS: *Parathyroid allotransplantation, cell cultures, surgical hypoparathyroidism*

INTRODUCCIÓN

El hipoparatiroidismo postcirugía de tiroides es una de las secuelas más importantes de este tipo de intervención (0,2-4%), y en algunos casos es una condición de difícil mensaje médico.

Por esto, se han desarrollado técnicas de diagnóstico intraoperatorio de Paratohormona (PTH) para evitar una resección desmedida de glándulas paratiroides, estableciendo criterios de autotrasplante cuando sea necesario.¹

En seres humanos, el autotrasplante de células paratiroides (PT) se inició en la década del 70, en que se realizó paratiroidectomía total más autotrasplante del tejido PT en antebrazo, como tratamiento del hiperparatiroidismo secundario por insuficiencia renal. También en casos de tiroidectomía total por cáncer o bocio, al comprometerse la vascularización de las glándulas PT, se realiza autotrasplante injertando el tejido PT disgregado en el músculo esternocleidomastoideo o en la musculatura antebraquial.²

La indicación de paratiroidectomía, en el hiperparatiroidismo primario (90% adenoma, 10% hiperplasia) también conlleva el riesgo de hiperparatiroidismo, y el autotrasplante en el mismo acto operatorio es una herramienta valiosa para evitarlo.

Sin embargo, hay pacientes que aun sufren de hiperparatiroidismo quirúrgico, o bien pacientes en que el autotrasplante no funciona, teniendo que mantener un tratamiento con suplemento de Calcio y Vitamina D por vía oral o incluso endovenoso, siendo muy costoso.

Por esto se ha intentado el alotrasplante de células paratiroides (PT). Se ha probado que el alotrasplante en animales (ratones desnudos hipocalcémicos) mejora los niveles de calcemia, pero por un tiempo limitado en que sobreviene el rechazo del injerto. Para este tipo de trasplante no se justifica el uso de inmunosupresión, por lo mis-

mo se ha intentado evitar el rechazo de varias maneras. Además, cabe mencionar que las células de glándulas paratiroides en cultivo disminuyen la expresión de antígenos HLA, lo que las hace buenas candidatas. Por ejemplo, se ha intentado el trasplante en ventrículos cerebrales (para evitar el contacto con tejido linfóide), y de células de glándula paratiroides microencapsuladas, sin tratamiento inmunosupresor, en ratas. Estos injertos fueron funcionales por 3 meses.³ En trabajos en que se probó el uso de Ciclosporina A como tratamiento inmunosupresor preoperatorio, se vio un aumento de la supervivencia del injerto de 5 veces.⁴

Las primeras experiencias de alotrasplante en humanos se remontan a 1973, cuando Groth *et al* realizaron un trasplante de tejido PT en un paciente que además fue sometido a un trasplante renal. Este injerto se mantuvo funcional por 21 meses. Experimentos similares reportan duración de los injertos de 10 a 30 meses. Un solo caso mantuvo su funcionalidad por 13 años. Se trata de un paciente portador de un trasplante renal (bajo inmunosupresión crónica) que recibió un injerto de PT HLA compatible.^{5,6}

En cuanto a la funcionalidad y homeostasis del calcio, hay trabajos que muestran trasplantes de tejido PT en cultivos primarios (de adenoma PT), en que los pacientes que recibieron una cantidad de tejido equivalente a una glándula PT normal, no necesitaron suplementación de vitamina D ni de Calcio por 6 meses (sin inmunosupresión).

Así se han continuado los esfuerzos por obtener el cultivo de tejido PT más adecuado para el alotrasplante. Se ha intentado utilizar un método de "huésped intermediario" para mantener por largo tiempo la funcionalidad del tejido a trasplantar. Se utilizó tejido de pacientes con hiperparatiroidismo (por hiperplasia PT) y donantes cadáver. El tejido de los donantes se mantuvo por 16 a 130 días en la cápsula renal de ratones Balb/c (nu/nu), y luego

se trasplantó el tejido a dos pacientes con hipoparatiroidismo quirúrgico. En estos pacientes se redujo a 1/3 la dosis de Calcio y vitamina D, en comparación con el estado preoperatorio. El hecho de no lograr el destete de la suplementación se atribuye a la cantidad reducida de tejido trasplantado (menos de 15 mg).⁷

