



Programa de Doctorado en Ciencias Médicas
y Especialidad Clínica (Cirugía)
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Tesis Doctoral

Optimización de las Condiciones de Cultivo de
Células de Paratiroides para Terapia Celular en
Hipoparatiroidismo

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

Patricio Eduardo Cabané Toledo

Pablo Caviedes F. MD PhD

Director Tesis Básico

Dr. Ricardo Rossi F. FACS

Director Tesis Clínico

... A mis “viejos”, que durante toda la vida me han enseñado el valor de trabajar en equipo a través de su ejemplo... y me han transmitido su valentía, amor, paciencia y entrega...

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
<u>1.1 Hipoparatiroidismo postquirúrgico: Complicación de cirugía de Tiroides y Paratiroides</u>	1
1.1.1 Hipocalcemia permanente:	2
1.1.2 Hipocalcemia transitoria:	2
1.1.3 Prevención de la hipocalcemia:	2
<u>1.2 Manejo médico, no autorregulado y no exento de complicaciones</u>	3
<u>1.3 Enfrentamiento quirúrgico: Autotrasplante y Alotrasplante</u>	5
1.3.1 Aplicación del Autotrasplante	5
1.3.2 Alotrasplante sin inmunosupresión: Sistema autorregulado y definitivo.	6
1.3.3 Alotrasplante microencapsulado:	7
1.3.4 Problemas: masa celular crítica, duración de los cultivos y rechazo.	8
1.3.5 Trasplante de Islotes de Langerhans: Optimización de cultivos en otro modelo endocrino.	11
2. HIPÓTESIS:	13
3. OBJETIVOS:	13
<u>3.1 Objetivos generales:</u>	13
<u>3.2 Objetivos específicos:</u>	13

4. MATERIAL Y MÉTODOS:	15
<u>4.1 Cultivos Primarios:</u>	15
4.1.1 Medios y soluciones utilizados en cultivos:	15
4.1.2 Tripsinización:	16
<u>4.2 Inmortalización de Líneas Celulares:</u>	17
<u>4.3 Criopreservación:</u>	17
<u>4.4 Morfocinética, Crecimiento Celular y Proliferación:</u>	17
4.4.1 Curvas de Crecimiento:	17
4.4.2 Tiempo de duplicación (doubling time):	18
4.4.2 Densidad de placa:	18
4.4.3 Incorporación de Bromodeoxiuridina:	19
<u>4.5 Identificación por Inmunocitoquímica:</u>	20
<u>4.6 Tinción De La Reacción Del Ácido Per-Iódico De Schiff (Pas)</u>	20
<u>4.7 Cocultivos:</u>	21
<u>4.8 Caracterización de Función Endocrina:</u>	22
4.8.1 Curva Dosis Respuesta:	22
4.8.2 Protocolo Bradford:	22
<u>4.9 Crecimiento en Agar Blando: Prueba de Tumorigenicidad In Vitro</u>	23
<u>4.10 Vitalidad por Técnica de Azul Tripán:</u>	24
<u>4.11 Separación Celular (Gradiente de Percoll ®)</u>	25
<u>4.12 Microencapsulación:</u>	27
4.12.1 Según método de Alginato polilisina Alginato (utilizado en Florencia)	27
4.12.2 Según el método alemán de Zimmermann	30
4.12.2.1 ME BaCl ₂	30
4.12.2.2 ME CaCl ₂	31
<u>4.13 Evaluación y Comparación de Microesferas Alginato Calcio V/S Alginato Bario:</u>	32
4.13.1 Estudio de permeabilidad en distintas microesferas:	32
4.13.1.1 Permeabilidad a Albúmina:	32
4.13.1.2 Permeabilidad a Fosfatasa Alcalina	33

4.13.2 Pruebas De Disolución De Alginato (Evaluación de Resistencia y Estabilidad)	35
4.13.3 Recuperación de RNA desde las Microesferas	37
4.13.4 PCR β -actina	39
<u>4.14 Determinación de PTH intacta plasmática en pacientes trasplantados</u>	39
<u>4.15 Análisis Estadístico:</u>	39
5. RESULTADOS:	40
<u>5.1 Cultivos Primarios de Paratiroides:</u>	40
5.1.1 Seguimiento morfológico (microscopía de contraste de fase)	40
5.1.2 Seguimiento funcional	41
5.1.3 Detección Inmunohistoquímica de PTH humana en células en cultivo primario.	42
5.1.4 Curva respuesta a calcio extracelular (en tres líneas primarias)	43
<u>5.2 Establecimiento de línea celular (RCPTH):</u>	44
5.2.1 Seguimiento morfológico (microscopía de contraste de fase)	44
5.2.2 Curva de crecimiento	46
5.2.3 Tiempo de Duplicación	46
5.2.4 Densidad de saturación	46
5.2.5 Tinción de la Reacción del Ácido Per-Iódico de Schiff (PAS)	47
5.2.6 Inmunohistoquímica (PTH, CaSR)	48
5.2.7 Curva Dosis Respuesta PTH v/s Calcio extracelular (PTH por RIA)	49
5.2.8 Curva Estándar de BSA. Cuantificado según método de Bradford	50
5.2.9 Crecimiento en Agar Blando	50
<u>5.3 Cocultivo y exposición al medio condicionado de Línea celular RCGH:</u>	51
5.3.1 Curvas de Crecimiento	51
5.3.2 Tiempo de Duplicación	52
5.3.3 Incorporación de BrDU	53
5.3.4 Curva Dosis Respuesta PTH v/s Calcio (ELISA PTH vencido)	54
<u>5.4 Separación en gradientes de Percoll ®</u>	55
5.4.1 Gradiente discontinua - cultivo primario paratiroides	55

5.4.2	<i>Gradiente discontinua - línea celular RCPTH</i>	56
5.4.3	<i>Inmunohistoquímica (PTH) en distintas fases.</i>	59
5.5	<u>Microencapsulación:</u>	61
5.5.1	<i>Métodos de Microencapsulación probados:</i>	61
	<i>Método Firenze</i>	61
	<i>Método Zimmermann</i>	61
	<i>Método Zimmermann modificado</i>	61
5.5.2	<i>Tamaño</i>	62
5.5.3	<i>Comparación de Estabilidad y Resistencia</i>	62
5.5.4	<i>Disolución de ME y recuperación de BSA a 15 y 60 minutos</i>	66
5.5.5	<i>Permeabilidad de las Microesferas</i>	67
	5.5.5.1 <i>Permeabilidad de Albúmina</i>	67
	5.5.5.2 <i>Permeabilidad de Fosfatasa Alcalina (FA) soluble (9 kDa)</i>	69
5.5.6	<i>Recuperación de DNA de células microencapsuladas</i>	72
	5.5.6.1 <i>Por congelación en Nitrogeno liquido, homogenización y método Tiocianato</i>	72
5.6	<u>Microencapsulación de Tejido Humano</u>	74
5.7	<u>Banco de tejido y casos clínicos de auto y alotrasplante:</u>	75
5.7.1	<i>Criopreservación del Tejido</i>	75
5.7.2	<i>Casos de Autotrasplante:</i>	75
	<i>Caso 1:</i>	75
	<i>Caso 2:</i>	77
5.7.3	<i>Caso de Alotrasplante:</i>	79
	<i>Caso 3:</i>	79
6.	DISCUSIÓN	83
6.1	<i>Optimización y cocultivo</i>	84
6.2	<i>Aplicación Clínica, criopreservación y microencapsulación</i>	84
6.3	<i>Estabilidad y resistencia: disolución y recuperación de RNA.</i>	87
6.4	<i>Permeabilidad</i>	89
6.5	<i>Vitalidad</i>	90

<i>6.6 Biocompatibilidad</i>	90
<i>6.7 Inmunocompetencia:</i>	91
<i>6.8 Banco de tejidos y aplicación clínica</i>	93
<i>6.9 HACIA EL FUTURO</i>	94
<i>6.10 En resumen...</i>	
7. REFERENCIAS	96
8. ANEXOS	
Anexo 1: Consentimiento Informado aprobado por l comité de ética de la Facultad de Medicina Universidad de Chile	
Anexo 2: Publicaciones y Patentes	

RESUMEN

Introducción: El Hipoparatiroidismo permanente ocurre después de tiroidectomía (0,2-4% de los casos) o de cirugía paratiroídea. Los pacientes deben recibir suplementación de vitamina D y calcio de por vida. A nivel mundial, como alternativa terapéutica en estos pacientes, hay poca experiencia de alotrasplantes paratiroídeos. 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. Con este último procedimiento, sólo se ha logrado mantener cultivos y función endocrina de ellos hasta 60 días.

Nuestro objetivo fue modificar y optimizar los cultivos primarios de paratiroides humana para: a) obtener una línea continua de células paratiroídeas, b) caracterizar la línea en cuanto a función endocrina y optimizarla mediante cocultivo con células de granulosa humana y c) establecer las técnicas para llegar a la aplicación clínica de la misma (microencapsulación y criopreservación). La

Hipótesis planteó que: La optimización de los cultivos de paratiroides humana y el cocultivo de éstas con células de granulosa humana (RCGH) como nodriza, aportará el microambiente glandular para mantener una función endocrina adecuada a largo plazo.

A su vez, la microencapsulación mantendrá este microambiente y permitirá aún mayor duración y mejor función endocrina a largo plazo.

Material y Métodos: Se obtuvieron las muestras de paratiroides, fueron obtenidas de pacientes sometidos a paratiroidectomía subtotal por hiperparatiroidismo secundario, que y luego fueron procesadas con digestión enzimática y disgregación mecánica, cultivándose en medio de cultivo (DMEM /HF12) suplementado con suero bovino, suero fetal bovino y medio condicionado UCHT1, que induce proliferación e inmortalización (Método *Caviedes y cols*). Además, se criopreservaron trozos de paratiroides de cada paciente en el banco de tejidos creado para este efecto.

En las líneas celulares obtenidas con este procedimiento, se realizaron cultivos celulares en monocapa, inmunohistoquímica anti parathormona humana (PTH) y del receptor de calcio sensible (CaSR), tinción de la reacción del ácido per-iódico de Schiff (PAS), y

establecimiento de curva dosis respuesta de (calcio v/s. PTH). También, se evaluó la tumorigenicidad in vitro (crecimiento en agar blando).

Por otra parte, se montó y evaluó las características de la técnica de microencapsulación celular y de tejidos, y se creó un banco de criopreservación de paratiroides en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

En relación a nuestros Resultadosresultados, se logró establecer exitosamente : Todos los cultivos primarios fueron efectivos, con morfología típica a la microscopía. Estos, lograron un período de expansión de hasta 115 días. La función endocrina de las células obtenidas fue estudiada midiendo PTH en el medio de cultivo, determinándose. Se obtuvo una producción promedio de 521,6 pgr/ml en 24 hrs (224-730 pgr/ml). Sin embargo, sobrevino sobrecrecimiento fibroblástico y senescencia de las líneas primarias obtenidas (7 de 15 no expuestas a UCHT1).

Una de ocho8 líneas cultivos celulares sometidoas al protocolo de inmortalización logró un crecimiento exponencial, sin senescencia ni sobrecrecimiento fibroblástico al ser expuesta al medio UCHT1. Esta pPresentó respuesta secretoria de paratohormona (PTH) dosis dependiente en relación inversa a la concentración de calcio extracelular. La línea n (al ↑ calcio, ↓ PTH). No manifestó características morfocinéticas de línea tumoral niy no proliferó en cultivos en suspensión (Agar Blando). La línea fue denominada *RCPTH*, y presentateniendo un tiempo de duplicación de 30 hrs y densidad de placa de 123.499 céls/cm². Esta línea mantiene producción y secreción de PTH en el medio a más de 100 subcultivos. Por otra parte, al ser cocultivada con células de granulosa humana, presenta aumento del tiempo de duplicación y disminución del porcentaje de proliferación (incorporación de BrdU), además de una mayor secreción de PTH al medio. Finalmente, Se llevó a cabo la separación celular en gradientes de Percoll ®, permitió logrando obtener mayor proporción de células PTH (+) en la fracción 1.035-1.055 gr/dl.

A su vez, se montaron exitosamente En cuanto a las técnicas de microencapsulación y criopreservación, fueron exitosamente montadas en nuestro país. En microencapsulación, se Se logró producir obtuvo esferas permeables y más resistentes al utilizar alginato de sodio al 2% gelificado con BaCl₂ 20 mM, las cuales permiten otorgar un ambiente inmunoprivilegiado a células microencapsuladas. A su vez, e.

El Banco de Criopreservación de paratiroides fue establecido exitosamente, teniendo el personal e infraestructura adecuados y cumpliendo rigurosamente las cadenas de frío y esterilidad, bajo estándares sanitarios.

En cConclusiones: S, se logró establecer la única línea continua de paratiroides humana, descrita en el mundo con función secretoria normal a largo plazo. Además, se evidenció que en condiciones de cocultivo con células de granulosa humana existen mayores niveles de PTH secretado en el medio y efectos sobreredución en la proliferación celular de la línea *RCPTH*, que puede traducir un efecto sobre la diferenciación que aumenta la secreción de PTH o la sensibilidad al calcio extracelular.

Por otra parte, se montó la técnica de microencapsulación celular, estableciendo como ideales para el alotrasplante las microesferas de alginato de sodio al 2% con $BaCl_2$ por sus características de permeabilidad, resistencia y vitalidad del tejido a largo plazo.

El manejo de estas técnicas permitió ofrecer una nueva terapia no disponible hasta ahora en Chile, y prepara la aplicación futura de terapia celular con la línea *RCPTH* una vez realizadas las pruebas de tumorigenicidad *in vivo* y aprobada por la FDA. Así como también, se abren las puertas al desarrollo de nuevas líneas de investigación sobre optimización de cultivos, métodos de criopreservación (según tipo de tejido y/o tipo celular) y de microencapsulación (purificación de alginato de algas chilenas).

ABSTRACT

Permanent hypoparathyroidism occurs after thyroidectomy (0,2-4 % of all cases) or after surgery. The patients must receive vitamin D and calcium supplementation for life. In general, there is little experience in parathyroid allograft as a therapeutic alternative in these patients. The main difficulties of this therapy are the rejection for alloimmunization, and the establishment of long- lasting primary cultures to obtain a sufficient mass of cells for transplant. With the latter techniques, cultures that retain endocrine function have been maintained only up to 60 days.

Our goal in this work was to modify and optimize primary cultures of human parathyroid tissue: a) to obtain a continuous cell line of parathyroid cells, b) to characterize this line in terms of its endocrine function and optimizing this function by coculture with a human granulosa cell line, and c) to establish the necessary techniques and skills to develop the clinical applications of the tissue (namely, microencapsulation and criopreservation). Our proposed hypothesis was that the optimization of human parathyroid cultures and their coculture with a human granular cell line (RCGH) for trophic support, would contribute to the reproduce the glandular microenvironment and thus preserve endocrine function in the long term. In turn, microencapsulation would further support this microenvironment and thus allow an even longer and better endocrine function.

Parathyroid tissue samples were obtained from patients bearing secondary hyperparathyroidism, who were submitted to partial parathyroidectomy. Tissue samples were processed by enzymatic digestion and mechanical disgregration, and cultured in liquid media composed of DMEM/HF12, supplemented with adult, fetal bovine serum and UCHT1 conditioned media, which induces proliferation and immortalization of mammalian cells. Also, parathyroid tissue from every patient was criopreserved in our Tissue Bank, which was created for this purpose.

In the cell lines obtained with the procedure described above, monolayer cell cultures were used to study the presence of human parathyroid hormone (PTH) and expression of the calcium sensor (CaSR) by immunohistochemistry, along with per-yodic Schiff (PAS) reaction, and determination of calcium vs. PTH dose response curves. Also, in vitro tumorogenicity was evaluated by studying growth on soft agar. Finally, we setup the

necessary techniques for cellular and tissue microencapsulation, and a parathyroid criopreservation bank was established at the University of Chile Clinical Hospital.

Regarding our results, we managed to successfully establish primary cultures, which exhibited typical morphology under microscopy. These cultures continued to expand for up to 115 days. Endocrine function of the cells was studied by measuring PTH in the culture media, which yielded an average production of 521,6 pgr/ml in 24 hrs (224-730 pgr/ml). Nevertheless, the cultures were overcome with fibroblast outgrowth and senescence (7 of 15 cultures not exposed to UCHT1).

One of eight cell cultures submitted to the UCHT1 immortalization protocol achieved exponential growth, without senescence or fibroblast outgrowth. This cell line exhibited PTH secretion in response to decreasing concentration of extracellular calcium, and exhibited neither morphological nor cell cycle kinetics of a tumor line, nor did it proliferate in suspension culture conditions (Soft agar). The cell line was named RCPTH, and it exhibits a doubling time of 30 hrs and saturation density of 123.499 cells/cm². This line continues to produce and secrete PTH in the media after having undergone over 100 subcultures. On the other hand, when cocultured with human granulosa cells, RCPTH cells increase their doubling time, they decrease the percentage of proliferating cells (as evidenced by BrdU uptake), in addition to an increase in PTH secretion to the media. Finally, cell separation in Percoll® gradients revealed a greater proportion of PTH(+) cells in the 1.035-1.055 gr/dl. fraction.

Further, microencapsulation and criopreservation techniques were successfully established. Regarding the former, we managed to produce permeable and highly resistant spheres by using 2% sodium alginate, gellified with BaCl₂ 20 mm. These spheres provide an immunoprivileged environment to microencapsulate cells. In turn, the Parathyroid Criopreservation Bank was successfully established, which comprises adequate personnel and infrastructure to rigorously fulfill the requirements of a cold chain and sterility.

In conclusion, we managed to establish the only continuous human parathyroid cell line (RCPTH) in existence to date, and which retains normal secretory function. We also demonstrated that, when cocultured with human granulosa cells, RCPTH cells exhibit higher levels of PTH secretion and a reduced cellular proliferation, effects that could be

underlying a differentiation effect expressed either in increased PTH secretion and/or the sensitivity to extracellular calcium.

Finally, we established microencapsulation conditions, and defined the use of 2% sodium alginate precipitated with BaCl_2 as the ideal condition for microsphere-encapsulated allograft therapy, as defined by characteristics such as permeability, resistance and long term tissue vitality. This presents an option for a new therapy not available in Chile to date, and the possible future application of cell therapy using RCPTH cells, once tumorigenicity studies are completed. Further, the latter opens interesting possibilities for the development of new lines of research in the optimization of culture conditions, criopreservation methods (tailored for tissue or cell type) and microencapsulation (i.e., by purification of alginate from Chilean seaweed).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hipoparatiroidismo postquirúrgico: Complicación de cirugía de Tiroides y Paratiroides

1.1.1 Hipocalcemia permanente:

Una de las complicaciones de la cirugía de tiroides y paratiroides es la hipocalcemia postoperatoria, transitoria o permanente. En este tipo de cirugías, ya sea por patologías malignas o benignas, esta complicación se debe principalmente a compromiso de la vascularización de las glándulas paratiroides o a la resección inadvertida de estas.

El cuadro se presenta clínicamente con parestesia de extremidades y parestesia peri oral, para luego llegar a la condición de tetania por hipocalcemia, siendo un cuadro incompatible con la vida si no se aporta calcio exógeno. (*Marx, S 2003*). Las consecuencias o secuelas a largo plazo de esta patología son: calcificación de los ganglios basales y formación de cataratas, pudiendo llegar incluso a una falla renal por hiper calciuria y nefrocalcinosis. (*Mihai, R 2002*)

El Hipoparatiroidismo postquirúrgico transitorio (menor a 6 meses) ocurre en un rango de 6.9% - 46% de la tiroidectomías. El hipoparatiroidismo postquirúrgico permanente (> a 6 meses) ocurre en 0,4% - 33% de las cirugías de tiroides (*Thomusch y cols 2003*). En un análisis multivariado con 5846 pacientes se logró identificar los siguientes factores de riesgo principales en el hipoparatiroidismo postquirúrgico permanente tras cirugía tiroídea:

- 1) extensión de la resección de la glándula tiroides [bilateral subtotal 0.9% - unilateral más lobectomía contralateral 2,3% - tiroidectomía total 9% (OR=11,4)]
- 2) tipo de ligadura de la arteria tiroídea inferior (central o periférica). La ligadura central de la arteria tiroídea inferior (cercana a la carótida) (OR=5)
- 3) número de paratiroides identificadas y preservadas en el acto operatorio. Preservación de una o no identificación de glándulas paratiroides (OR=4)
- 4) la experiencia del cirujano.

