

# Establecimiento de la primera línea celular de paratiroides humana

Patricio Cabané T.<sup>(1,4)</sup>, Ricardo Rossi F.<sup>(1)</sup>, Carmen Romero O.<sup>(3)</sup>, Sofía Oviedo C.<sup>(2)</sup>,  
Raúl Caviedes C.<sup>(4)</sup>, Pablo Caviedes F.<sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup>Departamento de Cirugía HCUCH

<sup>(2)</sup>Departamento de Endocrinología HCUCH

<sup>(3)</sup>Laboratorio de Endocrinología HCUCH

<sup>(4)</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos Facultad de Medicina Universidad de Chile

## RESUMEN

Para el manejo de pacientes con hipoparatiroidismo postquirúrgico se ha intentado el trasplante de células de paratiroides humanas. Los problemas para este eventual tratamiento han sido mantener cultivos duraderos a largo plazo y mantener cultivos con función endocrina normal. Existe un método de inmortalización celular, descrito por Caviedes y cols. que permite mantener células humanas con la capacidad de proliferar sin perder sus funciones de células diferenciadas. Con este método de inmortalización se logrará establecer una línea celular continua de paratiroides humana con función endocrina normal a largo plazo: esta última definida como la capacidad de respuesta secretoria normal de paratohormona (PTH), frente a distintas concentraciones de calcio extracelular. En este artículo se presenta el procedimiento y sus resultados *in vitro*.

## SUMMARY

For the handling of patients with postsurgical hypoparathyroidism, the transplant of cells of human parathyroid has been tried. The difficulties to establish this type of cultures have been to maintain cultures lasting in the long term and to maintain cultures with normal endocrin function. A method of cellular immortalization, described by Caviedes et al. exists that allows to maintain human parathyroid cells with the capacity to proliferate without losing their differentiated functions. With this method of immortalization it will be managed in the long term to establish a continuous parathyroid cellular line with normal endocrinal function, defined as the capacity of normal secretion of paratohormona (PTH), as opposed to different extracellular calcium concentrations. We present de procedure and its *in vitro* results.

Recibido 00/00/0000 | Aceptado 00/00/0000

## INTRODUCCIÓN

En cirugía de tiroides ocurre un 0,2 a 4 % de hipoparatiroidismo permanente, con difícil manejo médico; en nuestro hospital, es de 1,5%.

Se han desarrollado técnicas de medición intraoperatoria de paratohormona (PTH) para evitar esta

condición. Esto en algunos casos ha permitido definir la necesidad de realizar un autotrasplante en el mismo acto operatorio.<sup>(1)</sup>

El tratamiento de esta secuela postoperatoria puede ser: médico con administración de calcio y vitamina D a permanencia; quirúrgico que puede ser

intraoperatorio al realizar autotrasplante de glándulas reseca­das o dañadas (con 99% efectividad); postoperatorio, intentando un autotrasplante de tejido criopreservado del mismo paciente (dis­minuye efectividad a 50%), o bien intentando un alo­trasplante utilizando tejido paratiroideo de pacien­tes intervenidos por hiperparatiroidismo.<sup>(2,3)</sup>

El alotrasplante se ha intentado sin utilizar inmu­nosupresión para evitar efectos adversos graves. Se ha logrado mantener una función paratiroidea nor­mal sólo por 18 meses, hasta que los injertos son rechazados.<sup>(4,5)</sup>

*In vitro*, tampoco se logra sobrevivida a largo plazo, ya que los cultivos de tejido paratiroideo no logran mantener su función endocrina por más de 20 se­manas.<sup>(6,7)</sup>

En nuestro laboratorio se ha establecido un méto­do de inmortalización de células humanas, logran­do obtener líneas celulares continuas con función normal a largo plazo de neuronas, músculo esque­lético, células de granulosa humanas y varias líneas de tejido de rata. Todas éstas sin evidencias de tu­morigenicidad *in vitro*.<sup>(8)</sup>

Por lo tanto, nuestro objetivo fue crear una línea continua de tejido paratiroideo con función endo­crina normal a largo plazo, para ser utilizada en el futuro como terapia celular en pacientes con hipo­paratiroidismo postquirúrgico.

## MATERIAL Y METODOLOGÍA

Durante el período de estudio, se obtuvieron 19 muestras de tejido de 15 pacientes paratiroidecto­mizados por hiperparatiroidismo primario o se­cundario. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se utilizó un consentimiento informado debidamente aprobado por este comité.