Otra experiencia se realizó cultivando *in vitro* glándulas hiperplásicas. Los pacientes fueron trasplantados en su antebrazo no dominante y mantuvieron niveles de PTH normal por 18 meses, después de los que se comenzó a detectar signos de reactividad inespecífica y específica de linfocitos T, contra los donantes. En este trabajo, de 28 pacientes alotrasplantados, uno recibió tejido PT de un donante que se encontraba bajo inmunosupresión crónica. Este sujeto tuvo mayor sobrevida del injerto y menos signos de aloinmunización. Algunos pacientes requirieron un retrasplante para aumentar sus niveles de PTH. En éstos se observó una pérdida de función del injerto más rápida, muy probablemente debido a aloinmunización y rechazo.⁸

Los últimos avances están apuntados a establecer el mejor método de cultivo y selección de células PT, que no expresan antígenos HLA, para evitar el rechazo en pacientes alotrasplantados sin tratamiento inmunosupresor.⁹ Es así como Liu *et al* estableció cultivos primarios de tejido de pacientes con diagnóstico de hiperparatiroidismo (HPT) primario esporádico (adenoma o hiperplasia), no familiar. Estos cultivos se realizaron mediante disgregación mecánica y enzimática (colagenasa y deoxyribonucleasa). Luego, por centrifugación en Percoll isotónico estándar al 25%, se separó las células secretoras de detritos y células muertas. Se cultivó en medio para queratinocitos libre de suero y en medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Con ese protocolo obtuvo más del 95% de viabilidad celular (evaluado con azul Tripán). La caracterización de las células en cultivo se realizó por medición de PTH en el medio, inmunohistoquímica con anticuerpos contra PTH, y por medición de parámetros de respuesta a distintas concentraciones de vitamina D y calcio en el medio extracelular. Pudo establecer cultivos primarios con células PT secretoras de PTH que mantuvieron su función por 60 días. Las células se reprodujeron hasta el primer subcultivo.¹⁰

Hay evidencias aisladas de investigadores que han logrado establecer cultivos primarios más duraderos, pero son datos que no ha sido posible reproducir.¹¹

Una de las mayores limitaciones en el trasplante celular es contar con cultivos celulares continuos

que permitan caracterizar e individualizar las células, y en los que se pueda realizar intervenciones, como para introducir marcadores moleculares o bien para impedir la expresión de antígenos HLA (*antisense therapy*).

Es por esto que en nuestro laboratorio se está trabajando en la optimización de cultivos de PT humana y en el establecimiento de una línea continua de células de glándula paratiroides humana, con el propósito de generar una fuente estable y segura de células para trasplante celular.

En cuanto al primer punto, el tener una cantidad suficiente de tejido paratiroideo humano, en cultivos primarios, puede ser una herramienta terapéutica muy valiosa para pacientes que sufren de hipoparatiroidismo quirúrgico, quienes tienen que someterse a terapias de suplementación crónicas, costosas y muchas veces complejas (tratamientos endovenosos, hipocalcemia aguda, etcétera). Por otro lado, el contar con la experiencia de manejo y caracterización de cultivos primarios de células PT, permitirá fácilmente realizar autotrasplantes en pacientes paratiroidectomizados.

Por todo lo anterior, queda claro que establecer un protocolo de obtención de tejido paratiroideo humano, de pacientes intervenidos por hiperparatiroidismo primario, abre las puertas de una nueva alternativa de trasplante celular en humanos y ofrece una solución definitiva a un grupo de pacientes.

Nuestro objetivo es establecer óptimas condiciones de cultivo primario de tejido paratiroideo en el laboratorio, para realizar alotrasplante en pacientes hipoparatiroides quirúrgicos. Establecer una línea celular continua de células principales paratiroides, con el fin de tener un modelo celular de estudio *in vitro* no finito. Caracterizar la línea continua de paratiroides humana, desde el punto de vista de parámetros de funcionalidad y bioseguridad, como posible candidata de trasplante celular.