Por lo anterior, la recomendación actual en cirugía bilateral de tiroides es la realización de una ligadura periférica de la arteria tiroídea inferior (cercana a la cápsula tiroídea) y preservar al menos dos glándulas paratiroides (mayor número no reportó beneficio) (*Thomusch y cols 2003*).

1.1.2 Hipocalcemia transitoria:

Los factores de riesgo de la hipocalcemia transitoria son menos claros. Se asume un compromiso transitorio de la función y respuesta secretoria de las glándulas paratiroides, pero ante el gran porcentaje de hipocalcemia transitoria en el postoperatorio, cercana al 50% (*Gac y cols, 2007*) se describen varias hipótesis. En primer lugar, la hemodilución intra y postoperatoria, que podría disminuir el valor de la medición de calcemia; el correcto manejo de la muestra desde su toma (muestra periférica, lejos de infusiones endovenosas), su traslado (mantención de cadena de frío) y el método de análisis del Ca^{+2} plasmático (calibración adecuada de la máquina). Por otro lado se le da importancia al aumento transitorio en la secreción de calcitonina, presente en el período postoperatorio. A su vez, corrección de calcemia por albúmina plasmática no es útil, ya que se ha descrito un descenso de ésta (por redistribución) en correlación con la calcemia en estos pacientes. (*Cakmakli S y cols 1996*)(*Demeester-Mirkine N y cols 1992*)

1.1.3 Prevención de la hipocalcemia:

A su vez, se han ensayado otros procedimientos para detectar precozmente esta complicación, como es la medición de Paratohormona (PTH) intraoperatoria. A este respecto, se sabe que pacientes sometidos a tiroidectomía total con valores intraoperatorios menores a 15 pg/ml, tienen mayor riesgo de hipocalcemia postoperatoria. *Agarwal y cols (2001)* indican que esta determinación tiene una sensibilidad de 90% y especificidad cercana al 80% para predecir hipocalcemia postoperatoria, lo que podría ser utilizado en la decisión de llevar a cabo otro procedimiento intraoperatorio para asegurar una función

paratiroídea adecuada, como sería un autotrasplante. (Lindblom y cols 2002, Agarwal y cols 2001). A su vez, hay estudios que comparan la incidencia de hipocalcemia postoperatoria en pacientes a los que se preserva la totalidad de paratiroides comparados con aquellos que se debe autoinjertar una, dos o tres glándulas paratiroides en el intraoperatorio. De esta forma la incidencia de hipocalcemia transitoria es 9,8% en los que no hubo necesidad de autotrasplante y 11,9%, 15,1%, y 31,4% cuando se requiere el autotrasplante de 1, 2 o 3 glándulas paratiroides respectivamente. El hipoparatiroidismo permanente por su parte es de 0% cuando no hubo necesidad de autotrasplante y de 0,98%, 0,77% y 0,99% cuando se requiere el autotrasplante de 1, 2 o 3 glándulas paratiroides respectivamente. (Palazzo y cols, 2005)(Olson, J y cols, 1996) Por lo tanto, la preservación de las paratiroides es crítica. Sólo en caso de una resección inadvertida o compromiso de la vascularización de las mismas es altamente recomendable el autotrasplante.

El hipoparatiroidismo postquirúrgico también puede observarse luego de cirugía de las mismas glándulas paratiroides, como tratamiento del Hiperparatiroidismo Primario (Adenomas 95% - Hiperplasia – Neoplasia < 1% de los casos) o Secundario (Hiperplasia paratiroídea en pacientes con insuficiencia renal). Si bien se trata de estudios con menor número de pacientes, se ha detectado que los casos con mayor riesgo lo constituyen: biopsias de dos o más glándulas PT, cirugía de tiroides junto con la paratiroidectomía, PTH plasmática preoperatoria mayor de 25 pmol/lit (237,4 pg/ml) o antecedentes de cirugía cervical previa. (Kald, BA y cols 2002).

Aquí toma mayor importancia la multifactorialidad de la hipocalcemia postoperatoria, ya que debemos considerar cuadros como el “Síndrome de Hueso Hambriento” que afecta principalmente a pacientes con hiperparatiroidismo secundario, sin tratarse de un hipoparatiroidismo verdadero.

1.2 Manejo médico, no autorregulado y no exento de complicaciones

El enfrentamiento terapéutico inicial (tratamiento médico) en el hipoparatiroidismo definitivo apunta a la suplementación de calcio y vitamina D (que aumenta la absorción intestinal de calcio). Este es un tratamiento de por vida, costoso y a veces de difícil manejo, requiriendo incluso hospitalizaciones con administración endovenosa de calcio. Si bien un

gran número de pacientes logra niveles plasmáticos de calcio adecuados y evita la sintomatología, no logran evitar la hipercalciuria y subsecuente nefrocalcinosis, que puede llevar finalmente a la insuficiencia renal.

Por otra parte, también se ha intentado tratar a estos pacientes con administración de PTH bovina inyectable, terapia que fracasó por el rápido desarrollo de resistencia (reacción inmune a proteínas bovinas) (*Melick y cols 1967*). Desde 1996 se ha buscado objetivar el efecto benéfico de la administración de PTH sintética (1 o 2 dosis diarias) en modelos animales y en pacientes hipoparatiroídeos, observándose un aumento en la mineralización ósea y disminución de excreción urinaria de calcio (*Chen, Q. y cols 2003, Winer, K. y cols 2003*); disminuye también el riesgo de fracturas y aumenta la densidad ósea corporal total en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis (*Neer y cols 2001*). Un estudio reciente presenta 27 pacientes con hipoparatiroidismo por diversas causas, en el cual 19 fueron tratados con PTH 1-34 y 9 con suplementación de calcitriol y calcio, vía oral. Los resultados indicaron que con el uso de PTH sintética disminuyó la excreción de calcio urinario en un período de 3 años de seguimiento. En cuanto a la densidad mineral ósea (BMD) y a la función renal, no se observaron diferencias significativas con el grupo de suplementación. Sin embargo, este estudio es cuestionable, pues incluye pacientes que ya estaban recibiendo PTH exógena por estudios previos (*Winer, K. y cols 2003*). Estudios más recientes reportan la creación de un fragmento de la PTH mediante ingeniería genética llamado Pro-Pro-hPTH(1-34), el cual es fácil de obtener y con buenos resultados funcionales en modelos animales (*Chunxiao W y cols 2007*).

El aporte de PTH sintética podría ser benéfico, pero se requiere precisar varios puntos: 1) la dosis que deben recibir los pacientes, 2) no es un tratamiento autorregulado, y 3) al no contar con estudios a largo plazo no podemos asegurar su beneficio real, ni descartar la posibilidad de complicaciones. En este sentido hay evidencias de que el aporte de PTH sintética en forma crónica puede favorecer el desarrollo de neoplasias óseas (*Sato, M. y cols 2002*). Un estudio experimental en animales (ratas) que trataba de evaluar el efecto benéfico de la administración a largo plazo de PTH sobre la mineralización ósea, observó precisamente un aumento dosis dependiente del riesgo de osteosarcoma. Esto último hace cuestionar fuertemente la aplicación de tal terapia en forma rutinaria en humanos. (*Sato, M. y cols 2002*).

En cuanto a intentos de terapia génica en hipoparatiroidismo existen escasos reportes experimentales *in vitro* y en modelos animales, en los cuales se ha ensayado la transferencia del gen recombinante pCKM-mPTH en osteocitos y miocitos. La transfección se realizó mediante liposomas catiónicos. Con este procedimiento se observó un aumento de la secreción al medio de PTH y elevación de PTH plasmática en ratas Sprague-Dawley, refiriendo que la transfección es más efectiva con liposoma que con plasmidios desnudos (Zhu YF 2007). Otros trabajos apuntan utilizar estas técnicas para aumentar la expresión de PTH y así mejorar la mineralización ósea como modelo de terapia génica en osteoporosis (Liu B y cols 2004).

1.3 Enfrentamiento quirúrgico: Autotrasplante y Alotrasplante

1.3.1 Aplicación del Autotrasplante

Dentro de las alternativas terapéuticas también está el manejo quirúrgico de esta patología, durante el mismo acto operatorio. Como se mencionó anteriormente, en caso de resección inadvertida de paratiroides o sospecha de hipoparatiroidismo por medición de PTH intraoperatoria, se recomienda el autotrasplante del tejido paratiroideo.

El autotrasplante de glándulas paratiroides fue descrito por primera vez en 1926 por F.H. Lahey. Brevemente, el método consiste en disgregar mecánicamente e injertar las glándulas paratiroides en tejido muscular (esternocleidomastoideo o antebrazo) (Lahey y cols 1926). La efectividad de este procedimiento ha sido demostrada en un alto porcentaje de casos. Un estudio prospectivo donde se realizaron 104 autotransplantes consecutivos en pacientes sometidos a cirugía de tiroides (resección subtotal o total), el autotrasplante fue exitoso, con mantención de la función endocrina y supervivencia del injerto a largo plazo, en 99% de los casos (103 casos) (Olson, J. y cols 1996).

Por otro lado, en pacientes sometidos a cirugía de paratiroides (Paratiroidectomía total) por hiperparatiroidismo primario o secundario se ha adoptado el autotrasplante inmediato de

tejido paratiroideo (60 mg) en antebrazo, para evitar el hipoparatiroidismo postquirúrgico. Pero, ello conlleva el riesgo de que el paciente desarrolle una persistencia o recurrencia del hiperparatiroidismo, por crecimiento del tejido paratiroideo injertado, requiriendo nuevas intervenciones que tendrán mayor probabilidad de un hipoparatiroidismo postoperatorio definitivo. (*Chou, Fong-Fu y cols 2002*) Por esto, muchos centros prefieren la paratiroidectomía subtotal o parcial, por el menor riesgo de recurrencia (*Richards, M. y cols 2006*).

Se ha intentado disminuir el riesgo de recidiva por proliferación del tejido paratiroideo autotransplantado mediante la selección intraoperatoria del tejido a injertar. Esto se realiza con un estéromagnificador identificando el tejido paratiroideo con características de tejido normal (mejor funcionalidad y menor potencial proliferativo - tipo A) (*Horandner, H. www.uninet.edu/cin2003/conf/horandner/horandner.html*) (*Neyer U y cols 2002*). Así, de 37 pacientes paratiroidectomizados totales con autotransplante inmediato identificando el tejido tipo A (de menor potencial proliferativo), sólo uno presentó recurrencia a los 32 meses de operado, y que fue fácilmente curado resecaando algunos injertos de su antebrazo. (*Neyer U y cols 2002*). Vale decir, se trata de un método difícil y poco reproducible.

La gran efectividad del autotransplante (99%) se debe probablemente a la rápida vascularización y reinervación observada en modelos animales, lo cual ocurre a los 4 días y a la semana, respectivamente. (*Prigouris, S. y cols 1996, Luts, L. y cols 1998*). Se ha demostrado que el tejido paratiroideo induce angiogénesis *in vitro*, en forma independiente de la presencia de calcio o de la secreción de PTH. (*Carter, WB y cols 1996*). En las glándulas paratiroides explantadas se observa un aumento de 12 veces en la expresión de mRNA para VEGF (*vascular endotelial growth factor*), un potente factor angiogénico producido por diversos tumores y tejido hipóxico. Así mismo, la inhibición de este factor con su receptor soluble, determina una inhibición de la angiogénesis. (*Carter, WB y cols 2000*).

1.3.2 Alotrasplante sin inmunosupresión: Sistema autorregulado y definitivo.

A pesar de todos los avances en cirugía endocrina para evitar la incidencia de hipoparatiroidismo postquirúrgico, se siguen reportando entre 1-30% de casos de

hipoparatiroidismo permanente (*Olson, J. y cols 1996*) (*Thomusch y cols 2003*) (*Hasse y cols 2000*). Por esto, urge encontrar una nueva alternativa terapéutica que aporte una función paratiroídea regulada para estos pacientes. En ello, el alotransplante de tejido o células de paratiroides aparece como una clara y atractiva alternativa. Como el hipoparatiroidismo no es letal si el paciente recibe la suplementación adecuada, no se justifica el uso de inmunosupresión para asegurar la sobrevivencia del tejido a injertar. Ello ha visto nacer una nueva línea de investigación que busca optimizar los cultivos de paratiroides humana previo al implante, mejorando la sobrevivencia y función del injerto.

Existe poca experiencia de alotrasplantes de PT en humanos. El grupo de *Tollozcko y cols* ha descrito 40 alotrasplantes en 23 pacientes receptores con hipoparatiroidismo postquirúrgico, logrando mantener niveles normales de PTH plasmática entre el 1^{er} y 6^{to} mes postrasplante. Sólo un caso mantuvo funcionalidad normal por 14 meses. Varios pacientes en este estudio requirieron retrasplante, los que evidenciaron menor viabilidad en el tiempo, que los injertos primarios, probablemente por inmunosensibilización y rechazo. En el caso anterior, se utilizaron glándulas de pacientes paratiroidectomizados por hiperparatiroidismo secundario (hiperplasia paratiroídea) (*Tollozcko y cols 1994*, *Wozniewicz B y cols 1996*). Éste constituye el tejido de elección, ya que se trata de tejido glandular normal sometido a una exigencia fisiológica en pacientes con insuficiencia renal (hipocalcemia crónica e hipovitaminosis D), que mantiene la proporción de células de una glándula PT normal, sin evidenciar cambios genéticos, ni la proliferación de un tipo celular en especial (clon), como en el caso del adenoma (*Dedeurwaerdere F y cols 2001*). Este grupo utilizó tejido procesado previamente, cultivado y seleccionado y fueron mantenidos por lo menos 2 meses *in vitro* para inducir proliferación y lograr una cantidad de células suficientes, estimada en 3×10^6 céls./paciente. (*Tollozcko y cols 1994*).

1.3.3 Alotrasplante microencapsulado:

Otra alternativa es el alotrasplante de tejido de paratiroides cultivado o total, pero protegido con una barrera mecánica que impida el reconocimiento por el sistema inmune del receptor y evite el paso de Anticuerpos y moléculas del Complemento, la Microencapsulación Celular.

Se han utilizado diversos materiales para lograr microencapsular tejidos, tanto sintéticos como naturales. El más estudiado es el Alginato de Sodio, constituido por polímeros de ácido gulorónico y malurónico obtenidos de algas marinas (principalmente *Lessonia trabeculata*). Con este se han mantenido tejido y suspensiones celulares en cultivo por diversos períodos, con buena sobrevida y mantención de las características de diferenciación celular (páncreas, fibroblastos, paratiroides) (*Zimmermann H y cols 2007*). Sin embargo, existen muchos estudios que tratan de combinar estos polímeros con otras moléculas para aportar mayor estabilidad, biocompatibilidad, menor reacción a cuerpo extraño y permeabilidad (*Sakai y cols 2000*), puntos que persisten sin ser resueltos.

Específicamente en tejido paratiroideo se ha observado la mantención de la funcionalidad de células de paratiroides microencapsuladas por más de 20 semanas (*Picariello y cols 2000*). Por otro lado se ha estudiado el comportamiento del tejido microencapsulado xenotrasplantado, donde Hasse y cols xenotrasplantaron tejido de PTs humanas en ratas, midiendo la producción específica de PTH humana hasta 26 semanas postinjerto. En el estudio de este grupo, se evidencia una respuesta inflamatoria de tipo cuerpo extraño alrededor de las microesferas injertadas, pero no respuesta inmune específica. (*Hasse C y cols 1997-a J Microencaps*).

Hay sólo 4 casos publicados sobre alotrasplante de tejido paratiroideo microencapsulado en pacientes con hipoparatiroidismo severo: dos pacientes en Alemania, a los que se injertaron 20 microesferas con células de paratiroides de cultivos primarios lográndose mantener función secretoria y respuesta clínica (disminución de requerimiento del aporte exógeno de calcio) sólo en un paciente, con una sobrevida de las microesferas de más de 80 días. La ausencia de trabajos posteriores hace pensar que se perdió la funcionalidad de las células, o que el implante se perdió por reacción a cuerpo extraño. (*Hasse C y cols 1997-b Lancet*).

Otro caso, paciente también alemán (*Ulrich y cols 2004*) recibió 20 microesferas con tejido paratiroideo no cultivado previamente. Este paciente mantuvo función endocrina adecuada, con disminución significativa del requerimiento de calcio, por 3 meses. Posteriormente, la función endocrina disminuyó en forma importante manteniendo un basal hasta los 12 meses donde hubo un ascenso progresivo de la secreción de PTH. No hay reportes posteriores.

Ninguno de los casos aquí detallados recibió terapia inmunosupresora.

1.3.4 Problemas: masa celular crítica, duración de los cultivos y rechazo.

La cantidad de tejido necesaria para lograr una terapia celular de reemplazo efectiva (función endocrina normal) se estima de la experiencia en autotransplante de tejido PT en pacientes sometidos a paratiroidectomía por hiperparatiroidismo primario, a los que se realiza autotransplante de rutina en algunos centros. Estos pacientes mantienen una adecuada homeostasis del calcio cuando se les autoinjerta por lo menos 60 mg de tejido PT (*Chou, Fong-Fu y cols 2002*). En otro estudio, utilizando alotransplante de PT intactas en humanos (2 pacientes trasplantados renales bajo inmunosupresión), usando ratas como huéspedes intermediarios del tejido paratiroideo para prolongar la sobrevivencia de éste hasta el momento del trasplante en el paciente, se trasplantaron 15 – 20 mg de tejido, logrando reducir sólo 1/3 la dosis de calcio y vitamina D preoperatoria. (*Sollinger y cols 1983*)

Por lo tanto, de la información acumulada se rescata que la masa crítica celular o de tejido a trasplantar es de 3×10^6 células/paciente o 60 mgs tejido PT/paciente como mínimo, respectivamente. Sin embargo, debemos considerar la pérdida de tejido al trasplantar. En este sentido experiencias de injerto de miocitos en miocardio (cardiomiopatía celular) arrojan cifras de hasta un 90% de pérdida de las células injertadas (*Wu JC y cols 2003*) (*Tang YL y cols 2005*).

Ahora, para lograr tener una masa celular suficiente para la terapia celular se deben optimizar las condiciones de cultivo del tejido paratiroideo, ya que no se ha logrado mantener cultivos de tejido paratiroideo humano con función endocrina normal por tiempo prolongado. Algunos autores han logrado desarrollar cultivos viables, con secreción de PTH y respuesta normal al calcio extracelular por hasta 6 semanas máximo, con lento crecimiento. (*Tolloczko y cols 1997*). *Brandi y cols 1986* describieron condiciones de cultivo de paratiroides de bovino que persisten por más de 140 subcultivos, y además el cultivo de PT humanas con mantención de la secreción de PTH en el medio por 3 meses, pero no describen la capacidad de respuesta a concentración de calcio extracelular. *Roussanne y cols 1998* describen cultivos de paratiroides con buena respuesta a calcio extracelular por 5 meses, lo que no ha sido reproducido hasta hoy por otros grupos. Otros autores también observan secreción de PTH en cultivo mantenida en el tiempo, pero simultáneamente se pierde la regulación de la respuesta secretoria por calcio extracelular.