Se excluyeron pacientes con antecedentes de in­fección por virus hepatitis C o B, CMV, VIH y

pacientes con sospecha de cáncer paratiroideo. Se confirmó la naturaleza benigna de las muestras por biopsia.

Las muestras fueron trasportadas al laboratorio en medio DMEM/F12 a 4°C. En el laboratorio, en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar, se procedió a disgregar mecánicamente el tejido, separando el estroma del parenquima. El parénquima identificado es cortado en piezas de 1 x 1 mm y disgregado enzimáticamente con colagenasa II al 0,2%, incubando 30 minutos a 37°C. Posteriormente se disgrega por pipeteo en pipetas de vidrio, se centrifuga para lavar el me­dio de digestión y se siembra en placas de plástico para cultivo primario con medio DMEM/F12 su­plementado con suero bovino adulto 10%, suero fetal bovino 5% y gentamicina (4 µgr/ml). Para el proceso de inmortalización se utilizó el método descrito anteriormente<sup>(9)</sup>. En resumen, se agrega al medio de cultivo primario un medio condicionado por la línea tumoral de tiroides de rata (UCHT1) al 10%. Con esto se logra la transformación en un plazo de 1 a 8 meses.

El medio de cultivo se cambió cada 3 días o según necesidad, por viraje del marcador de pH (rojo fe­nol). Para los subcultivos se utilizó método enzi­mático con tripsina 0,2%. Se controló los cultivos por microscopía invertida de contraste de fases.

## CURVA DE CRECIMIENTO

Al obtener el crecimiento continuo de la línea se sembró en placas de 6 cms. de diámetro 70.000 céls/placa en duplicado. Se contó el número de cé­lulas en cámara de Neubauer cada 24 hrs.

## FUNCIÓN ENDOCRINA Y CURVA DOSIS RESPUESTA

La producción de paratohormona en el medio de cultivo se midió por radioinmunoensayo con el *kit intact PTH Immunoblot* (DPC). Se sembró en placas de 6 cms de diámetro 70.000 céls/placa en dupli­cado. Una vez logrado el 80% de confluencia se

cambió el medio de cultivo por un medio Joklik (sin calcio) suplementado con  $\text{CaCl}_2$  en concentraciones de 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 3 mM Calcio. Se incubó las placas en duplicado por cada condición por 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Luego, se obtuvo muestras del medio y se congeló a  $20^\circ\text{C}$  para su posterior análisis. Las células fueron lisadas con *buffer* RIPA para medición de proteínas por el método de Bradford, para la normalización de los resultados.

### CRECIMIENTO EN AGAR BLANDO

Se utilizó esta prueba para evaluar el crecimiento celular sin anclaje, para evidenciar características tumorigénicas *in vitro*. Se agregó agar al 0,5% suplementado con DMEM/F12 + suero fetal bovino al 10% en placas de 3,5 cm de diámetro y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  hasta gelificar. Se preparó una suspensión celular con  $5 \times 10^3$  céls/ml en agar 0,3%. Se sembró las células sobre el agar 0,5% ya gelificado y se incubó por 21 días. Cada 7 días se agregó 200  $\mu\text{l}$  de medio DMEM/F12 + SFB 10% para evitar la deshidratación del agar. A los 21 días se contó el número de colonias (16-50 células) formadas en 10 campos al azar, confirmando la vitalidad con *tripan blue*. Se utilizó como control positivo la línea tumoral Hep2 (carcinoma epidermoide laríngeo). El experimento fue duplicado en serie.

### INMUNOFLORESCENCIA

Se sembró sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 6 cm de diámetro a baja confluencia. Una vez adheridas las células, se lavó las placas con PBS. Se fijó con metanol frío ( $-20^\circ\text{C}$ ) por 30 minutos. Se lava con PBS (3 veces, 5 min cada vez), luego se bloquea con suero normal de caballo 10% por 20 min. Se lava 3 veces con PBS, y se incuba con anticuerpo primario a  $4^\circ\text{C}$  toda la noche. Se utilizó anticuerpo anti PTH humana (N-18) de cabra 1:100 (Santacruz Inc) y anti CaSR (receptor de calcio sensible) humano de ratón 1:100 (Chemicon). Luego se lava 3 veces con PBS y se incuba con anticuerpo secundario anticabra biotinilado ( $20 \mu\text{g/ml}$  - Vectorlabs) y antiratón conjugado

con FITC ( $20 \mu\text{g/ml}$  - Vectorlabs), por 1,5 hrs. Se lava con PBS, se montan los cubreobjetos en portaobjetos de vidrio con medio de montaje para fluorescencia (Dako). Se observa fluorescencia en microscopio Karl Zeiss, digitalizando imágenes con cámara *Cool Snap sf*. Como control positivo se utilizó tejido paratiroideo criopreservado y cultivado de los mismos pacientes.