MATERIAL Y MÉTODO

Para la primera etapa de esta línea de investigación, se incluyeron sólo los pacientes con diagnóstico clínico de hiperparatiroidismo primario que deban ser sometidos a una resección quirúrgica (paratiroidectomía) como tratamiento de su patología. Para los estudios *in vitro* posteriores, sólo se incluyeron las muestras de tejido en que se confirmó la naturaleza benigna de la lesión, se descartaron muestras con signos de atipia o claro diagnóstico de malignidad.

Análisis anatomopatológico de la muestra

Las muestras fueron analizadas por un patólogo, quien realizó una biopsia rápida con técnica estéril, reservando un trozo de la pieza para su análisis definitivo posterior.

Cultivos primarios y establecimiento de línea inmortal

Las biopsias (0,5 a 1 mm³) fueron transportadas en medio de cultivo DMEM/F12 a 4 °C. En el laboratorio se procedió a disgregar las muestras en forma mecánica, separando el tejido identificable como parénquima del estroma. Luego se cortaron las muestras en trozos de 1 x mm, en medio estéril con Colagenasa IV 0,2% (Worthington). Técnica estéril. Se cultiva por 30 minutos a 37 °C.

Después se disocia el tejido pasando la suspensión celular a través de una pipeta Pasteur. Se procede entonces a centrifugar a 40 RPM por 10 minutos, se resuspende la fracción que contiene las células de PT en Medio de Cultivo DMEM/Ham's F12+SB 10% + SFB 5% + Gentamicina (40 mg/l). Se sembraron en placas de vidrio de 10 cm de diámetro (Petri), se suplementó el medio con Medio Condicionado de UCHT-1 (que induce proliferación e inmortalización). Se cultivó en cámara de cultivo a 37 °C, con ambiente con 100% de humedad y CO₂ 10%. El recambio de medio de cultivo se realizó con DMEM/Ham's F12 + SB 10% + SFB 5% + UCHT1 10%, cada tercer día.

La caracterización funcional de los cultivos se llevó a cabo midiendo producción de PTH en el medio de cultivo (por método de quimioluminiscencia -Kit DPC- Clinitest SA), a las 24 horas de establecido el cultivo. Y luego, una vez a la semana. Esta detección se realizó en el Laboratorio de Endocrinología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

RESULTADOS

Esta línea de investigación se inició en marzo de 2002, incluyendo hasta la fecha 5 pacientes femeninas con diagnóstico clínico de hiperparatiroidismo primario. Tienen un promedio de edad de 57 años. El diagnóstico fue sospechado por historia de litiasis renal a repetición (1), osteoporosis e hipercalcemia (2), hallazgos de hipercalcemia en exámenes de control (2). Todas las pacientes tenían valores sobre los 120 pg/ml de PTH plasmática (120-140 pg/ml). Fueron sometidas a adeno-mectomía con diagnóstico intraoperatorio de adenoma paratiroideo, confirmado por la biopsia rápida y definitiva en el 100% de los casos.

Características morfológicas

El establecimiento de los cultivos primarios fue efectivo para las 5 muestras. Fueron evaluados diariamente bajo microscopia de contraste de fases, observándose la morfología típica de las células de paratiroides. También se observan mitosis abundantes que dan cuenta del fenómeno de inmortalización. No se observa crecimiento de algún otro tipo celular (fibroblastos, etc.).

Detección de PTH en el medio de cultivo

La detección de PTH en el medio de cultivo dio como promedio de producción un valor de 521,6 pg/ml en 24 horas. La detección semanal de PTH en los medios de cultivo fue positiva para todas las placas de cultivo, sobrepasando los niveles de detección del kit (> 2.500 pg/ml). Aún no contamos con placas que tengan la confluencia suficiente para realizar pruebas de respuesta secretora de PTH frente a distintas concentraciones de calcio extracelular (Tabla 1).

Duración de los cultivos primarios

El primero cultivo establecido no logró sobrevivir a la contaminación intercurrente del medio de cultivo. El resto de los cultivos está aún en fase de expansión con tiempo de duración de 120, 30, 10 y 5 días. El cultivo que lleva 120 días pasó por un período de crisis o fase lag, en que disminuye drásticamente la celularidad de las placas. El resto de las placas están aún en proliferación.