Dentro de las alternativas para mejorar los cultivos en cuanto a duración y función endocrina están las modificaciones de calcio y vitamina D en el medio, llegando incluso a la adición de pequeños trozos de PT fresca o criopreservada en las placas de cultivo. Ello ha permitido acelerar la proliferación de los cultivos, pero no incrementar o preservar la funcionalidad. (Tolloczko y cols 1994, Liu, W y cols 2001)

Esta incapacidad de mantener cultivos funcionales esta dada probablemente porque los esfuerzos por lograr una terapia de trasplante efectiva se han orientado a la obtención de tejido PT muy específico. En efecto, se han buscado utilizar sólo células principales productoras de PTH y que no expresen moléculas MHC (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad), alterando así por completo los mecanismos de regulación normal y condicionamiento paracrino de la glándula, y por ende la homeostasis del calcio. Esta selección se ha llevado a cabo mediante técnicas de “cell sorting” por Citometría de flujo (Tolloczko 1997; Anton G 1994) y/o separación de fracciones celulares en gradientes de densidad de Percoll. En la selección por Citometría de flujo se utiliza como marcadores celulares el receptor de PTH y un marcador específico de células principales (productoras de PTH), el antígeno 5B5. (Tolloczko y cols 1997, Wozniwicz B y cols 1996) Para la selección de células de paratiroides por gradientes de densidad se ha identificado el rango de bandas de densidad donde se concentran las células viables luego del cultivo primario (1.035 a 1.090 gr/dl), logrando caracterizar por microscopía óptica bandas donde se localizan la mayor proporción de células principales y oxifílicas (principales > 1.055 gr/dl < oxifílicas). (Rudberg y cols 1986)

De esta forma se han establecido muchos protocolos para estudiar el tejido paratiroideo como modelo *in vitro*, y para desarrollo de terapia celular. Sin embargo, aún no se ha logrado establecer condiciones de cultivo eficientes ni reproducibles, obteniéndose resultados contradictorios en cuanto a función paratiroidea *in vitro* v/s *in vivo*.

A este respecto, cabe mencionar que la secreción de PTH en las células paratiroides humanas es afectada por distintos factores como son: concentración de calcio extracelular, concentración plasmática de vitamina D, concentración plasmática de magnesio, estímulo catecolaminérgico, esteroides plasmáticos, cosecreción de cromogranina A, endotelina -1. La respuesta a cada uno de estos factores se ha evidenciado por medición de producción de

PTH en el medio y por aumento de la expresión génica a nivel del mRNA para PTH. (Usdin, T y cols 1995, Bisello, A y cols 2002, Mihai, R. y cols 2000, Marx, S. 2000, Brown y cols 1993, Garret JE y cols 1995, Pauls T y cols 2000, Demay M y cols 1992, Fasciotto B y cols 1990, Eguchi S y cols 1992, Silver J 2001, Fujii Y y cols 1991, Sakwe A y cols 2002). Por otra parte, la proliferación de las células de paratiroides también se ve afectada por muchos factores, tanto plasmáticos como autocrinos y paracrinos. Los principales son: la concentración de vitamina D plasmática, concentración de Fosfato plasmático, concentración de calcio plasmático, y factores paracrinos como la endotelina 1 y FGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos). En cuanto a la proliferación, se han encontrado resultados contradictorios entre modelos *in vivo* y modelos *in vitro*. Por ejemplo, el aumento de la concentración de calcio extracelular provoca un aumento de la proliferación *in vivo* y una disminución de la misma *in vitro*, lo que probablemente está dando cuenta de la complejidad de los mecanismos de autorregulación en el microambiente glandular. (Almaden y cols 2003, Zhang P y cols 1997, Drüeke T y cols 2000, Canalejo A y cols 2000, Corbetta S y cols 2002, Sakaguchi K 1992).

Hay sólo un ejemplo de sobrevida a largo plazo de un injerto paratiroideo (13 años de seguimiento), en un paciente que recibía tratamiento inmunosupresor por un trasplante renal previo. (Alfrey, E y cols 1992). Claramente, la indicación de inmunosupresión no aparece conveniente en una terapia de trasplante de paratiroides, por lo cual se han desarrollado esfuerzos para evitar el rechazo específico por inmunización mediante el uso de la microencapsulación. Pero, en estos casos, no se puede obviar la posibilidad de una reacción a cuerpo extraño que termine por fibrosar todo el injerto. Así, se ha utilizado distintos tipos de microencapsulación: Alginato con poli-lisina, alginato con calcio, alginato con bario. Los primeros estudios realizados utilizaban el sistema A-P-A (Alginato – Polilisisina – Alginato) que aportaba una doble capa de alginato suponiendo que la barrera sería mejor. La poli-lisina es citotóxica y no aprobada por la FDA para el uso en seres humanos. Además aumenta la reacción inflamatoria local, con mayor reacción a cuerpo extraño. Por esto se prefirió continuar los estudios con Alginato-calcio o Alginato-Bario. (Zimmermann U y cols 2004 *Microencapsulation Based-Cell Therapy. Cap 19. Ed. Wiley*)

Otro punto importante es la permeabilidad que presentan estos polímeros gelificados. La técnica APA permite el paso de moléculas de hasta 150 kDa.

Finalmente, es importante la resistencia que las microesferas tengan frente a ambientes de pH extremo o estrés mecánico, para lo cual existen evidencias de que las microesferas de Alginato-Bario son más resistentes que las microesferas de Alginato-Calcio (*van Raamsdonk JM y cols 2001*).

Todos estos puntos serán vitales para decidir que tipo de compuesto y metodología utilizar para un trasplante en humanos.

1.3.5 Trasplante de Islotes de Langerhans: Optimización de cultivos en otro modelo endocrino.

En otros modelos endocrinos de trasplante celular, se ha intentado mejorar la sobrevivencia y función endocrina de las células en cultivo mediante técnicas de cultivo en suspensión y cocultivos (*Cameron - Sandberg 2001*). Por ejemplo, en estudios utilizando Islotes de Langerhans para terapia de trasplante celular en diabetes mellitus se está pregonando el cocultivo de los Islotes con células nodrizas que aporten factores paracrinos de regulación. Algunos autores han logrado mayor sobrevivencia de los Islotes y mejor respuesta de secreción de insulina al cocultivar con hepatocitos (*Soto ML 2001*) y con células de Sertoli. (*Garkavenko O y cols 2002, Korbitt y cols 1997, Cameron D y cols 2001*) También se ha observado que esta condición de cocultivo protege a los islotes de la destrucción alo y autoinmune (*Suarez-Pinzon W 2000*) Incluso, hay experiencias preliminares de xenotransplantes de estos conglomerados celulares microencapsulados en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 (12 casos), disminuyendo los requerimientos de insulina en un 40%. (*Valdés R y cols 2001*)

Dentro de las líneas celulares humanas conocidas como nodrizas están las ya mencionadas células de Sertoli (utilizada en cocultivos con islotes de langerhans) y las células de granulosa humana. De estas últimas existe una línea celular inmortalizada en nuestro laboratorio (RCGH). (*Caviedes et al, Pat. WIPO N° WO 03/065999 A2*)

En resumen, se puede decir que la producción de PTH y la proliferación de las células de paratiroides dependen de varios factores y que en la glándula *in vivo* logran un complejo equilibrio aún no comprendido cabalmente y por tanto, difícil de reproducir, lo que ha dificultado el desarrollar modelos de estudio adecuados y la obtención de tejido óptimo para trasplante. Por otra parte, los intentos de alotransplante de paratiroides no han sido totalmente efectivos. Por esto, los distintos autores concuerdan en que las condiciones de cultivo actualmente en uso no preservan adecuadamente los mecanismos normales de contacto célula a célula que permitan mantener la homeostasis del calcio plasmático, y es así como se han desarrollado técnicas de cocultivo y microencapsulación para mejorar estos aspectos.

2. HIPÓTESIS:

La optimización de los cultivos de paratiroides humana y el cocultivo de estas con células de granulosa humana (RCGH), como nodriza, aportará el microambiente glandular para mantener una función endocrina adecuada a largo plazo.

A su vez, la microencapsulación mantendrá este microambiente y permitirá aún mayor duración y mejor función endocrina a largo plazo.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivos generales:

- 1) Establecer cultivos duraderos y con función endocrina normal a largo plazo de paratiroides humana.
- 2) Implementar técnica de microencapsulación celular.
- 3) Estudiar el efecto paracrino de las células de granulosa humana, sobre la función endocrina del tejido paratiroideo.

3.2 Objetivos específicos:

- 1) Establecer cultivos primarios de paratiroides humana y evaluar su comportamiento morfocinético y funcional en el tiempo.
- 2) Establecer cultivo contínuo de células de PTs humana mediante método de inmortalización de Caviedes y cols
- 3) Establecer cocultivos de paratiroides humana con la línea RCGH (Granulosa humana) como célula nodriza. (sin contacto célula a célula

mediante inserts y sin contacto célula a célula mediante utilización de medio condicionado de RCGH).

- 4) Microencapsular los distintos tipos de cultivo y tejido sin cultivar, para su caracterización posterior.
- 5) Evaluar las microesferas en cuanto a Resistencia, Permeabilidad y Recuperación de RNA.
- 6) Caracterizar las distintas condiciones de cultivos en cuanto a:

Crecimiento Celular: parámetros morfocinéticos.

Proliferación: Incorporación de Bromodeoxiuridina.

Función Endocrina: mediante detección de PTH en el medio (RIA)

Respuesta endocrina: Con curva Dosis/Respuesta, frente a distintas concentraciones de calcio extracelular

Medición de PTH por ELISA

- 7) Experiencia clínica de aplicación de técnicas aplicadas en el proyecto.

4. MATERIAL Y MÉTODOS:

Se obtuvo Paratiroides Humanas de pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC) sometidos a paratiroidectomía por hiperparatiroidismo secundario, y de pacientes con hiperparatiroidismo primario. Los pacientes fueron informados y bajo un consentimiento especialmente diseñado (Anexo 1 - aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina Universidad de Chile). Se estudió la posible infección crónica por virus hepatitis B o C y VIH, bajo consentimiento del paciente. Los pacientes insuficientes renales en diálisis tenían estricto control de estos agentes infecciosos en sus correspondientes centros de diálisis. El tejido extraído fue analizado por un patólogo, asegurando la naturaleza benigna de las glándulas, utilizándose sólo tejido de hiperplasia o adenoma de paratiroides. Las muestras fueron transportadas en medio de cultivo DMEM/F12 a 4°C, y procesadas en un plazo de 1 hora máximo.

4.1 Cultivos Primarios:

4.1.1 Medios y soluciones utilizados en cultivos:

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagles's Medium / Ham F12 (Sigma)

RPMI (Sigma)

DMSO: Dimetilsulfoxido (Merk)

Solución D: Solución de lavado. PBS: Phosphate Buffered Saline. Modificada.

Compuesto	Conc (mM)	PM	gr. 1000 ml	gr. 2000 ml.
NaCl	137	58,44	8,0063	16,0126
KCl	5,4	74,55	0,4026	0,8051
Na ₂ HPO ₄	0,17	141,96	0,0241	0,0483
KH ₂ PO ₄	0,22	136,09	0,0299	0,0599
Glucosa	5,5	198,17	1,0899	2,1799
Sacarosa	5,9	342,30	2,0196	4,0391

Buffer fosfato salino pH 7,4

Tripsina 0.25%: Para el proceso de tripsinización y subcultivo se utilizó el siguiente protocolo.

4.1.2 Tripsinización:

- 1) Aspirar el medio de cultivo de las placas.
- 2) Lavar con Solución D (2 veces)
- 3) Agregar tripsina 0.25% 500 μ l para una placa de 6 cm (cantidad justa para formar una película fina)
- 4) Incubar a 37°C por 5 minutos. Se debe controlar el desprendimiento de las células de la placa. Una vez que se han desprendido un 50% aprox se debe agitar en forma lateral.
- 5) Lavar con solución D 3-4 ml. Mediante pipeteo con pipeta de vidrio de 5 ml.
- 6) Colocar suspensión celular en tubos de centrifuga (falcon 15 ml) y centrifugar por 10 minutos a 400g.
- 7) Aspirar el sobrenadante.
- 8) Resuspender el pellet de células en medio completo.
- 9) Sembrar e incubar.

En el laboratorio se procedió a disgregar con técnica estéril las muestras en forma mecánica, separando el tejido identificable como parénquima del estroma. Luego se cortaron las muestras sobre una placa de petri en presencia de Colagenasa IV 0,2% (Worthington) disuelta en PBS, entre dos bisturí en trozos de 1 x 1 mm. Se cultivaron por 30 minutos a 37 °C. en colagenasa. Después, se disocia el tejido pasando la suspensión celular a través de una pipeta pasteur. Se centrifuga por 10 minutos a 500 rpm. Se resuspende el pellet en medio de cultivo completo

Parte del tejido disgregado mecánicamente es criopreservado manteniendo un banco de tejido de los pacientes incluidos.

4.2 Inmortalización de Líneas Celulares:

Se trasladaron las muestras en medio de cultivo a 4°C. Con técnica estéril el tejido fue manipulado bajo campana de flujo laminar, donde se disgregó mecánica y osmóticamente con colagenasa II 0,2% (sigma) a 37°C. Se mantuvo las células en medio DMEM/F12 suplementado con Suero Bovino al 10%, Suero Fetal Bovino al 5%, y medio condicionado de línea tumoral de tiroides de rata (UCHT1) al 10%. Se incubó en cámara de cultivo con 5% de CO₂, 95% de humedad y 37°C. Con esto se logra la inmortalización de las líneas en 1 a 8 meses de cultivo. (*Caviedes y cols 1992, Cabané y cols 2006*)

4.3 Criopreservación:

Una vez disgregado el tejido, se lava y centrifuga por 10 minutos a 500 rpm. Se resuspende el pellet en medio de criopreservación (DMEM/F12 + Suero Fetal Bovino 20% + Dimetilsulfoxido 10%), depositando la suspensión celular en criotubos de 1,8 ml. Se enfría en hielo para luego llevarlo a -85 °C en forma gradual (1° por hora), en capachos con alcohol isopropílico para lograr este efecto. Finalmente se llevan los criotubos a -198 °C en nitrógeno líquido.

4.4 Morfocinética, Crecimiento Celular y Proliferación:

Los cultivos celulares son controlados diariamente mediante un microscopio invertido de contraste de fases, registrando digitalmente los cultivos con cámara SONY CyberShot 2.0 Megapíxeles. El crecimiento celular se objetiva mediante la medición de Curvas de Crecimiento, Tiempo de Duplicación, Densidad de Placa e Incorporación de Bromodeoxiuridina (BrDU).

4.4.1 Curvas de Crecimiento:

Se siembran placas de 6 cm de diámetro (Falcon ®). Con 70.000 células por placa. En duplicado. Se va retirando 2 placas cada día para contar el número de células mediante tripsinización y conteo de número total de células totales (con cámara de Neubauer). El medio de cultivo es cambiado cada 3 días, o según necesidad (viraje del rojo fenol del medio por acidez del mismo).

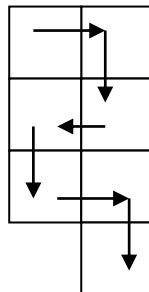
4.4.2 Tiempo de duplicación (doubling time):

Tiempo que demora un cultivo en doblar el número de células. Contando con cámara de Neubauer (conteo celular) y según método de Caviedes y cols (*Caviedes y cols 1992*) en placas de 35 mm.

Conteo Celular: Primero se siembran 70.000 células/placa de 6 cm de diámetro en triplicado (15 placas) y se tripsiniza y cuentan las células en cámara de Neubauer cada 24 hrs.

Método Caviedes: Se siembran las células a baja densidad en placa de 35 mm. Se marca puntos de referencia en la placa y en el microscopio. Buscando las mismas coordenadas cada vez, se cuenta el número de células por campo en días sucesivos, según el modelo y fórmula siguiente siguiente:

$$TD = (t \text{ final} - t \text{ inicial}) \times \log 2 / (\log N^{\circ} \text{ céls } t \text{ final} - \log N^{\circ} \text{ céls } t \text{ inicial})$$



4.4.2 Densidad de saturación:

Para evaluar la densidad de saturación se siembra placas de 6 cms a confluencia casi total (n=5). Se controlan diariamente los cultivos hasta que se objetiva la confluencia del 100%. Se tripsiniza, y cuenta el número total de células. Se divide el número total por la superficie de las placas. Se presentan los resultados en N° de células / cm².

4.4.3 Incorporación de Bromodeoxiuridina:

Materiales:

- 5´Brd 2´Uridina (Bromodeoxiuridina) 10 mM (Sigma B5002) PM: 307.4

Para preparar solución 10 mM, disolver 3 mg en 10 ml de agua destilada.

- Anticuerpo anti BrDU Monoclonal murino

- Anticuerpo secundario Anti Murino conjugado con FITC

- PBS + azida de sodio 0.02% + Bovine Serum Albumina BSA 0.01%

- HCl 2 N (196.6 ml de HCl en 1 litro de agua destilada)

Borato de Sodio 0.1M: PM 201.22 gr/mol Para preparar 100 ml de solución disolver 2 gr de borato de sodio en agua destilada

Procedimiento:

- 1) Lavar células (placas de 6 cm, céls cultivadas sobre cubreobjetos a baja confluencia en triplicado en las distintas condiciones) con PBS, dos veces.
- 2) Fijar células con Metanol a -20°C por 10 minutos (mantener a 2-8°C)
- 3) Secar al aire. Se pueden mantener a -20°C en caja sellada o rehidratar para continuar el procedimiento.

- 4) Para rehidratar, sumergir en PBS por 3 minutos
- 5) Denaturar el DNA incubando placas en HCL 2N a 37°C por 60 minutos.
- 6) Neutralizar el ácido clorhídrico sumergiendo placas en Buffer Borato 0,1 M pH 8,5 (lavar 2 veces po 10 min c/u)
- 7) Lavar con PBS. 3 veces c/u.
- 8) Colocar en cámara húmeda (placa de petri con toalla nova húmeda) e incubar con anticuerpo primario por 60 min a T° ambiente.

Anticuerpo BrDU mouse (Sigma N° cat. 2531) diluído 1:1000

- 9) Lavar con PBS por 3 veces, 10 min c/u.
- 10) Aplicar anticuerpo secundario a dilución 1:100. Anti Mouse – FITC (VectorLabs) diluido en buffer recomendado por el fabricante (NaHCO₃ 0.1M, pH 8,5 en NaCl 0.15 M)
- 11) Lavar con PBS por 3 veces, 10 c/u
- 12) Montar con medio de montaje Dako en portaobjetos.
- 13) Contar número de células totales y con tinción nuclear positiva. Se expresa el porcentaje de células positivas sobre el total. Porcentaje de proliferación.

4.5 Identificación por Inmunocitoquímica:

Se siembra en placas de 6 cm de diámetro de plástico con cubreobjetos de vidrio en el fondo, a baja confluencia (50%). Una vez adheridas las células, y según el tiempo y condición de cada experimento, se lavan las placas con PBS. Se fija con metanol frío (-20 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 °C toda la noche. Se utilizó anticuerpo anti PTH humana (N-18) de cabra 1:100 (Santacruz Inc) y Anti CaSR Humano (receptor de calcio sensible) de ratón 1:100 (Chemicon). Luego se lava 3 veces con PBS y se incuba con anticuerpo secundario Anticabra biotinilado (20 µg/ml - Vectorlabs) y Antiratón conjugado con FITC (20 µg/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*. Se expresa el valor porcentual de células positivas v/s negativas en diez campos al azar.

4.6 Tinción De La Reacción Del Ácido Per-Iódico De Schiff (Pas)

Con esta tinción se evidencian los depósitos de glicógeno intracitoplasmáticos. El ácido per-iódico oxida los 1,2-glicoles de los tejidos, contenidos principalmente en carbohidratos. Con esta oxidación se transforman en aldehídos que luego se colorean por el reactivo de Schiff.

Materiales:

1) Ácido per-iódico 0,5% en agua destilada

2) Reactivo de Schiff:

Fucsina básica	1 gr
Agua destilada	200 ml
HCl N (93,8 ml de HCl, P.E.1.16.j aforar a 1 lt)	20 ml
Bisulfato sódico anhidro	1 gr

Preparación reactivo de Schiff:

Hervir 200 ml de agua destilada, agregar fucsina. Agitar. Dejar enfriar hasta 50°C. Filtrar. Agregar HCl 1N, dejar enfriar hasta 25°C y agregar bisulfit de sodio. Mantener en la oscuridad por 2 días. Debe tomar color amarillo. Agregar una pequeña cantidad de carbón activado y filtrar. Debe quedar claro para su uso.

3) Baño de ácido sulfuroso:

Metabisulfito sódico al 10%	6 ml
Ácido Clorhídrico N	5 ml
Agua destilada	100 ml

Procedimiento:

1) Las células en adhesión sobre cubreobjetos deben ser lavadas con PBS.