### ESTADÍSTICA

Se presentan los resultados como promedio  $\pm$  SD (desviación estándar) de las distintas situaciones experimentales. Para determinar diferencias se utilizó un test no paramétrico para múltiples comparaciones (análisis de varianza, ANOVA) y luego t de *Student* para comparaciones entre dos grupos. Se utilizó un valor de  $p < 0,05$  como significativo.

### RESULTADOS

De las 19 muestras obtenidas, se logró establecer todos los cultivos primarios. En el 98% se logró continuar con líneas primarias (más de 1 subcultivo). Un cultivo se perdió por contaminación. Inicialmente se observó el crecimiento exponencial con características de tejido epitelial, pero sobrevino el crecimiento descontrolado de fibroblastos y finalmente senescencia de los cultivos. (Fig. 1) Se

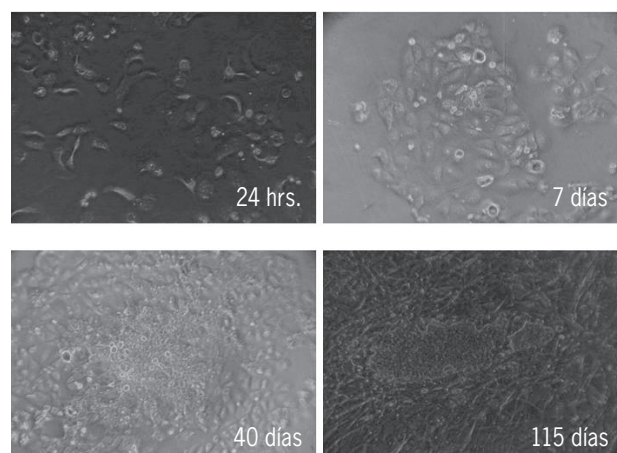


Fig.1 Morfología característica de células epiteliales. Se observó sobrecrecimiento de fibroblastos sobre los 100 días de cultivo. Contraste de fases. 10X

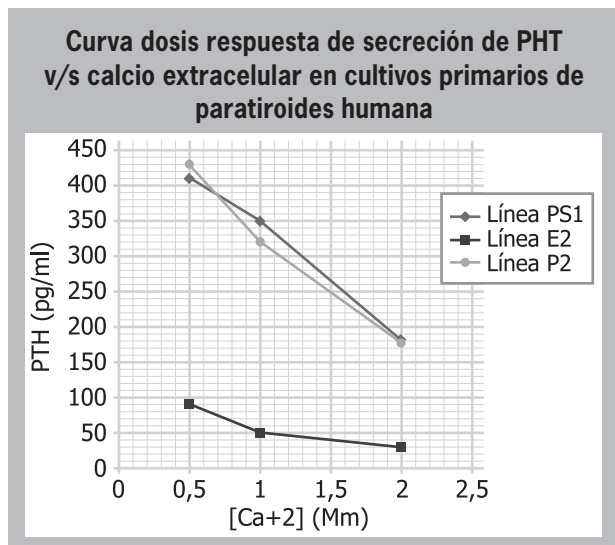


Fig. 2. Comportamiento funcional de los cultivos primarios de Paratiroides Humana. Medición de PTH con kit radioinmunoensayo (immunoblot-DPC). Líneas con 3 subcultivos y hasta 150 días de cultivo.

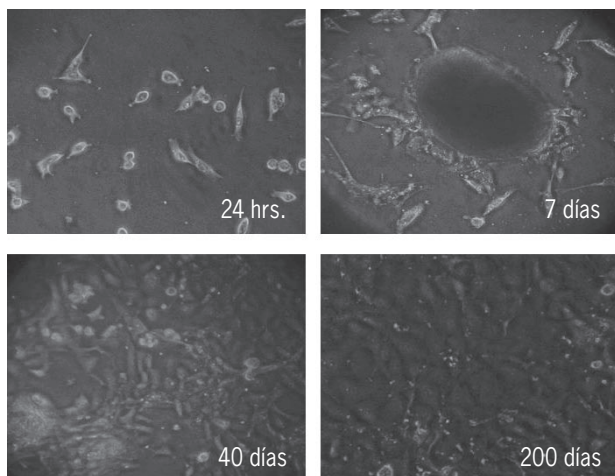


Fig. 3. La línea rcPTH presenta morfología epitelial característica, sin sobrecrecimiento de fibroblastos en más 100 subcultivos. Se observa inhibición por contacto, no forma acúmulos ni crosslinkig. Densidad de placa de  $120 \times 10^5$  céls/cm<sup>2</sup>. Contraste de fases. 10X.