DISCUSIÓN

Perspectivas. A pesar del poco tiempo de trabajo en esta línea de investigación, los datos preliminares son alentadores al considerar el tiempo de duración de los cultivos primarios. Como ya mencionamos, se ha logrado establecer cultivos de paratiroides humana de hasta 60 días de funcionamiento endocrino normal. Nosotros llevamos el doble, y aún las placas están en expansión.

Por otro lado, debemos considerar el método de inmortalización de células epiteliales (Caviedes et al) que no requiere de un método de selección celular, como el centrifugado en gradiente de Percoll, ya que el medio condicionado UCHT1 permite sólo el crecimiento de células epiteliales, dejando al resto de células (estroma) continuar su ciclo de senescencia normal en un cultivo primario.

Si bien tenemos resultados preliminares satisfactorios en esta serie, debemos tener presente que estamos trabajando con un tejido patológico y

Tabla 1

Cultivos	PTH (pcg/ml en 24 h)
I	560
II	707
IIIa	732
IIIb	514
IV	224
V	393
Promedio	521,6

Nota: El cultivo III tuvo 2 mediciones.

que lo debemos someter a estudios complementarios. En lo inmediato, estamos desarrollando otros experimentos como son: evaluación de producción de PTH en el medio en condiciones de distintas concentraciones de calcio extracelular (para estimular la respuesta de estas células al calcio). Para esto, también se evaluará la reacción de luciferín luciferasa, que da cuenta del gasto de ATP en el momento de la secreción de gránulos a nivel celular. La antigenicidad se evaluará detectando la expresión de moléculas del complejo MHC I y II (HLA DQ, DR, DP y ABC), a medida que el cultivo manifieste más características de immortalización. Además, debemos realizar estudio en animales para estudiar la bioseguridad y funcionalidad endocrina. Estos estudios se refieren básicamente a probar tumorigenicidad del tejido a trasplantar, mediante el trasplante de nuestras células a ratones lisogénicos (con inmunidad celular alterada), y se observa si producen tumores o no. Y, además, se evalúa la producción plasmática de PTH en el medio.

Esperamos que estos experimentos sigan apoyando que en nuestros cultivos tenemos células con función endocrina paratiroidea, es decir, que secreten PTH y respondan a los niveles de calcio extracelular. Sin embargo, debemos insistir en considerar que hemos realizado cultivos de adenomas paratiroides que tal vez tengan alterada la sensi-

bilidad de respuesta al calcio extracelular. Es por esto, que debemos continuar realizando cultivos de paratiroides humanas de pacientes con hiperparatiroidismo primario, y ojalá donantes cadáver (Paratiroides normales), para obtener una línea continua de paratiroides humana con función endocrina normal y así hacer más probable, efectivo y seguro al alotrasplante celular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roe M: What's new in endocrine surgery. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 202-5.
2. Schwartz: Principios de cirugía. 7ª ed.
3. Hasse C, Schrezenmeir J, Stinner B *et al*: Successful allotransplantation of microencapsulated parathyroids in rats. *World J Surg* 1994; 18: 630-4.
4. Tolloczko T *et al*: Allotransplantation of cultured human parathyroid cells: Present status and perspectives. *Transp Proc* 1997; 29: 998-1000.
5. Alfrey E *et al*: Normocalcemia thirteen years after successful parathyroid allografting in a recipient of a renal transplant. *Surgery* 1992; 111: 234-6.
6. Sollinger H *et al*: Allotransplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression. *Transplantation* 1983; 36: 599-602.
7. Tolloczko T *et al*: Clinical results of human cultured parathyroid cell allotransplantation in the treatment of surgical hypoparathyroidism. *Transp Proc* 1996; 28: 3545-6.
8. Wozniwicz B *et al*: Cell culture preparation of human parathyroid cells for allotransplantation without immunosuppression. *Transp Proc* 1996; 28: 3542-4.
9. Liu W *et al*: Differentiation of human parathyroid cells in culture. *J Endocrin* 2001; 168: 417-25.
10. Roussanne *et al*: Persistence of Ca²⁺-sensing receptor expression in functionally active, long-term human parathyroid cell cultures. *J Bone Mineral Res* 1998; 13: 354-62.
11. Rudberg *et al*: Alterations in density, morphology and parathyroid hormone release of dispersed parathyroid cells from patients with hyperparathyroidism. *APMIS* 1986; Section A94: 253-61.