- 2) Agregar ácido per-iódico por 5 minutos
- 3) Lavar con agua de la llave y luego con agua destilada
- 4) Colocar reactivo de Schiff durante 15 minutos.
- 5) Colocar en baño de ácido sulfuroso 3 veces, 2 minutos cada vez.
- 6) Pasar rápidamente por agua corriente.
- 7) Deshidratar en betería de alcoholes. Montar
- 8) Los carbohidratos se ven color magenta o púrpura.

4.7 Cocultivos:

Los cocultivos sin contacto célula a célula de células principales con células de la línea RCGH (Granulosa Humana) se realizaron en placas bicamerales de 24 wells (Nunc) con inserts que contenían células RCGH (que sólo comparten el mismo medio de cultivo). Se utilizó medio DMEM/F12 suplementado con suero bovino adulto (SB) al 10% y suero fetal bovino (SFB) al 2,5%. Se cambió el medio cada tercer día. Los cultivos con medio condicionado de Células de Granulosa Humana RCGH, se realizaron en placas de plástico de 6 cm de diámetro.

4.8 Caracterización de Función Endocrina:

La determinación de PTH en el medio se realiza mediante técnica de Quimioluminiscencia con kit de detección de PTH intacta, IMMULITE – DPC ®. (Clinitest S.A.), tomando alícuotas del medio de cultivo. Esta medición se utiliza como prueba de mantención de la función endocrina en el tiempo. Se midió PTH del medio de cultivo condicionado de los cultivos primarios una vez por semana. Las muestras fueron congeladas a -20°C para su análisis posterior.

4.8.1 Curva Dosis Respuesta:

La función endocrina normal se evalúa observando la respuesta secretoria frente a distintas concentraciones de calcio extracelular. Se cultiva células a confluencia casi total en placas de 10 cms. Se lava el medio de cultivo con PBS, luego se incuba por 2 hrs con medios que contengan concentraciones crecientes de calcio (0,5 – 1 – 1,5 – 2 – 2,5 y 3 mM) y se midió

PTH en el medio por RIA KIT IMMULITE para líneas primarias de PTH y con Kit ELISA anti PTH (Biosource) para línea RCPTH. Se correlaciona la medición con el número total de células o de proteínas por placa (método Bradford).

4.8.2 Protocolo Bradford:

Materiales:

1) Reactivo Bradford: 100 mg Coomassie Brilliant Blue 6-250 en 50 ml ETOH 95% + 100 ml 85% ácido fosfórico + 1 litro H₂O destilada + filtrar por 0,45 µm y guardar a 4 °C

2) Muestra (Si la muestra está muy concentrada debe diluirse 1/10)

(2 µl de muestra + 98 µl H₂O + 1 ml Bradford) o (8 µl de muestra + 92 µl H₂O + 1 ml Bradford)

Preparación de curva estandar con BSA:

Mcg de prot	Abs
0	
20	
40	
60	
80	
100	
120	
140	
160	

3) Medir en espectrofotómetro a 595 nm (cubeta de plástico)

Se expresa los resultados en curva de Absorbancia v/s Concentración de proteínas. El resultado de concentración de proteínas de las muestras se obtiene utilizando la ecuación de la recta de la curva estándar.

4.9 Crecimiento en Agar Blando: Prueba de Tumorigenicidad In Vitro

Este método se utiliza como prueba de tumorigenicidad de la línea continua obtenida. Las células transformadas tienen la capacidad de multiplicarse en suspensión, sin adhesión a la placa.

Materiales:

- Noble Agar 5% (Sigma)
- DMEM 2X
- SFB: Suero Fetal Bovino
- DMEM 1X

Procedimiento:

Se disuelve el Agar al 5% en baño de María hasta derretir. Dejar enfriar hasta 45 °C. (Esterilizar previamente la solución de agar 5% en autoclave). Una vez alcanzado los 45°. Aparte se agrega 1 ml de DMEM 2x + 1 ml de SFB + 7 ml de DMEM 1x. Homogenizar y agregar 1 ml de la solución de agar 5% con agitación rápida. Luego se traspara la mezcla final a placas de 35 mm y se incuban a 37° hasta utilizarlas. Para agregar las células se deben preparar suspensiones celulares $0,5 \times 10^4$, 1×10^4 y 5×10^4 células/ml de DMEM.

En un tubo de 15 ml cónico agregar 1 ml de la suspensión celular y 2 ml de la solución DMEM-agar 0,5%. Quedando una concentración final de agar 0,3% w/v. Agitar rápidamente, rescatar y sembrar 1,5 ml de la suspensión celular. Incubar a 37 °C. Se debe agregar semanalmente 200µl de DMEM + 10% SFB para evitar deshidratación del agar.

Realizar el mismo procedimiento con células tumorales conocidas como control positivo (Se utilizó la línea celular Hep2 –carcinoma escamoso laríngeo).

A los 21 días de cultivo se cuenta el número de colonias (definidas como grupos de 16 – 50 células) en 10 campos al azar por cada placa. Se utilizó método de Azul Tripán para certificar la vitalidad de las células en Agar.

Este experimento se repitió, en duplicado, en forma consecutiva para mayor seguridad de los resultados.

4.10 Viabilidad por Técnica de Azul Tripán:

Material:

Tripan Blue (Sigma) 4%

Procedimiento:

Se agrega 50 μ l de azul tripán a cada placa, se incuba por 30 segundos, se lava con PBS por 3 veces para remover el exceso de azul tripán. Luego se cuentan las colonias o células vivas y muertas por campos al azar en cada placa. Se expresa los resultados como N° de colonias y/o células por campo y el porcentaje de vitalidad.

4.11 Separación Celular (Gradiente de Percoll®)

Se resuspendieron las células de RCPTH tripsinizadas y lavadas. Se centrifugará la suspensión celular en gradiente discontinua de Percoll (según método de *Rudberg y cols*).

La separación de cultivos celulares continuos se lleva a cabo según el siguiente protocolo:

Se definen 3 soluciones con densidad: 1.035, 1.055 y 1.090 gr/dl

Para la preparación de 2 tubos de centrifugación se utiliza 2 ml de cada densidad por tubo (6ml en total) y muestras de 20 – 30 x 10⁶ células por tubo.

Para preparar cada solución se agrega 1/10 del volumen de la solución final de trabajo de Medio de cultivo 10X, más la cantidad de Percoll sin diluir calculado mediante la siguiente fórmula:

$$V_o = V \frac{(r - 0.1r_{10} - 0.9)}{r_o - 1}$$

$$r_o - 1$$

Donde V_o = volumen de Percoll (sin diluir) (ml)

V = volumen final solución de trabajo (ml)

r = densidad deseada de la solución final (g/ml)

r_o = densidad del Percoll (undiluted) (g/ml)

r_{10} = densidad de 1.5 M NaCl = 1.058 (g/ml)

Completando con agua destilada hasta el volumen final de trabajo.

De esta forma, para una solución de:

1) 6ml con densidad 1.035 gr/ml (asumiendo la densidad del NaCl 1.5M como la densidad del medio de cultivo 10X)

A 0.6 ml de medio de cultivo 10X debo agregar 1.35 ml de Percoll sin diluir y llevar a 6 ml con 4.05 ml de agua destilada

2) 6ml con densidad 1.055 gr/ml (asumiendo la densidad del NaCl 1.5M como la densidad del medio de cultivo 10X)

A 0.6 ml de medio de cultivo 10X debo agregar 2.27 ml de Percoll sin diluir y llevar a 6 ml con 3.13 ml de agua destilada

3) 6ml con densidad 1.090 gr/ml (asumiendo la densidad del NaCl 1.5M como la densidad del medio de cultivo 10X)

A 0.6 ml de medio de cultivo 10X debo agregar 3.89 ml de Percoll sin diluir y llevar a 6 ml con 1.51 ml de agua destilada

Para la identificación de las distintas densidades se utilizará medio con rojo fenol para la solución 1.055 y sin rojo fenol para las otras.

Las muestras (500 μ l con 20 a 30 millones de células) son colocadas en la superficie de las soluciones de percol y centrifugada a 400g por 15-20 minutos.

Luego se rescata las células de cada interfase de densidades. Se contarán utilizando cámara de Neubauer. Se lavan con Solución D y se siembra en placas de cultivo con cubreobjetos con medio DMEM/F12 suplementado. Una vez lograda la adherencia de las células seleccionadas, se realiza inmunohistoquímica para detectar Paratohormona (PTH).

En el laboratorio italiano se llevó a cabo una prueba preliminar en células de un cultivo primario de paratiroides humana. Se preparó Percoll en distintas proporciones v/v (30, 40 y 60%). La fase de 40% se preparó con medio DMEM/F12 con rojo fenol para diferenciar las interfases. Una vez depositada cada solución de Percoll, se coloca suavemente la suspensión celular (500 μ l) sobre la superficie del Percoll. Se lleva a centrifuga con capachos batientes para centrifugación horizontal y se programa centrifugación a 400 g por 15 minutos. Luego se rescata las células de cada interfase y se siembran en placas de plástico con medio completo. Se siguió morfológicamente los cultivos por un período de observación de 15 días. No fue posible realizar inmunohistoquímica en este experimento.

4.12 Microencapsulación:

4.12.1 Según método de Alginato polilisina Alginato (utilizado en Florencia) (Picariello y cols)

Material necesario:

- 1) Tripsina 0,05%

- 2) Alginato de Sodio 1,3% (w/v) + NaCl 0,85%
- 3) CaCl₂ 1,1%
- 4) CHES 0,1% + NaCl 0,85%
- 5) Poli-L-lisina 0,05% (w/v) 17.000-25.000 daltons
- 6) Alginato de Sodio 0,12%
- 7) NaCl 0,85%
- 8) Citrato de Na 0,05 M pH 7,4
- 9) PBS – Sol. D
- 10) Medio de cultivo Completo.

- 1) TRIPSINA 0,05%

50 mg de Tripsina en 100 ml de PBS.

- 2) ALGINATO DE SODIO 1,3% (w/v) + NaCl 0,85%

1,3 gr de Alginato de Sodio en 100 ml de solución NaCl 0,85%

Mantenición: A 4 °C. Esteril.

Preparación: Con agitador a altas temperaturas. Esterilizar en autoclave y por filtros 0,22 µm.

- 3) CLORURO DE SODIO (NaCl) 0,85%

1X 850 mg de NaCl en 100 ml de H₂O destilada

5X 4,25 gr de NaCl en 100 ml de H₂O destilada

(para llevar a 1x, tomar 20 ml y aforar a 100 con agua destilada)

- 4) CLORURO DE CALCIO (CaCl₂) 1,1%

1X 1,1 gr de CaCl₂ en 100 ml de H₂O destilada

5X 5,5 gr de CaCl₂ en 100 ml de H₂O destilada

Para llevar a 1X tomar 20 ml de 5X y aforar a 100ml de H₂O destilada

5) CHES (ácido sulfónico 2-N-cicloesilaminoetano) + NaCl 0,85%

100 mg de CHES en 100 ml de NaCl 0,85%

6) ALGINATO DE SODIO 0,12%

120 mg Alginato de Sodio (Sigma) en 100 ml de NaCl 0,85%

Llevar la Solución de Alginato de Sodio 1,3% a 0,12%:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1,3 \times X = 0,12\% \times 100$$

→ Alginato al 0,12% = Agregar 9,2 ml de sol. Alginato 1,3% + 90,8 ml de NaCl 0,85%.

7) CITRATO DE SODIO 0,05 M PH 7,4

Sigma: 71497 FW: 214,1

214,1 gr/lit → sol. 1 M

10,705 gr/lit → sol. 0,05 M

100ml: 1,0705 gr - 200ml: 2,141 gr

8) POLI-L-LISINA 0,05% (w/v)

50 mg de poli-L-lisina en 100 ml de PBS.

Preparación: Disolver poli-L-lisina en PBS con agitación magnética permanente.

Mantenición: A 4°C

Precauciones: Manipular con guantes. Esterilizar mediante filtración con filtro 0,22 μm

9) PBS / Solución D

10) MEDIO COMPLETO:

Medio DMEM/F12 suplementado con Suero bovino al 10% y Suero Fetal Bovino al 5%. Se agregó antibióticos (Cloranfenicol 1mg% + Cefotaxima 5mg%).

Procedimiento de Microencapsulación:

Teniendo las células creciendo en placas de cultivo, en primer lugar se desprenden tripsinización. La suspensión celular resultante de lava con Solución D por 2 veces, para luego centrifugar para precipitar células. Se resuspende posteriormente en Solución de Alginato Na 1,3% (a 4 °C). Luego, se toman alícuotas de la suspensión celular en Alginato de Na 1,3% en jeringas de insulina (1ml). Se gotea el contenido de la jeringa dentro de la solución de CaCl_2 al 1,1% con el fin de obtener microesferas rígidas. Es importante trabajar con las soluciones frías a 4°C, manteniendo luego cada frasco sobre hielo. Se aspira con pipeta 5 ml la solución CaCl_2 1.1% y se lavan las microesferas con 20 ml de Solución CHES 0,1%. Se repite el lavado con NaCl 0,85%, para luego revestir esferas con poli-L-lisina 0,05%, incubando por 6 minutos a T° ambiente. Lavar nuevamente con CHES 0,1% → CaCl_2 1,1% → NaCl 0,85%. Una vez cada solución. Para la segunda capa de Alginato se resuspenden nuevamente las esferas en Solución Alginato de Sodio pero ahora al 0,12%. Aspirar rápidamente el alginato y lavar con NaCl 0,85%. Rápidamente se debe tratar las microesferas con Citrato de Sodio 0,05M pH 7,4, evitando la disolución (con esto se busca quelar el exceso de alginato y dar el justo espesor a la membrana, y permitir una permeabilidad adecuada de la membrana.). El exceso de Citrato de remueve ahora con 2 lavados con NaCl 0,85%. Finalmente se cultivan con medio completo en cámara de cultivo.

4.12.2 Según el método alemán de Zimmermann (J Microencapsulation 2003; 20(5): 627-636)

4.12.2.1 ME BaCl₂

Materiales:

- 1) Medium Viscosity - Alginato 2% w/v (Sigma)
- 2) CLORURO DE BARIO BaCl₂ 20 Mm + CLORURO DE SODIO 0,9% (pH 7.0 – 290 mOsm)
- 3) HISTIDINA 5 mM
- 4) NaCl 0,9%
- 5) SULFATO DE SODIO Na₂SO₄

Preparación de Soluciones:

- 1) Medium Viscosity – Alginato:

Se pesan 2 gr de Alginato por 100 ml de agua destilada. Disolución en agitador magnético con calefactor. Esterilizar en autoclave y filtrar por filtro 0,2 µm

- 2) Cloruro de Bario 20 mM + 115 mM NaCl

PM BaCl₂ : 208,25 → grs. = PM x [] deseada (M) x volumen deseado (lts)

Grs = 208.25 x 0,02 x 0,05 = 0,20825 gr para 50 ml de agua destilada (conc. 20mM)

PM NaCl: 58,44 → grs= 58,44 x 0,115 x 0,05= 0,336 gr de NaCl para 50 ml de agua destilada (conc. 115 mM)

Pesar, disolver juntos, llevar a ph 7.0 utilizando solución de Histidina 5 mM.

- 3) Histidina 5 mM

PM: 209,63 → grs= 209,63 x 0,005 x 0,5= 0,524075 grs de Histidina para 50 ml de agua destilada (conc. 5 mM)

Esterilizar filtrando por Millipore 0,22 o 0,45 μm.

4) NaCl 0,9%

Pesar 0,9 gr para 100 ml de agua destilada.

Esterilizar filtrando por Millipore 0,22 o 0,45 μm.

5) Sulfato de Na:

PM: 142,05 → grs = 142,05 x 0.006 x 0,25= 0,213 grs de Na₂SO₄ para 250 ml de agua destilada. PH: 7.0

Esterilizar filtrando por Millipore 0,22 o 0,45 μm.

Procedimiento:

Teniendo el pellet de células lavadas con PBS, resuspender en MV – Alginato 2% a 4°C. El número de células dependerá de la línea utilizada $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ de céls/ml de alginato. Se gotea la suspensión celular en 30 ml de solución de BaCl₂ 20mM a 4°C. En falcon 45 ml (trabajar en hielo). Con osmolaridad ajustada previamente a 290 mOsm (con NaCl 115 mM) y pH 7.0 (ajustado con solución histidina 5 mM). Incubar por 3min a 37°C en Na₂SO₄ 6 mM. Lavar 3 veces con solución NaCl 0,9%. Incubar con medio de cultivo completo a 37°C en botellas de cultivo vertical.

4.12.2.2 ME CaCl₂

Por los resultados obtenidos se decidió modificar la microencapsulación APA. No se utilizó polilisina y se siguió los mismos pasos del método ME BaCl₂ pero utilizando CaCl₂ 20 1,1% por BaCl₂.

4.13 Evaluación y Comparación de Microesferas Alginato Calcio V/S Alginato Bario:

Se evalúan las microesferas en cuanto a:

- Diferencias de tamaño: Mediante fotografías digitalizadas.
- Resistencia a condiciones ambientales conocidas (soluciones de disolución de alginato conocidas: Citrato de Sodio 1%, Na₂CO₃ a pH 8.8 y 9.5, y EDTA 50 mM).
- Permeabilidad: Evaluado mediante la microencapsulación de albúmina y su recuperación en el medio de incubación.
- Recuperación de DNA para estudios de expresión génica mediante RT-PCR.

4.13.1 Estudio de permeabilidad en distintas microesferas:

4.13.1.1 Permeabilidad a Albúmina:

(J Pharm Pharmaceut Sci 2004; 7(3): 315-324)

Se realiza este método para determinar la permeabilidad de los dos tipos de microesferas. Es una comparación entre las microesferas.

Material:

BSA (Bovine Serum Albumin): 4 mg por ml de Alginato

Alginato de Na 1,3% y 2%

Procedimiento Experimento Permeabilidad:

- 1) Se prepara solución de alginato + albúmina.
- 2) 1 ml Alginato 1,5 % w/v + 4.00 mg de BSA (BSA/Alginato 26,6% w/w)
- 3) Continuar formación de Microesferas (ME) según método CaCl₂ o BaCl₂.
- 4) Las microesferas de Alginato-BSA son cultivadas en agua destilada.
- 5) Se toma igual número de ME en triplicado para cada condición experimental.
- 6) Se resuspenden en 5 ml de Agua Destilada y se centrifugan (shaker) a 150 rpm, 37 °C, por 24 hrs.

- 7) Se rescata en sobrenadante y se cuantifica la cantidad de Proteínas por método de Bradford.

4.13.1.2 Permeabilidad a Fosfatasa Alcalina

En este experimento se busca detectar la actividad de Fosfatasa Alcalina (FA) en el medio de incubación de Microesferas que contienen células SaOS₂ (Línea Tumoral Osteoblastoma secretora de Fosfatasa Alcalina). Este tipo celular secreta una forma soluble y otra insoluble de FA (en vesículas de exocitosis). La FA tiene un PM de 80-84 kDa aprox. La fracción insoluble no debería atravesar los poros de las microesferas. Pero para descartar esta posibilidad se midió la actividad total de las células microencapsuladas v/s la actividad en el medio condicionado (fracción soluble) y un control de células no ME en adhesión.

(Transp. Proc 1997; 29: 2129-2130)

Materiales:

- 1) Solución de pNPP (paranitrofenilfosfato – Sigma N° cat 104-40) 2 mg/ml (5mg/2500 µl) + TRIS-HCl 0.2 M pH 8.3. Preparar al momento del uso.
- 2) TRIS – HCl 0.2 M pH 8.3 a 4°C
- 3) NaOH 1N a T° ambiente
- 4) Línea SaOS₂
- 5) Medio de cultivo: RPMI sin Rojo Fenol.
- 6) pNP (pNitroFenol – Sigma N° cat 104-1) 10 µmol/ml en TRIS-HCl 0.2 M a pH 8.3 (es el producto de la hidrólisis del pNPP). Se utiliza para elaborar la curva estándar. Se conserva a -20°C en alícuotas de 500 µl.