logró evaluar la función endocrina en tres líneas primarias, obteniendo una curva dosis respuesta que se asemeja a la respuesta normal del tejido paratiroideo in vivo (se observan distintas magnitudes de secreción, experimento no normalizado por número de células). (Fig. 2) Hasta el momento, se ha logrado establecer una línea continua sin creci-

miento de fibroblastos y sin senescencia por más de 100 subcultivos (línea inmortal rcPTH). La transformación se observó al mes de cultivo. (Fig. 3) Esta muestra se obtuvo de un paciente varón de 38 años que consultó por osteoporosis severa que fue intervenido quirúrgicamente por hiperparatiroidismo primario. La biopsia definitiva confirmó un adenoma paratiroideo.

La curva de crecimiento de esta línea da cuenta de un crecimiento exponencial con un tiempo de duplicación de 30 hrs. (confirmado por 2 métodos) (Fig. 4)

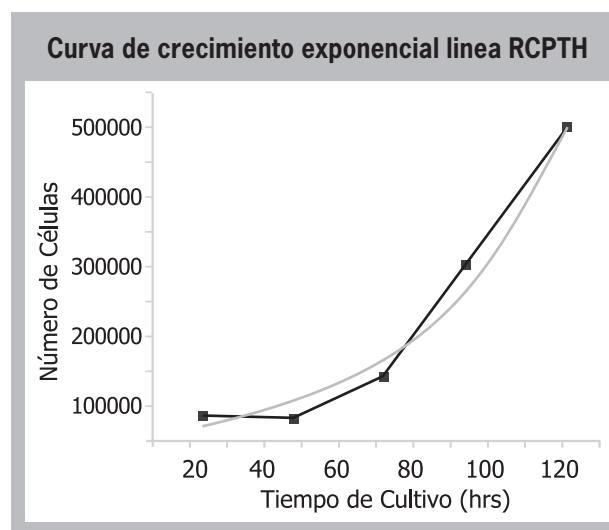


Fig. 4. Se determinó crecimiento exponencial por conteo en cámara de neubauer, en triplicado. Tiempo de duplicación de 30 hrs.

La respuesta secretoria de PTH frente a distintas concentraciones de calcio extracelular (curva dosis/respuesta) fue evaluada a 1 año de obtenida la línea celular y es inversamente proporcional a la concentración de calcio extracelular, similar a lo observado en los cultivos primarios. (Fig. 5)

La inmunofluorescencia indirecta para paratohormona es positiva, observándose un patrón granular característico, similar al del control positivo. (Fig. 6a) La inmunofluorescencia indirecta para el receptor de calcio (CaSR) también resultó positiva, como se observa en la figura 6b.



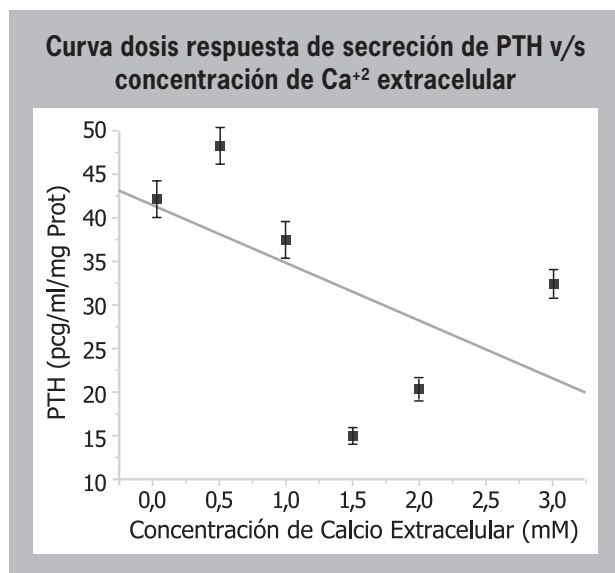


Fig. 5. Se midió la secreción de PTH en el medio de cultivo por Radioinmunoensayo (PTH Intact - Inmunoblot - DPC). En duplicado. Los valores fueron normalizados por el contenido total de proteínas de cada placa.