- 7) Solución NaOH:TRIS-HCl 9:1. Mezclar 9 partes de NaOH 1N y una parte de TRIS-HCl 0.2 M a pH 8.3; preparar al momento del uso (30 a 50 ml según necesidad)

Procedimiento:

Curva estandar:

- 1) Diluir el pNP 10 $\mu\text{mol/ml}$ 200 μl a 2 ml con NaOH 1N para obtener solución 1 $\mu\text{mol/ml}$. Diluir esta solución con solución NaOH:TRIS 9:1 para obtener las concentraciones 0.5 – 0.25 – 0.1 – 0.05 – 0.025 – 0.01 – 0.005 (Se recomienda diluir 1 ml a 2 ml en el caso de dilución 1 a 2, y 1 ml a 2.5 ml en el caso de dilución 1:2.5)
- 2) Transferir 200 μl de cada punto de la curva a pocillos de la placa de 96 pocillos, en triplicado. El blanco corresponde a la solución NaOH:TRIS 9:1

Muestras:

- 1) Células SaOS₂ en adhesión. Tripsinizar, contar y tomar alícuota de medio condicionado.
- 2) Microencapsular, sembrar e incubar. Según las distintas condiciones.
- 3) Luego se lava el medio de cultivo con PBS (3 veces)
- 4) Se agrega el pNPP hasta cubrir las ME (300 μl). Por 45 minutos
- 5) Se rescata el sobrenadante (color amarillo) y se separa en alícuotas de 150 μl por triplicado en placa multiwell de 96 pocillos. Se agrega NaOH 1N.
- 6) Se lee absorbancia en lector de ELISA a 405 nm

	ALP	DNA
BaCl₂	1 x 10 ⁶ céls / 176 ME / 1,5 ml alginato	1 x 10 ⁶ céls / 176 ME / 1,5 ml alginato
Adhesión	1 x 10 ⁶ céls (308 x 10 ⁶)	1 x 10 ⁶ céls (308 x 10 ⁶)

NOTA: La línea SaOS₂ crece habitualmente en medio DMEM (Ca⁺² 1.8 mM). Para efectos de medición de actividad de FA por metodo colorimétrico no se puede utilizar Rojo Fenol. Además, se sabe que la secreción de FA aumenta en medio bajo en calcio. Por lo tanto, se utilizó RPMI 1640 sin Rojo Fenol.

Para esto se debió objetivar las condiciones de crecimiento y viabilidad frente a este cambio de medio.

Se cultivó la misma cantidad de células por triplicado con medio DMEM completo y con medio RPMI 1640 completo. A los 3 días se evaluó la viabilidad por Trypan blue.

Viabilidad a los 3 días de células SaOS₂ cultivadas en medio DMEM v/s RPMI 1640:

% Viabilidad DMEM 3d: 89%

% Viabilidad RPMI 1640 3d: 83%

Según el método estadístico de comparación de proporciones la diferencia no es significativa. Por lo tanto se utilizó el medio RPMI sin fojo fenol.

NOTA: El tamaño de las microesferas de alginato 2% es mayor que el de la MEs de 1,3% de aginato. Por lo tanto, se intentó normalizar según contenido de DNA. Por método espectrofotométrico con colorante Hoestch 33258

4.13.2 Pruebas De Disolución De Alginato (Evaluación de Resistencia y Estabilidad)

Se evaluará la capacidad de disolución de 3 Buffer de disolución de alginato: Citrato de Sodio 1%, Carbonato de Sodio 0.1 M a pH 8.8 y 9.5. Esto se objetivará mediante:

- la recuperabilidad de BSA de las ME-APA v/s ME-BaCl₂.
- La recuperación nucleotídica en proceso de extracción de RNA.

Buffers De Disolución:

1) CITRATO DE SODIO 1%

Pesar 1 gr de Citrato de Sodio por 100 ml de agua destilada.

2) CARBONATO DE SODIO 0,1 M pH 9,5

Sodium Carbonate – Sodium Bicarbonate pH: 9.2 – 10.8

$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MW: } 286.2$

Sol. 0,1 M : 28.62 gr/l

100 ml: 2.862 gr

$\text{NaHCO}_3 \rightarrow \text{MW: } 84$

Sol. 0,1 M: 8,4 gr/l

100 ml: 0,840 gr

pH	<i>Delory and King. BJ 1945; 39: 245</i>		
	20°C	37°C	
		X ml 0,1M Na ₂ CO ₃	X ml 0,1M NaHCO ₃
9,2	8,8	10	90
9,4	9,1	20	80
9,5	9,4	30	70
9,8	9,5	40	60

9,9	9,7	50	50
10,1	9,9	60	40
10,3	10,1	70	30
10,5	10,3	80	20
10,8	10,6	90	10

3) EDTA 5 mM

PM: 372,24 \rightarrow 372,2 x 0,005 x 0,04 = 0,744 gr de EDTA para 40 ml de agua destilada.

4) EDTA 50 mM

PM= 294.1 \rightarrow grs= 294.1 x 0.05 M x 0,5 lt = 7,35 grs de EDTA para 500 ml de agua destilada.

Procedimiento:

Se sometió a disolución del alginato las ME-APA, ME-BaCl₂ y ME CaCl₂ en las mismas condiciones para los 3 buffer de disolución.

Condiciones:

- 1) Las ME(s) se incubaron a 37 °C por 15 min y 1 hora.
- 2) Luego fueron centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm.
- 3) Se rescató el sobrenadante (en triplicado).

4.13.3 Recuperación de RNA desde las Microesferas

Los investigadores italianos tenían dificultad para estudiarla expresión génica de colagenasa en fibroblastos microencapsulados. Para continuar la caracterización de las microesferas se diseñó un método de recuperación de RNA sin necesidad de recuperar las células.

Se estableció un método de congelación-homogenización en presencia de inhibidores de RNasa, Guanidina Tiocianato (GITC) y Guanidina Clorhidrato(GuCl).

Materiales:

1) Nitrógeno Líquido

2) Agitador magnético (Tissue Lyser ®)

3) Solución Guanidina Clorhidrato:

- 4 M GuCl / 50 mM TRIS, pH: 7.5

- preparación:

25 ml → 9,5 gr de Guanidina Clorhidrato

150 mg TRIS

Ajustar a pH 7.5

4) Solución Guanidina Tiocianato:

- 4M GITC / 50 mM TRIS, pH 7.5

- preparación:

25 ml → 11,82 gr de Guanidina Tiocianato

150 mg TRIS

Ajustar pH 7.5

En este protocolo no es necesario agregar detergentes (SDS o Sarcosyl) ya que las muestras son congeladas.

Todo el material debe ser estéril y libre de RNAsas.

Procedimiento:

- Colocar las microesferas en criotubos de 1,5 ml
- Congelar por inmersión en Nitrógeno líquido
- Mantener a – 80 °C

- Homogenizar (mortero y agitador magnético)
- Descongelar a temperatura ambiente en presencia de Buffer GuCl por 10 min.
- Transferir a criotubos de 1,5-2,0 ml por pipeteo. Cortar punta de Tip (p1000)
- Dar un pulso de centrifugación. Con el sobrenadante rescatar el tejido restante en el criotubo de lisis
- Agitación en Vortex a 4 °C por 30 minutos
- Centrifugar a 4°C, 15.000 g por 10 min.
- Rescatar sobrenadante en un eppendorf (1). En caso de método GuCl, en este punto las muestras son congeladas a -80°C.
- Luego el pellet se debe vortexear nuevamente a 4°C por 5 min en presencia de 0,25-0,5 ml de Buffer GITC
- Centrifugar a 4°C, 21.000 g por 10 min.
- Rescatar sobrenadante en eppendorf (2)
- Congelar a - 80°C

Se realizó el protocolo en dos etapas GuCl + GITC (denominado GITC) y extracción en una sola etapa con GuCl exclusivamente (denominado GuCl)

Para la extracción final de RNA se utilizaron capachos de silica-gel (Qiagen – RNAeasy ®). Las muestras descongeladas fueron centrifugadas a través de estos capachos y procesadas inmediatamente para PCR de B-actina

4.13.4 PCR β -actina

El método de PCR para β -actina fue llevado a cabo por la Bqca. Alessia Gozzini en Florencia – Italia según el protocolo descrito en (*Masi L y cols 2002 J Reumathol*). Se realizó la amplificación de 174 pb de β -actina.

4.14 Determinación de PTH intacta plasmática en pacientes trasplantados

En todos los casos se utilizó el mismo kit de determinación de PTH intacta (Immulate – DPC – LA, California). Se trata de un ensayo secuencial inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida. Este kit tiene un límite de detección de 2.500 pg/ml y una sensibilidad de 3 pg/ml. La Variabilidad Intraensayo es de 3.6 pg/ml dentro de rangos normales, y la Variabilidad Interensayo es de 5.1 pg/ml. No existen datos del fabricante de Variabilidad Interensayo en rangos bajo lo normal.

4.15 Análisis Estadístico:

Se presentarán los valores como promedio +/- SD (desviación estandar) de las distintas situaciones experimentales. Para determinar si existe 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 utilizará un valor de $p < 0,05$ como significativo.

5. RESULTADOS:

En base a los objetivos planteados se logró obtener para este proyecto, tejido paratiroideo de pacientes con hiperparatiroidismo secundario a insuficiencia renal (5 casos - > de 1 glándula por cada paciente) e Hiperparatiroidismo primario (10 casos). De esta forma se realizaron 15 cultivos primarios de tejido paratiroideo según el protocolo descrito. Algunas de las glándulas de pacientes insuficientes renales (hiperplasia) fueron criopreservadas.

Los pacientes con hiperparatiroidismo tenían en promedio 48 +/- 12 años . Se confirmó la naturaleza benigna de la lesión por biopsia rápida intraoperatoria y biopsia definitiva (Servicio de Anatomía Patológica HCUCH).

Los pacientes con HPT 1rio presentaron Adenoma único en 8 casos e Hiperplasia de 4 glándulas en 2 casos, que correspondía a pacientes con neoplasia endocrina múltiple tipo I.

Se rechazó sólo un paciente insuficiente renal con antecedentes de infección por Virus Hepatitis C.

Todos los pacientes en Hemodialisis (100% de los insuficientes renales operados) tenían controles periódicos de VHB, VHC, CMV y VIH.

5.1 Cultivos Primarios de Paratiroides:

5.1.1 Seguimiento morfológico (microscopía de contraste de fase)

El comportamiento habitual de los cultivos primarios fue el de un crecimiento a confluencia total (a los 40 días aprox.), con características de células epiteliales cúbicas, en que sobrevino el crecimiento de fibroblastos a partir de los 100 días de cultivo. En estos cultivos primarios se logró establecer líneas primarias con 2 y 3 subcultivos. (Fig. 1)

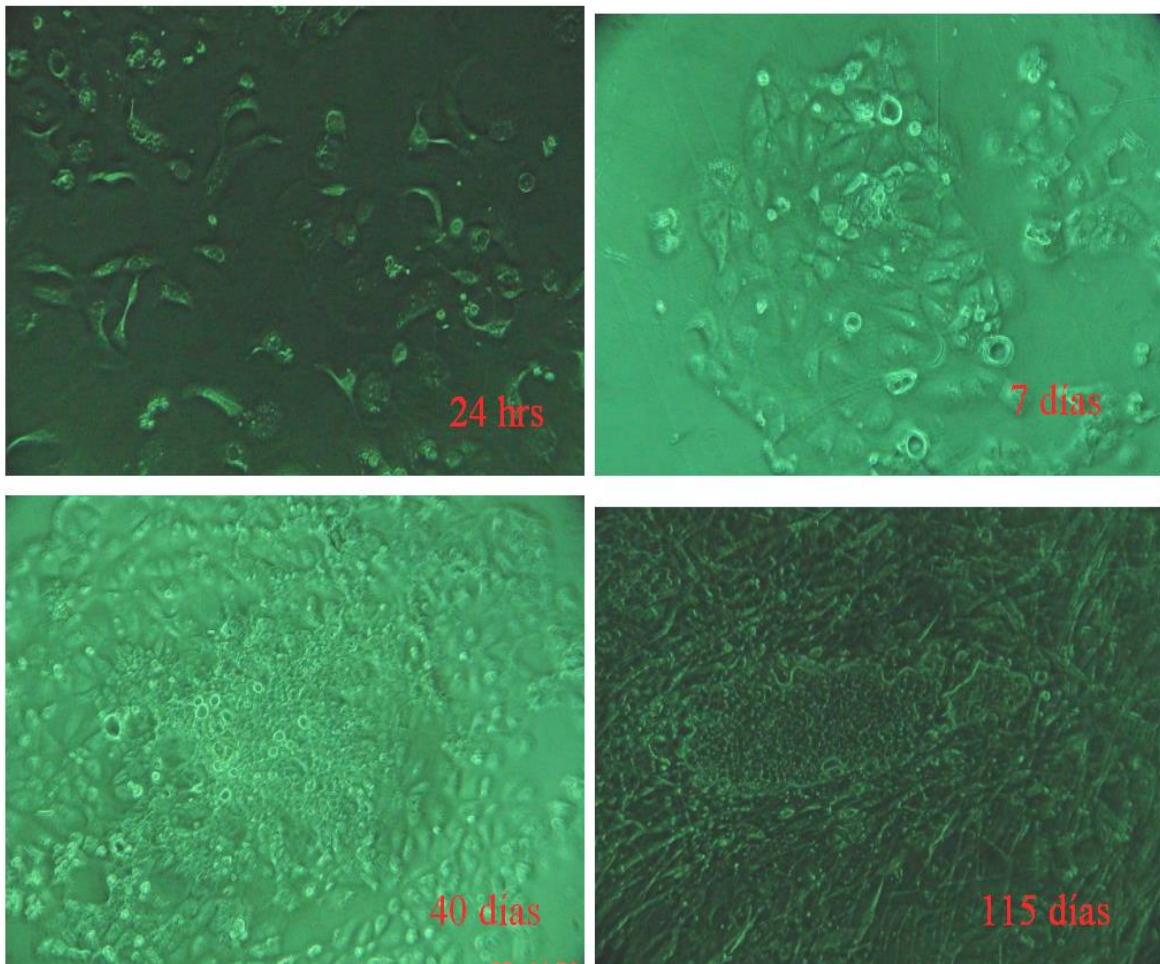


Fig. 1 Microscopía de contraste de fases de cultivo primarios de Paratiroides Humana. Morfología característica de células epiteliales. Se observó sobrecrecimiento de fibroblastos sobre los 100 días. Aumento 10X.

5.1.2 Seguimiento funcional

Se realizó medición de PTH por Quimioluminiscencia (kit Immulite DPC) (a largo plazo, controles semanales) (en 7 líneas primarias)

En las líneas primarias obtenidas se evaluó la presencia de PTH en el medio de cultivo. Así se detectó PTH en niveles elevados (> 2.500 pg/ml) en el medio de cultivos de mantención (hasta 3 días) de las 7 primeras líneas celulares de paratiroides humana obtenidas. (Fig. 2)

	DIAS	SUBCULTIVOS	Fx ENDOCRINA
I			
II	115 días	3	PTH +
IIIa			
IIIb			
IV	105 días	2	PTH +
V			
VI	96 días	2	PTH +
VII	60 días	1	PTH +

Fig. 2 Medición de Paratorhormona Humana por Inmunometría Quimioluminiscente en fase sólida (Immulite – DPC / LA, California) en el medio condicionado de líneas primarias de paratiroides humana. Se realizó un control semanal hasta la senescencia del cultivo.

5.1.3 Detección Inmunohistoquímica de PTH humana en células en cultivo primario.

Además de la medición de PTH en el medio se realizó tinción inmunohistoquímica de células de paratiroides humana en cultivos primarios (cultivo PTH número 14). A los 3 meses de cultivo se observa un patrón granular característico. Esto fue utilizado como patrón de control positivo para experimentos posteriores. (Fig. 3)

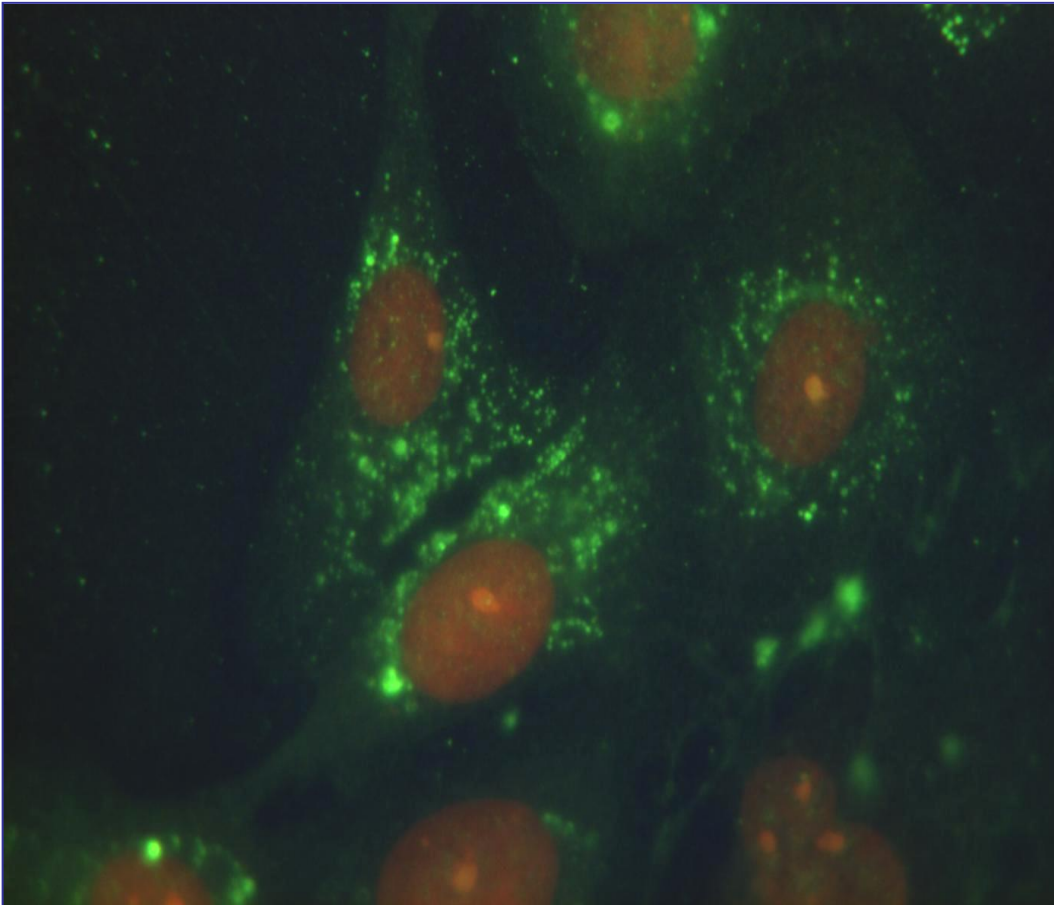


Fig. 3. Tinción InmunoHistoquímica en células de paratiroides humana en cultivo primario. Anti PTH humana (goat / 1:100) Santa Cruz. IgG antigoat biotinilado – Avidita FITC. Tinción nuclear con propidio de Etidio

5.1.4 Curva respuesta a calcio extracelular (en tres líneas primarias)

Otra forma de evaluar la funcionalidad de las líneas celulares obtenidas fue cuantificando la secreción de PTH en el medio a distintas concentraciones de calcio extracelular. Se logró obtener un patrón similar en 3 de las líneas primarias obtenidas, en que se evidencia una disminución de la secreción de PTH frente a concentraciones en aumento de calcio extracelular. Este experimento no fue normalizado (por cantidad de células o mg de proteínas totales), por lo tanto las curvas no son comparables, sólo se puede hacer notar la tendencia de cada curva. La medición de PTH se realizó gracias a la donación del kit DPC Immulite por Clinitest S.A.

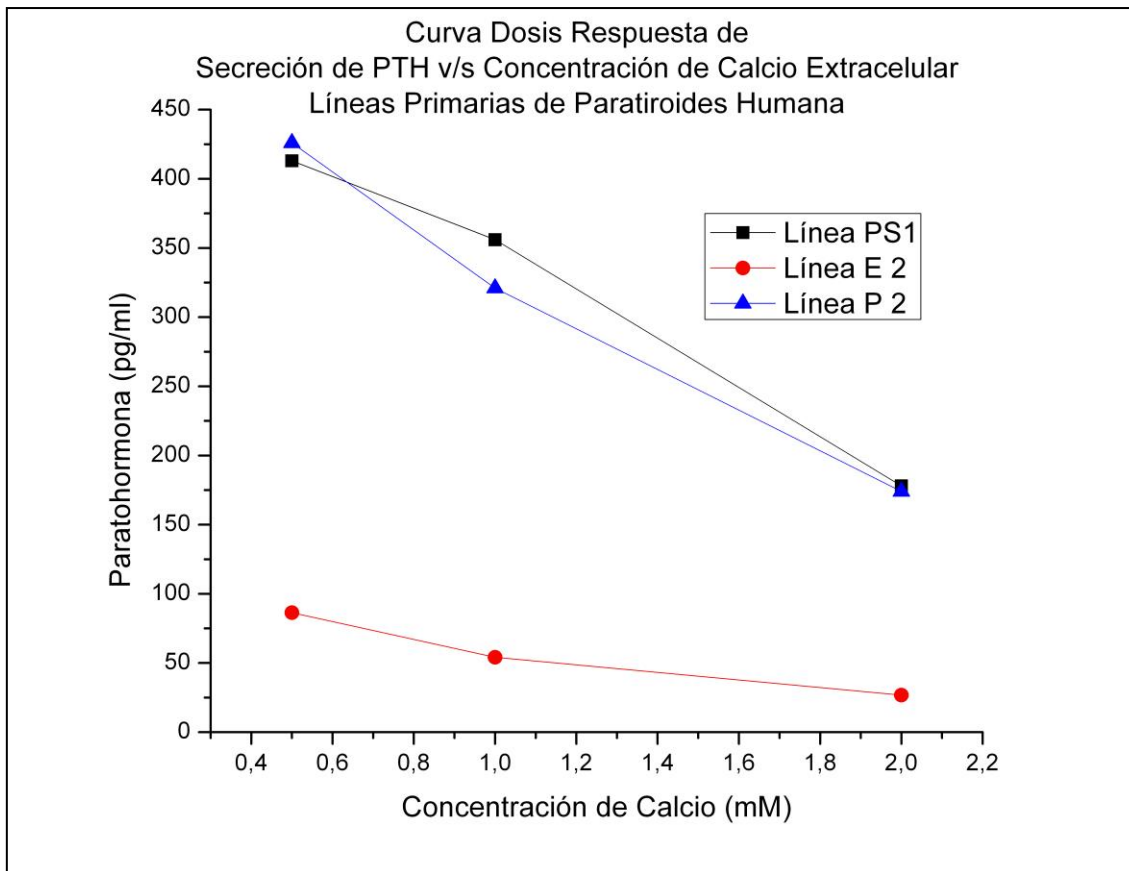


Fig. 4. Comportamiento funcional de los cultivos primarios de Paratiroides Humana. Medición de PTH intacta con kit Immulite (DPC). Líneas con 3 subcultivos y hasta 150 días de cultivo.

5.2 Establecimiento de línea celular (RCPTH):

5.2.1 Seguimiento morfológico (microscopía de contraste de fase)

Para cumplir los objetivos ya enunciados, en cuanto a optimizar las condiciones de cultivo de paratiroides humana y así prolongar el tiempo de duración de los cultivos celulares, se llevó a cabo un protocolo de inmortalización de células de paratiroides humanas con el método de *Caviedes y cols.* Este protocolo de inmortalización se realizó en líneas primarias distintas a las evaluadas previamente.

De las líneas en las que se estableció el protocolo de inmortalización (8/15), una destacó por el seguimiento morfológico, en que no hubo sobrecrecimiento fibroblástico, como se observa en la figura 5. Las otras líneas presentaron un comportamiento similar a las del grupo sin medio UCHT1.

Hubo un crecimiento en monocapa con inhibición por contacto, por más de 200 días de cultivo. Esto se reproduce en igual condición por más de 100 subcultivos.

La línea continua de paratiroides humana establecida exitosamente corresponde a tejido paratiroideo obtenido de un paciente masculino de 38 años de edad con diagnóstico de hiperparatiroidismo primario, biopsia definitiva confirma un diagnóstico de adenoma. La línea se denominó *línea RCPTH* (según normas de patentamiento del laboratorio).

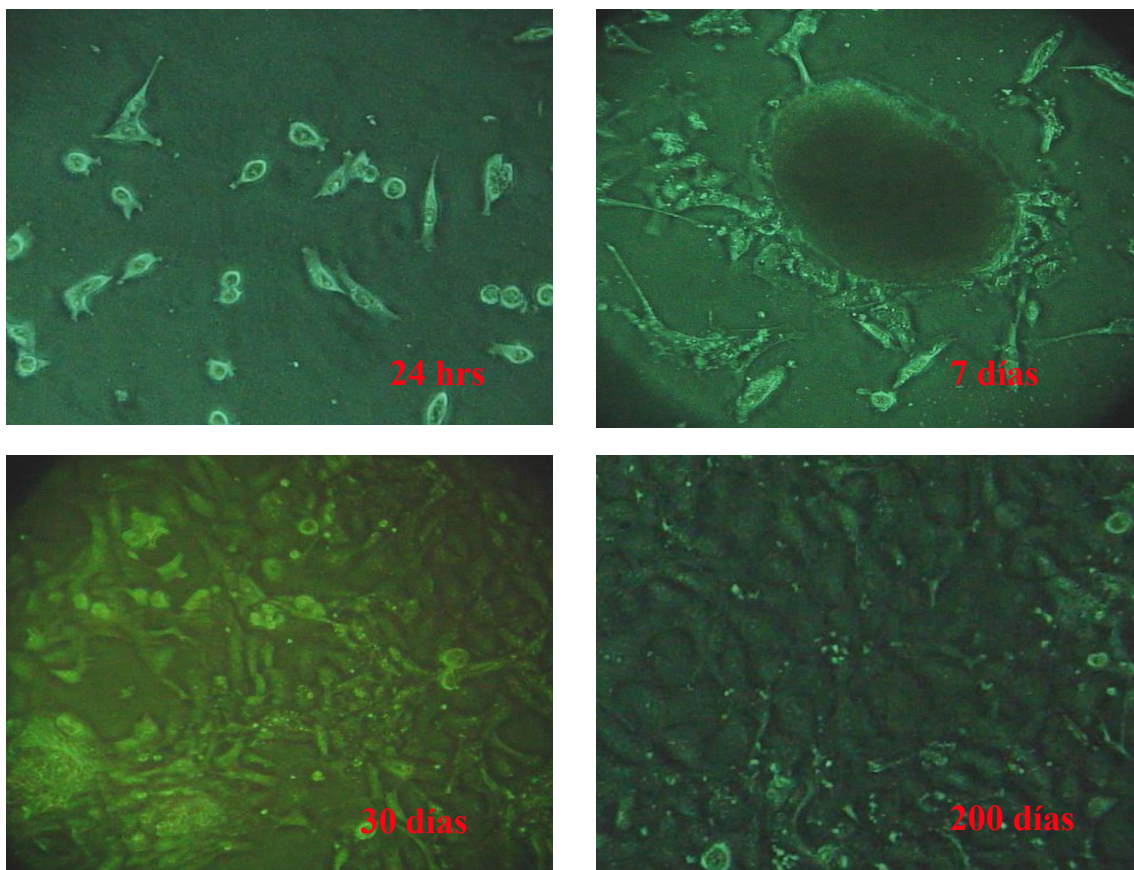


Fig. 5. Microscopía de contraste de fases de línea continua de Paratiroides Humana. RCPTH. Morfología característica de células epiteliales. No hay presencia de fibroblastos. Aumento 10X.

5.2.2 Curva de crecimiento

Al evaluar la curva de crecimiento de la línea continua obtenida se observa un crecimiento exponencial sin senescencia, característico de las líneas continuas. (Fig. 6)

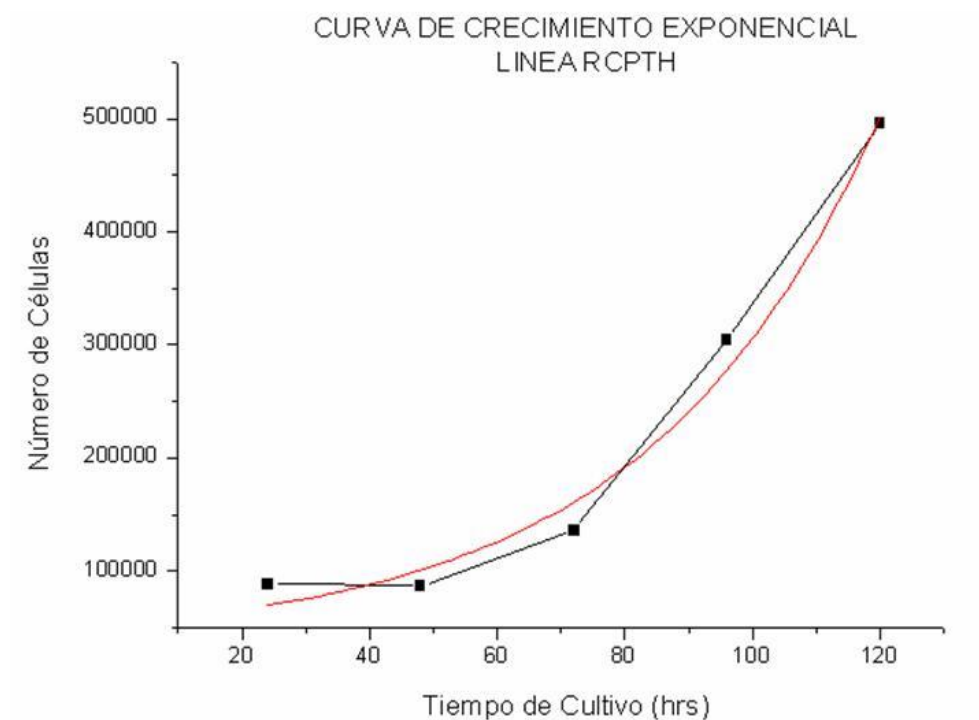


Fig. 6. Curva de Crecimiento de línea RCPTH. Se observa crecimiento exponencial sin senescencia.

5.2.3 Tiempo de Duplicación

El tiempo de duplicación fue certificado por dos métodos (descritos). Se concluye como el tiempo en que se duplica la cantidad de células en cultivo en 30 hrs.

5.2.4 Densidad de saturación

La densidad de saturación se confirmó en experimento en quintuplicado, siendo la densidad de placa promedio de 123.499 ± 7.336 céls/cm².

5.2.5 Tinción de la Reacción del Ácido Per-Iódico de Schiff (PAS)

En el organismo humano existen sólo cuatro tipos celulares que almacenan Glicógeno (músculo, riñón, hígado y paratiroides), por lo tanto, se realizó una tinción de PAS en cultivos celulares en adhesión. Como control positivo se utilizó la línea Gershenson (hepatocitos de rata). Ambas líneas celulares resultaron positivas para esta tinción. En las placas de la línea celular RCPTH se encontraron células que no resultaron positivas, que actuaron como control interno negativo. (Fig. 7) Estos distintos tipos celulares puede dar cuenta de la presencia de distintas poblaciones en la línea celular RCPTH (céls. oxifílicas, principales y claras).

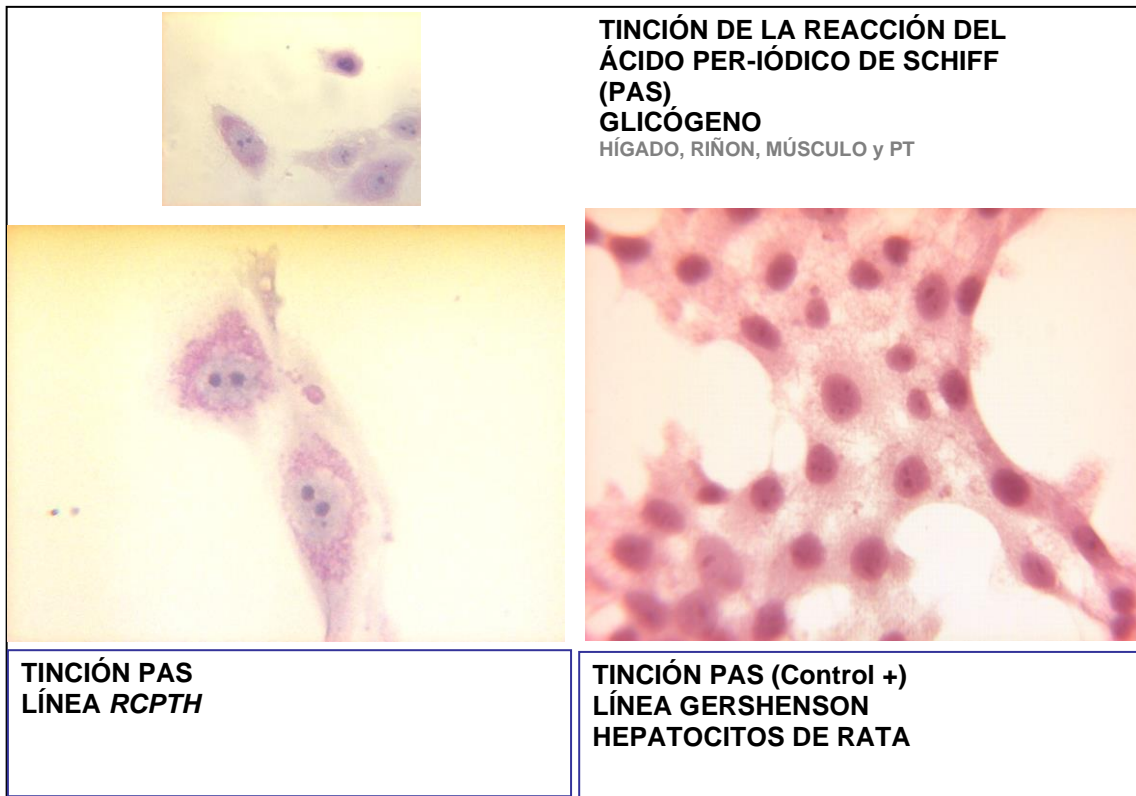


Fig. 7. Tinción de la Reacción de Ácido Periódico de Schiff (PAS). Se observa la tinción de glicógeno almacenado en el citoplasma celular. A la derecha se observa la línea de hepatocitos de rata (Gershenson) como control positivo. 40X

5.2.6 Inmunohistoquímica (PTH, CaSR)

Para certificar que las células en crecimiento correspondieran a tejido paratiroideo funcional se realizó tinción de inmunohistoquímica para PTH humana y Receptor de Calcio Sensible (CaSR).

En la inmunohistoquímica anti PTH se observa el característico patrón granular citoplasmático observado en las líneas primarias (Fig. 8a). Llamó la atención la presencia

de células negativas para esta tinción (control interno negativo), que pueden corresponder a células oxífilas o células claras.

La tinción para CaSR presenta un patrón característico de membrana. No se logró realizar esta tinción en líneas primarias de PTH ya que estas presentaron senescencia antes de obtener el anticuerpo.

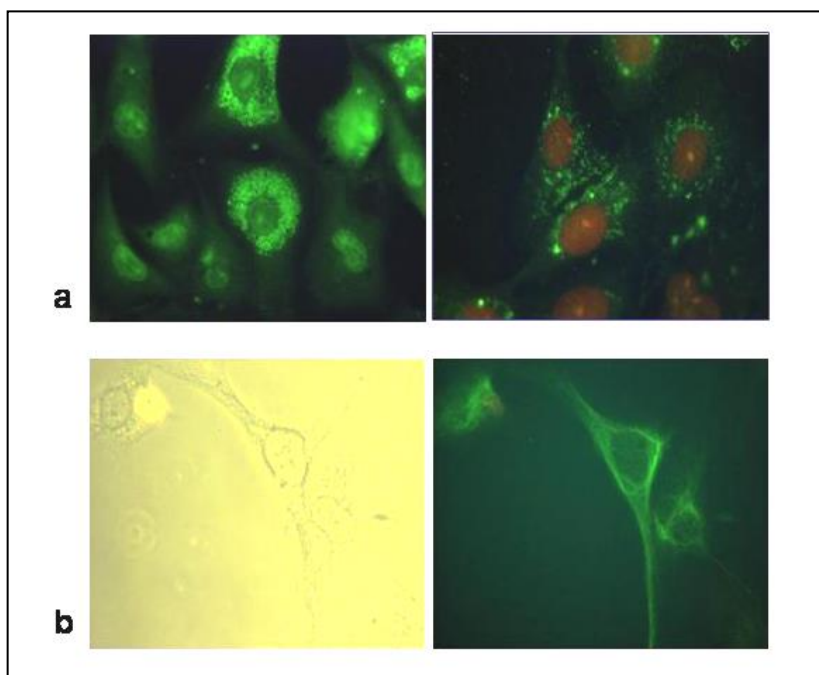


Fig. 8. Tinción Inmunohistoquímica. a) PTH: a la izquierda se observa la tinción positiva para PTH de Línea celular RCPTH. Llama la atención presencia de células negativas (células oxífilas, claras). A la derecha se presenta el control positivo de líneas primarias de paratiroides humana. b) CaSR: Tinción positiva para receptor de calcio sensible en células RCPTH. 40X

5.2.7 Curva Dosis Respuesta PTH v/s Calcio extracelular (PTH por RIA)

Una vez certificada la naturaleza de las células en cultivo, vale decir, células productoras de PTH humana y con expresión del receptor CaSR en la membrana, se procedió a evaluar la

funcionalidad de las mismas. Para ello se midió la concentración de PTH en el medio (PTH secretada) frente a distintas concentraciones de calcio extracelular. Es así como a las 2 hrs. de incubación por cada condición se obtuvo los valores representados en el siguiente gráfico. Normalizados por cantidad de proteínas por placa (Fig 9).

Realizando una regresión lineal con el Software *Origin 7.0 pro*, se obtuvo la curva de tendencia (en rojo), que demuestra que a mayor concentración de calcio extracelular, menor es la secreción de PTH en el medio.