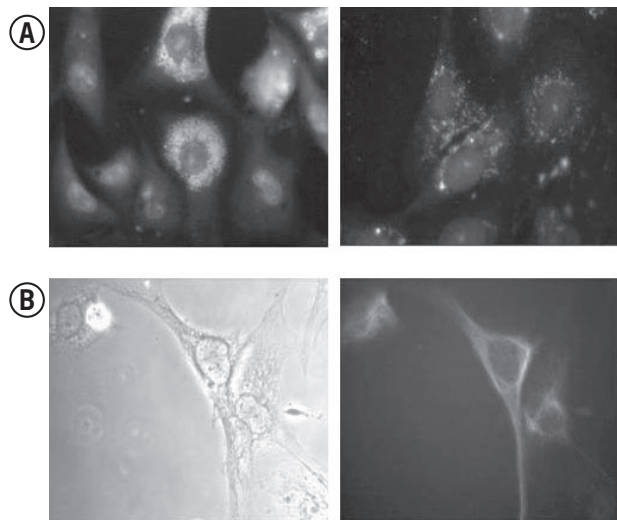


Fig. 6. Inmunohistoquímica Línea rcPTH. a) Se utilizó Anti PTH 1:100 Sta Cruz. A la izq. se observa patrón citoplasmático granular característico en la línea rcPTH. A la derecha se evidencia marcación en línea primaria de Adenoma Paratiroideo como control positivo. Se marcó el núcleo con yoduro de propidio. b) Se utilizó Anti CaSR 1:100 Chemicon. Se observa a la izquierda la imagen en campo claro y a la derecha la marcación con patrón de membrana. Microscopio Fluorescencia Kart Zeiss. 40X

En la prueba de tumorigenicidad *in vitro* de crecimiento en agar blando no hubo formación de colonias en la línea rcPTH. Se obtuvo 16,3 céls/campo con un 95% de vitalidad. En el control positivo (Hep2) se observó la formación de 2,9 colonias/campo con 99% de vitalidad. (Fig. 7)

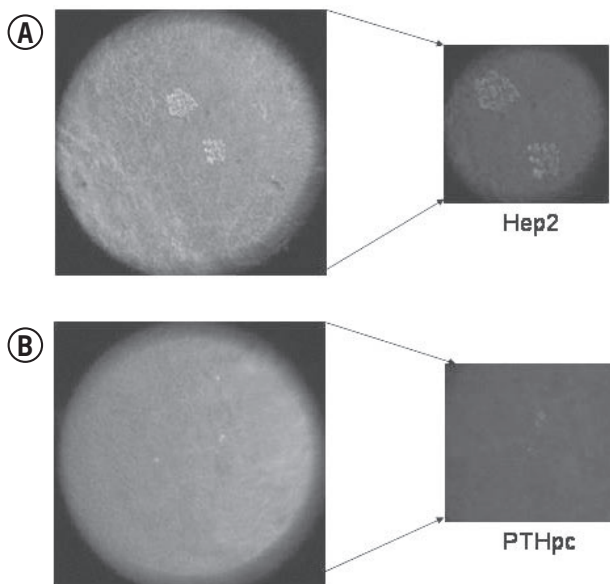


Fig. 7. Prueba de tumorigenicidad *in vitro*. Se sembraron  $5 \times 10^5$  céls/placas de 5 cm. En agar blando 0.5/0.3%. (A) El control positivo (Hep2 - carcinoma epidermoide laríngeo) presentó 2,9 colonias por campo a los 14 días de cultivo, con 99% de vitalidad. (B) La línea PTHpc no presentó formación de colonias (16,3 céls/campo y 95% vitalidad). Experimento en triplicado y reproducido.

## DISCUSIÓN

En la actualidad se discute ampliamente sobre la clonación y obtención *in vitro* de tejido humano para trasplante. Con este método de inmortalización se ha logrado obtener diversas líneas celulares inmortalizadas que mantienen sus características de diferenciación en el tiempo. A pesar de ser líneas continuas, no manifiestan características tumorigénicas *in vitro* (tienen inhibición por contacto y no proliferan en agar blando). De esta forma, se convierte en una atractiva alternativa de obtención de tejido diferenciado para trasplante celular.

La línea celular rcPTH, línea continua de paratiroides humana, es una muestra más del efecto del método de inmortalización descrito. Las células rcPTH mantienen la expresión del receptor de calcio sensible (CaSR) y mantienen la capacidad de respuesta normal a las concentraciones de calcio extracelular. Éste no se había sido logrado, a pesar de los intentos de varios autores que mediante la optimización de los cultivos primarios, buscaban mantener la función endocrina por un tiempo prolongado y así estudiar la fisiología *in vitro* de células de paratiroides humana. Otro hallazgo importante es que las células rcPTH no proliferan en agar blando, siendo ésta la prueba *in vitro* más fidedigna de tumorigenicidad. Las células tumorales logran proliferar estando en suspensión, formando colonias, a diferencia de las células normales que requieren estar adheridas a alguna superficie para proliferar. La prueba de certeza para evaluar tumorigenicidad es el implante de una línea celular en ratones atómicos (*nude mice*), test pendiente, ya que no está disponible en Chile.

La obtención de esta línea continua de paratiroides humana permitirá realizar estudios *in vitro* sobre la proliferación y mecanismos de regulación del tejido paratiroideo en diversas patologías, como por ejemplo, en la insuficiencia renal. Además, una vez comprobada la no tumorigenicidad de la línea celular, se podrá realizar pruebas *in vivo* de trasplante celular para pacientes con hipoparatiroidismo. Y finalmente, el contar con una célula humana secretora de PTH, permitirá la purificación de la hormona y su posible aplicación clínica.

#### AGRADECIMIENTOS

A Clinitest Ltda. por la donación de los *kit* de PTH humana. Al Sr. Fernando Guzmán por su importante y constante apoyo técnico en el laboratorio. A la Oficina de Apoyo a la Investigación Clínica (OAIC) del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, por su apoyo en la difusión y publicación de este artículo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Agarwal G, Barakate M, Robinson B, Wilkinson M, Brraclough B, Reeve T, Delbridge L. Intraoperative quick parathyroid hormone versus same-day parathyroid hormone testing for minimally invasive parathyroidectomy: A cost-effectiveness study. *Surgery* 2001; 130: 963-967
2. Kald BA, Mollerup CL. Risk factors for severe postoperative hypocalcemia after operations for primary hyperparathyroidism. *Eur J Surg* 2002; 168(10): 552-556.
3. Olson J, De Benedetti M, Baumann D, Wells S. Parathyroid Autotransplantation during thyroidectomy. *Ann Surg* 1996; 223: 472-480.
4. Tolloczko T, Wozniewicz B, Sawicki A, Nawrot I, Migaj M, Zabitowska T, Górski A. Cultured parathyroid cell transplantation without immunosuppression in the treatment of surgical hypoparathyroidism. *Transplantation Proceedings* 1994; 26(4): 1901-1902.
5. Tolloczko T, Wozniewicz B, Sawicki A, Górski A. Allotransplantation of Cultured Human Parathyroid Cells: Present Status and Perspectives. *Transp Proc* 1997; 29: 998-1000.
6. Brandi ML, Fitzpatrick LA, Coon H, Aurbach G. Bovine parathyroid cells: cultured maintained for more than 140 population doublings. *PNAS* 1986; 83: 1709-1713.
7. Picariello L, Benvenuti S, Recenti R, Formigli L, Falchetti A, Morelli A, Masi L, Tonelli F, Cicchi P, Brandi ML. Microencapsulation of human parathyroid cells: An "in vitro" study. *J Surg Res* 2001; 96: 81-89.
8. Caviedes P, Caviedes R, Freeman T, Sanberg P, Cameron D. Proliferated cell lines and uses thereof. World International Property Organization. Patent number: WO 03/065999 A2. Publication date 14 August 2003. [www.wipo.org](http://www.wipo.org)
9. Cabané P, Oviedo S, Romero C, Rossi R, Caviedes R, Caviedes P. Cultivo primario e immortalización de células de paratiroides para trasplante celular en hipoparatiroidismo postquirúrgico. *Rev Chil Cirugía* 2003; 55(6): 617-621.

### CONTACTO

Patricio Cabané Toledo  
Dirección: Alejandro Serani Norte 9426 depto. 603, Vitacura  
Fono: 356 3374 / 9 33 51805  
Fax: 681 6820  
Email: [pcabane@med.uchile.cl](mailto:pcabane@med.uchile.cl)