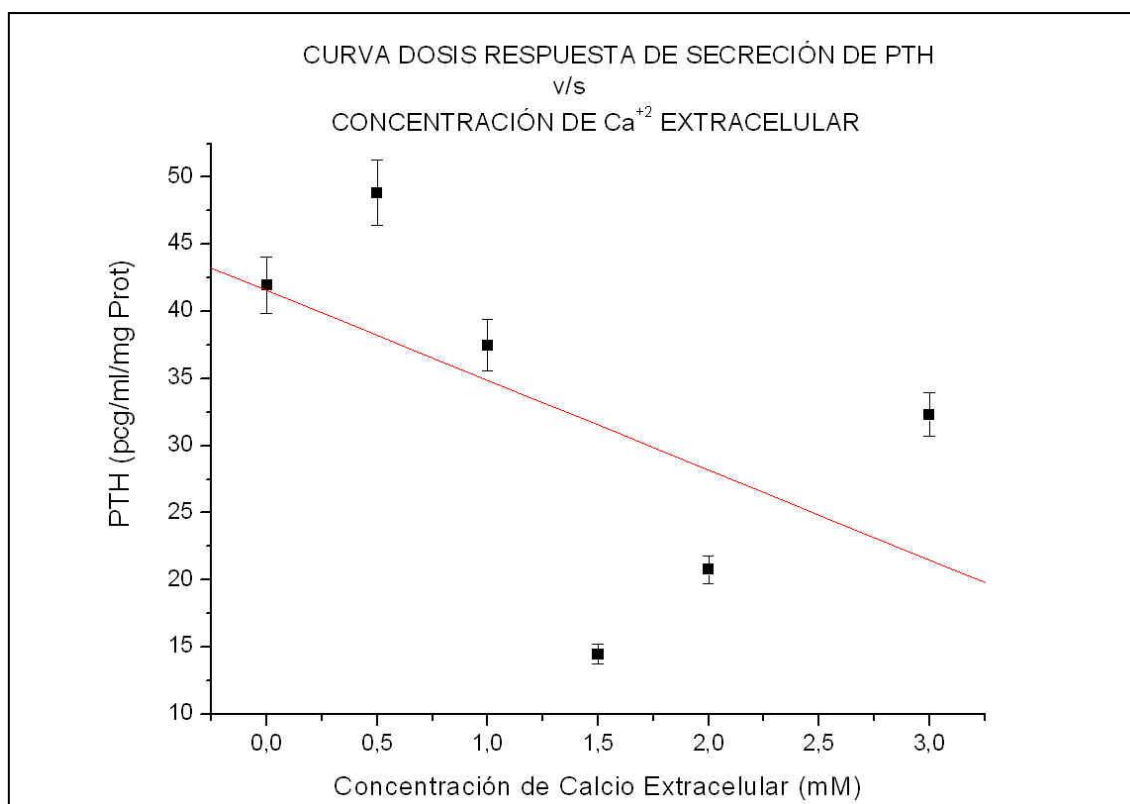


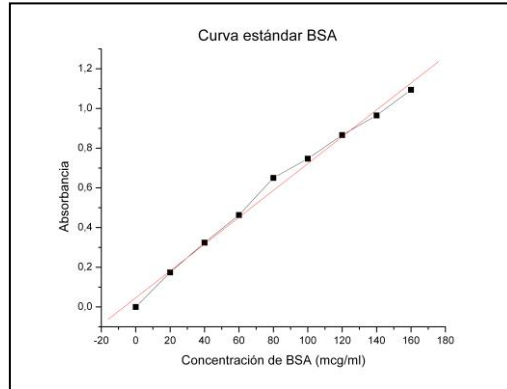
Fig. 9. Curva dosis/respuesta de secreción de PTH v/s concentración de calcio en el medio extracelular, Línea RCPTH. Normalizado por mg de proteínas. (n=2)

5.2.8 Curva Estándar de BSA. Cuantificado según método de Bradford

Mcg de proteínas	Absorbancia
0	0
20	0,174

40	0,324
60	0,463
80	0,650
100	0,747
120	0,866
140	0,965
160	1,094

Ecuación de la recta: $Y = 0.046 + 0.007 * X$
0.995



R=

Con lo anterior, damos cuenta de los primeros objetivos del proyecto. Es decir, cultivos duraderos, que producen y secretan PTH, y que responde a los niveles de calcio extracelular a largo plazo.

5.2.9 Crecimiento en Agar Blando

Otra forma de caracterizar esta línea celular fue evaluar su naturaleza tumorigénica. Esta característica se evidencia mediante la observación morfocinética (inhibición por contacto), la proliferación celular al sembrar en geles de agar blando (independiente de anclaje) y el comportamiento en el injerto en ratas atímicas (nude mice). Este último experimento no se pudo realizar por problemas de costo, y la no existencia de una colonia de estos animales en el país.

Al permitir el crecimiento de la línea RCPTH en agar blando por 21 días, no se observó el desarrollo de colonias celulares. Como control positivo se utilizó una línea celular tumorigénica, *Hep-2* (carcinoma epidermoide laríngeo), donde sí se observó formación de colonias (aprox. 3 colonias por placa). Este experimento se realizó en duplicado en forma consecutiva. Se certificó la vitalidad de las células mediante tinción de azul tripán (Fig. 10).

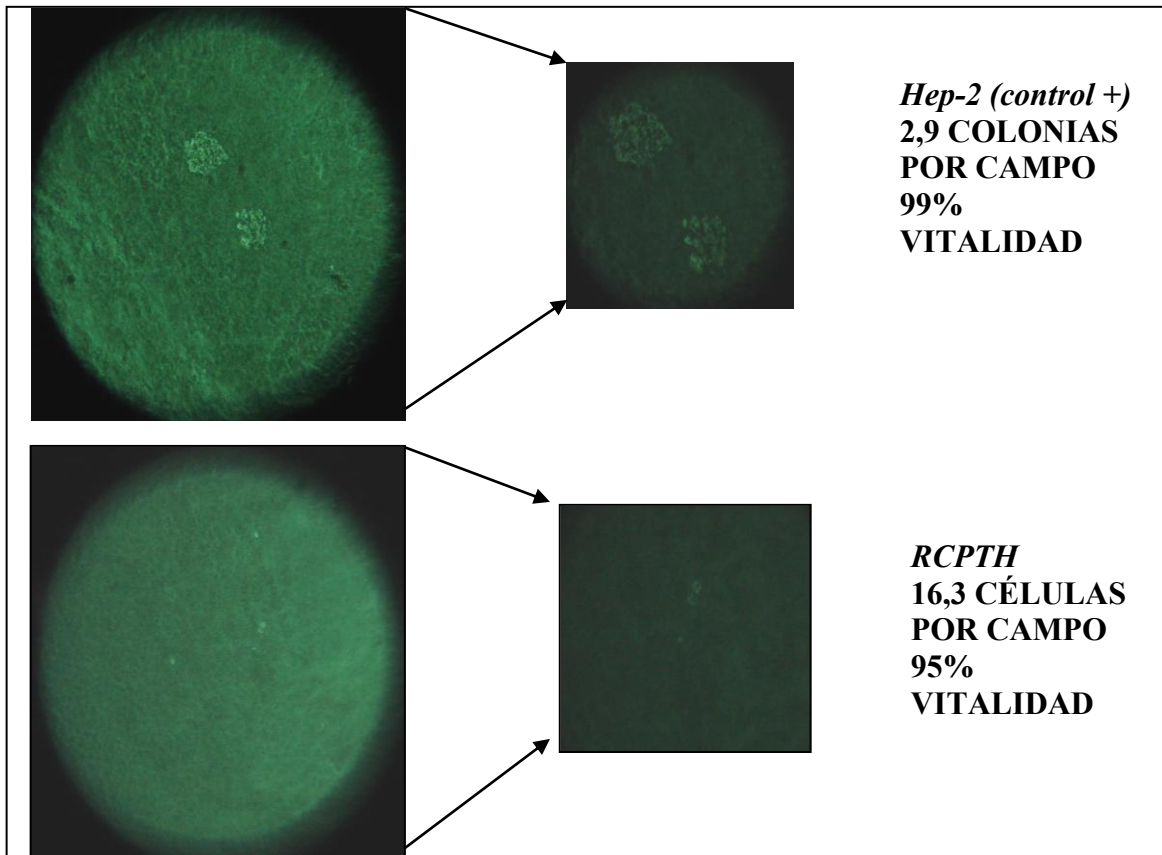


Fig. 10. Crecimiento de línea celular RCPTH en Agar Blando. No se observó formación de colonias en 21 días de observación. En el control positivo con línea Hep-2 se observó la presencia de 2,9 colonias por campo. 10X

5.3 Cocultivo y exposición al medio condicionado de Línea celular RCGH:

Como tercer objetivo del proyecto se planteó evaluar el efecto paracrino de células nodriza, en este caso células de granulosa humana inmortalizadas por la misma técnica (línea RCGH).

5.3.1 Curvas de Crecimiento

Se evaluó las curvas de crecimiento de la línea celular RCPTH con o sin exposición al medio de cultivo condicionado por la línea RCGH.

Se observa igual tasa de crecimiento durante las primeras 100 hrs. Luego existe una leve diferencia con mayor crecimiento frente a la presencia del medio condicionado de RGCH (Fig.11).

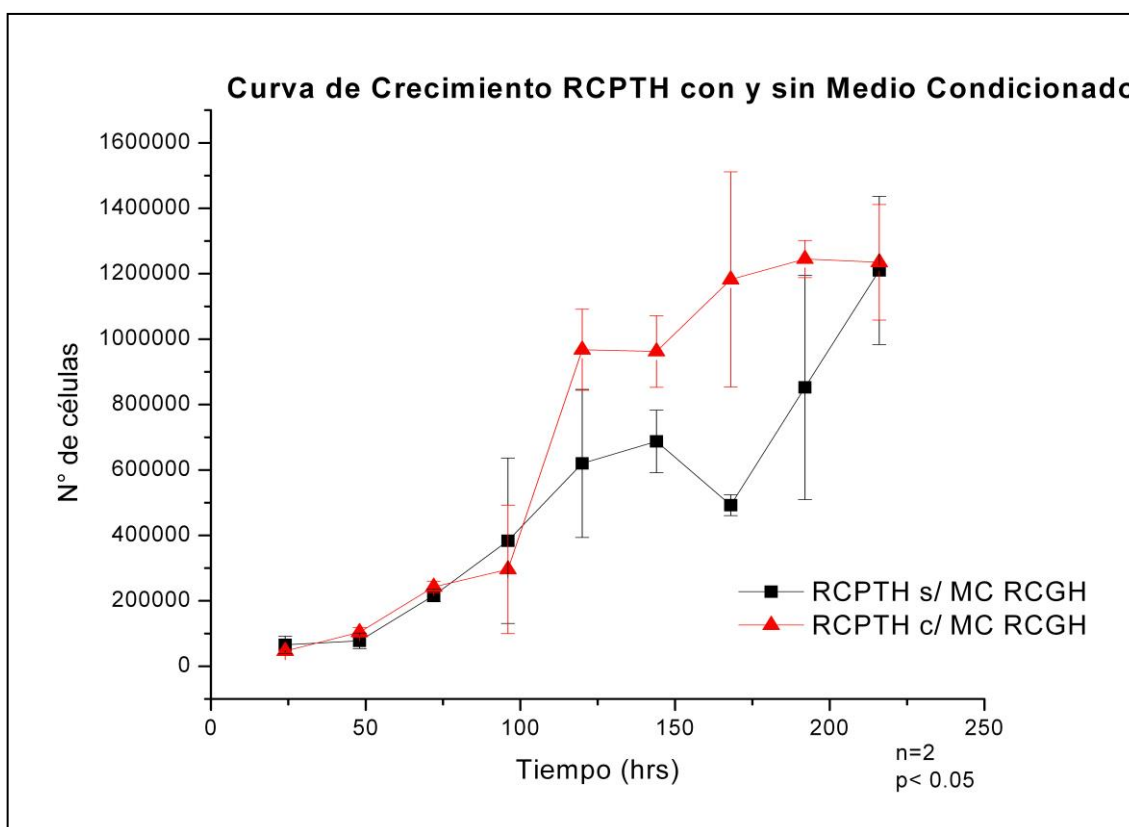


Fig. 11. Curva de Crecimiento de Línea RCPTH con y sin exposición al Medio Condicionado de la línea continua de granulosa humana (RCGH).

5.3.2 Tiempo de Duplicación

Para evaluar con mayor detalle el efecto del medio condicionado de RCGH sobre las células RCPTH se consideró sólo las primeras horas (24 – 96 hrs). En este experimento se logró evidenciar una diferencia significativa del tiempo de duplicación, siendo mayor en la línea RCPTH sometida a la exposición a medio condicionado de RCGH. La diferencia es

estadísticamente significativa hasta las 72 hrs ($p < 0,01$ / $n=3$). El efecto pareciera ir disminuyendo en el tiempo (Fig. 12)

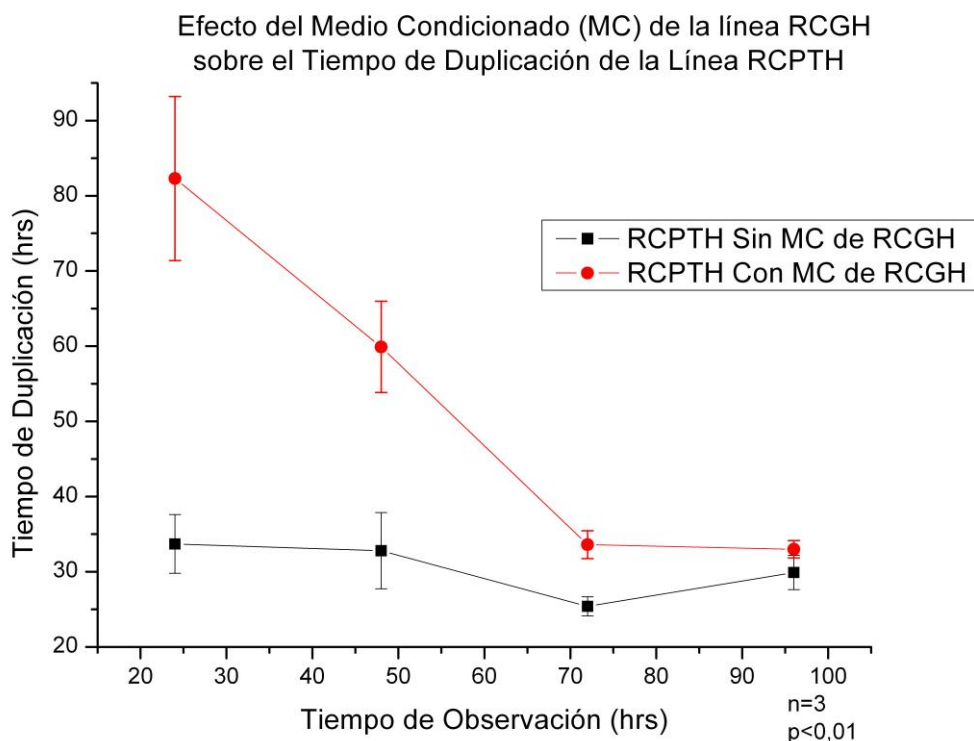


Fig. 12. Tiempo de duplicación de la línea RCPTH con y sin exposición al medio condicionado de la línea RCGH. La curva inferior muestra el comportamiento habitual de la línea RCPTH (TD promedio de 30 hrs). ($n=3$ / $p < 0.05$)

5.3.3 Incorporación de BrDU

Hasta ahora hemos visto que el efecto del medio condicionado de la línea RCGH aumenta el tiempo de duplicación en las células de paratiroides humana. Esto se corroboró estudiando el porcentaje de células que incorporan BrDU, traduciendo que este aumento del TD es por disminución de la proliferación (Fig.13)

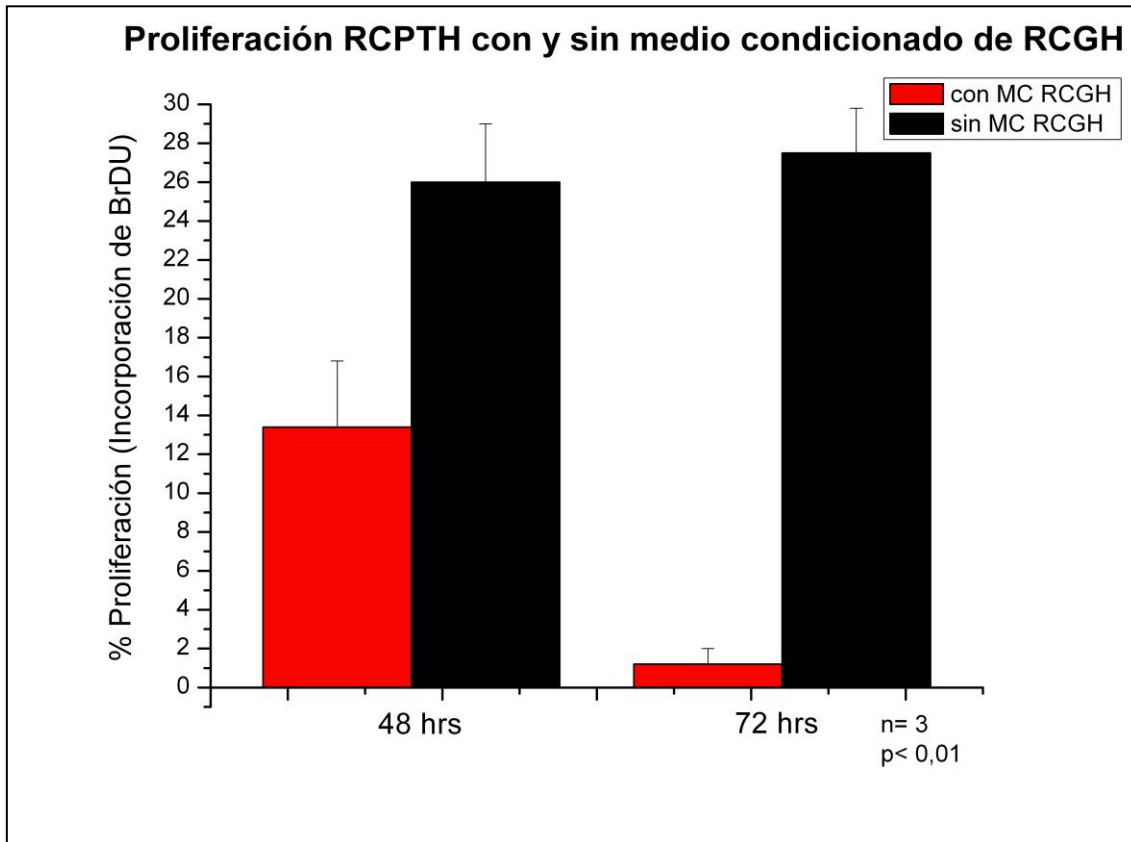


Fig. 13. Proliferación de línea RCPTH con y sin exposición al medio condicionado de línea RCGH. La exposición al medio condicionado de RCGH disminuye significativamente la proliferación de la línea RCPTH.

5.3.4 Curva Dosis Respuesta PTH v/s Calcio (ELISA PTH vencido)

Para continuar evaluando el efecto de las proteínas secretadas por la línea RCGH, sobre las células RCPTH se realizó un experimento en que se expuso las células RCPTH a distintas concentraciones de calcio extracelular con o sin medio condicionado de RCGH. Además se preparó una condición de cocultivo con RCGH para crear un ambiente en que perdurara el nivel de factores secretados en el medio.

Lamentablemente el kit de ELISA PTH que adquirimos en el laboratorio estaba vencido por 5 meses al tiempo de la compra. La empresa no respondió por esta situación.

Los resultados fueron normalizados por el número de células en cada placa. El único resultado rescatable es que la secreción de PTH persiste tras múltiples subcultivos, y que la

secreción de PTH podría ser algo mayor en la condición de cocultivo por el estímulo permanente (Fig. 14)

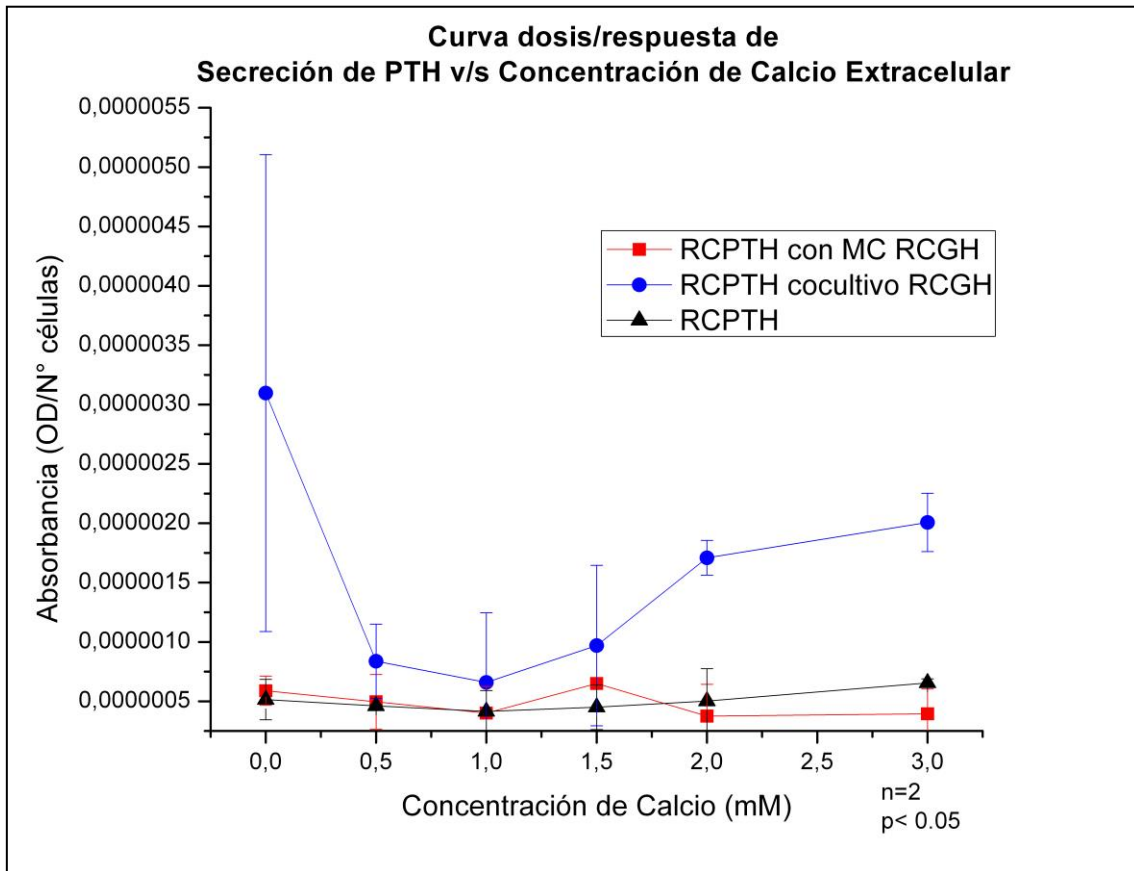


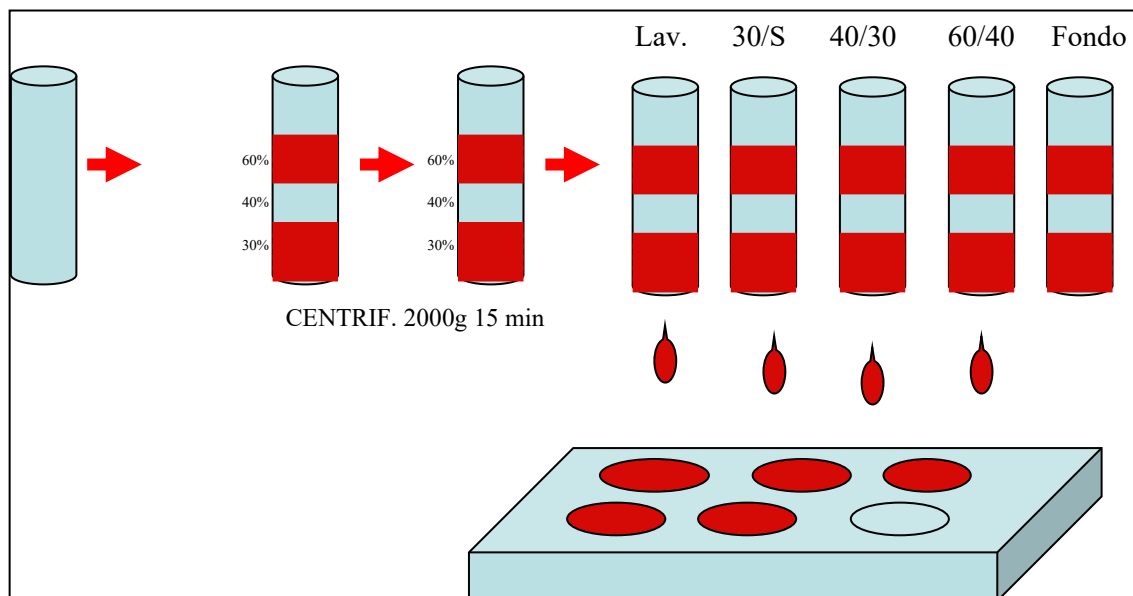
Fig. 14. Curva Dosis/Respuesta de Secreción de PTH v/s Concentración de Calcio Extracelular. Se compara la respuesta secretoria de RCPTH con o sin medio condicionado de RCGH y en condición de cocultivo con RCGH. Kit ELISA Biosource N° cat. KAQ1481 vencido en Junio de 2006)

5.4 Separación en gradientes de Percoll®

5.4.1 Gradiente discontinua - cultivo primario paratiroides

Hasta ahora tenemos una línea continua de PTs Humana que mantiene su función endocrina a largo plazo, pero existen distintas poblaciones celulares (PTH (+)/(-), PAS (+)/(-)). Es por

esto que, como parte de los objetivos de la tesis, se estableció la técnica de separación celular en gradientes de Percoll. Con esto se busca separar los tipos celulares de la glándula paratiroides para obtener una población celular con mayor proporción de células productoras de PTH (principales). En esta prueba se utilizó una gradiente discontinua con distintas concentraciones de Percoll (30 – 40 – 60%). Previo a esto se realizó el cultivo primario número 64 (en el laboratorio de Florencia – Italia), obteniendo células de paratiroides en monocapa que luego fueron tripsinizadas y depositadas sobre el Percoll. Luego de la centrifugación se cosecharon las células por aspiración suave desde la interfase de cada concentración (preparadas con distintos colores para su identificación). (Esquema 1)



Esquema 1. Planificación de Separación en Gradiente de Percoll Discontinuo. Experimento realizado en Florencia – Italia.

Una vez rescatadas las células de cada interfase se mantuvieron en cultivo para su seguimiento bajo microscopía de contraste de fases. Se observó mayor vitalidad y crecimiento celular en la interfase de la fracción celular rescatada del fondo del tubo de separación (Fig. 15)

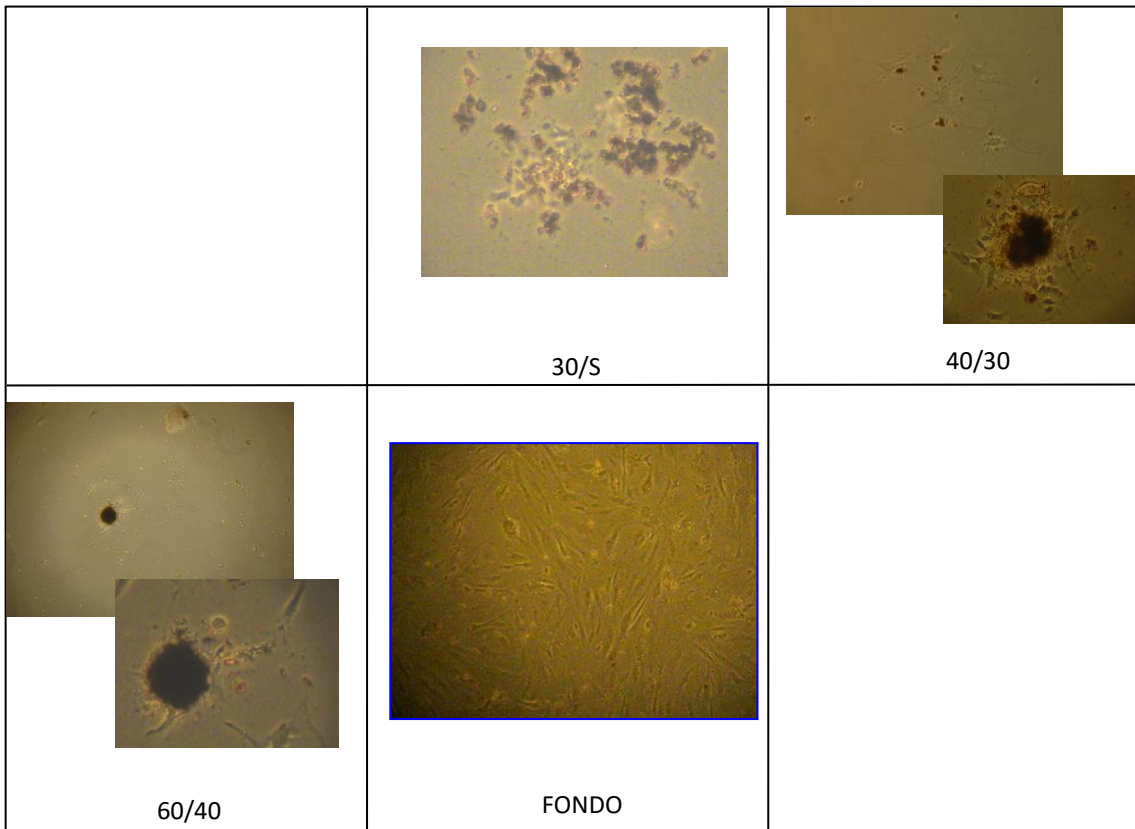


Fig. 15. Cultivos Celulares en adhesión de fracciones rescatadas de separación por gradiente discontinuo de percoll (30 – 40 y 60%). Se observa mayor número de células y mayor vitalidad en la fracción del fondo.

5.4.2 Gradiente discontinua - línea celular RCPTH

Una vez establecido el método en Chile, se diseñó las distintas fases del gradiente según la fórmula descrita. De esta forma se intentó separar y obtener el mayor número de células vitales y principales en la fase de 1.035 – 1.055 gr/dl según lo descrito por *Rudberg y cols.*

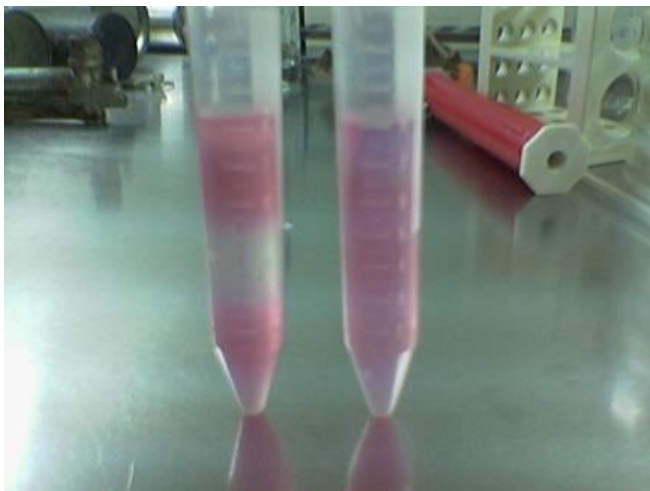


Imagen 1. Se observan 2 tubos Falcon de 15 ml con Percoll ®. A la izquierda se reconocen distintas fases (preparación con y sin rojo fenol).

La mayor cantidad de células se recuperó en la fase 1.035 – 1.055 gr/dl (71%). La vitalidad en las tres fases fue similar. (Fig. 16)

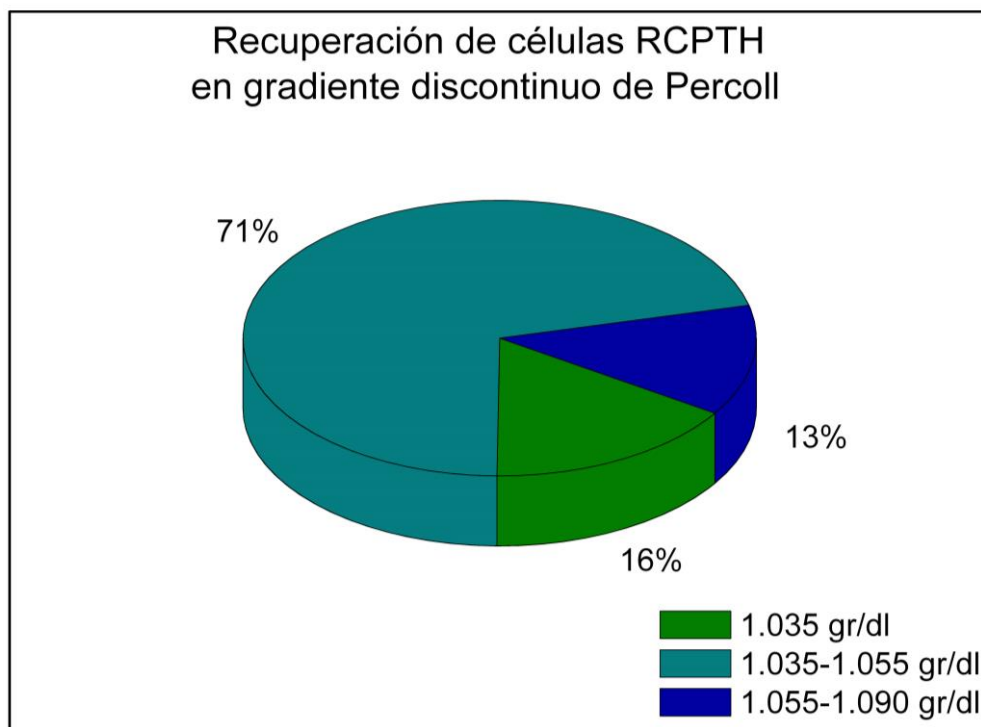


Fig. 16. Representación en porcentaje del total de células RCPTH recuperadas en gradiente discontinuo de Percoll ®. La mayor cantidad de células fue recuperada en la fase 1.035 – 1.055 gr/dl.

5.4.3 Inmunohistoquímica (PTH) en distintas fases.

La centrifugación en gradientes de Percoll permite separar un importante número de células en la fase 1.035 – 1.055 gr/dl. Para saber que tipos celulares están presentes en esta fase se utilizó una tinción inmunohistoquímica para PTH, sabiendo que las células de la glándula paratiroides que contienen mayoritariamente PTH son las células principales.

De esta forma, realizando la tinción Inmunohistoquímica en triplicado para cada fase, obtenemos un alto porcentaje de células (+) para PTH en la fase 1.035 – 1-055 gr/dl (64%) (Fig.17). Existe diferencia estadísticamente significativa con la fase 1.055-1.090 gr/dl, donde Rudberg y cols describen menor porcentaje de células principales y menor porcentaje de células vitales Sin embargo, es conveniente aclarar que estos autores trabajaron con cultivos primarios, no con líneas celulares.

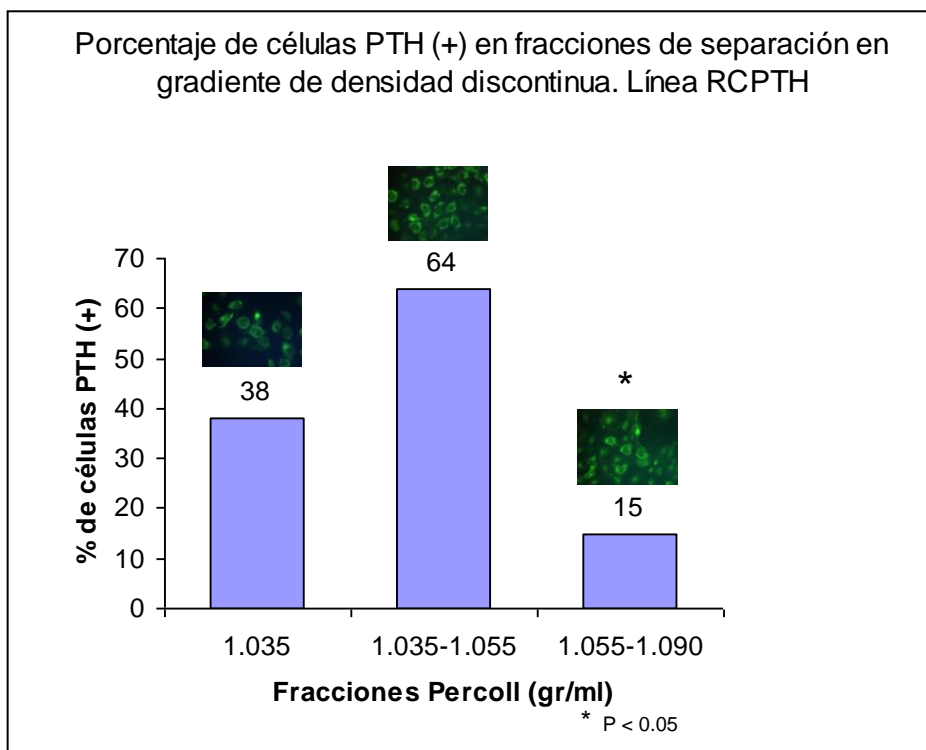
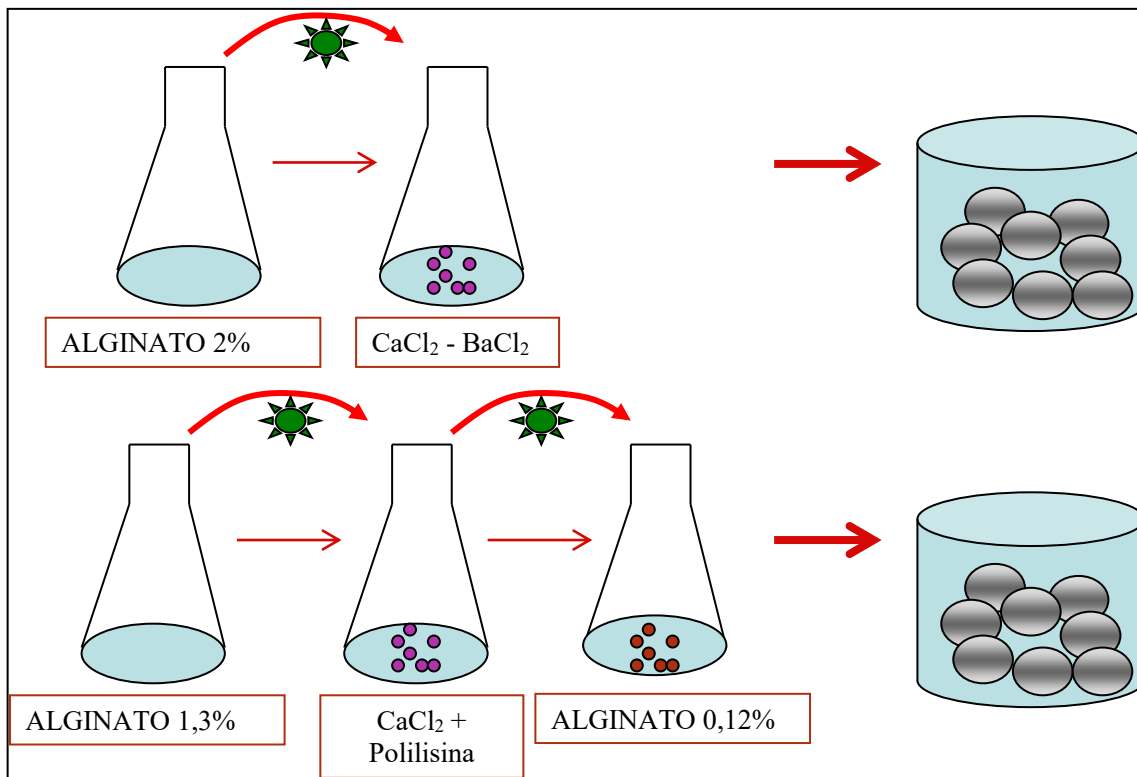


Fig. 17. Representación del porcentaje de células positivas para PTH en cada fracción de separación de células RCPTH en gradiente de Percoll ®. Se utilizó inmunohistoquímica con Ac anti PTH BD-biosciences 1:100. Se digitalizó las imágenes con cámara CoolSnap. (n=3 / p< 0.05).

En resumen, se realizaron cultivos primarios de paratiroides humana que mantienen su funcionalidad por lo menos por 3 subcultivos (100 días aprox), y se ha obtenido una línea continua de paratiroides humana por más de 100 subcultivos, que produce y secreta PTH, responde a los niveles de calcio extracelular y es influenciada por la presencia de factores secretados por las células de granulosa humana (RCGH). Además, al separarlas en gradientes de percoll podemos obtener una fracción celular rica en células principales.

Cumplidos los primeros objetivos del proyecto, se planificó desarrollar la técnica de microencapsulación celular con la cual podremos utilizar estas células y/u otros tejidos para realizar trasplante celular.



Esquema 2. Representación del tipo de microencapsulación utilizados. Abajo se grafica el proceso de microencapsulación con Alginato-Polilisina-Alginato (APA). Arriba se observa el proceso de microencapsulación con Alginato 2% gelificado con CaCl_2 o BaCl_2 .

5.5 Microencapsulación:

5.5.1 Métodos de Microencapsulación probados:

Método Firenze

El método de microencapsulación utilizado por Piccariello y cols (Firencia- Italia) utiliza dos capas de alginato (1,3% y 0,12%), con una capa intermedia de Polilisina. La

gelificación del alginato se logra con una solución de CaCl_2 . Las denominaremos Microesferas APA (**ME APA**)

Método Zimmermann

El método descrito por el grupo alemán utiliza alginato más concentrado (2%) y la gelificación se lleva a cabo con BaCl_2 . No utilizan capas intermedias. En este escrito las denominaremos **ME BaCl₂**.

Método Zimmermann modificado

Para probar las distintas características de las microesferas se desarrollo además la microencapsulación sin capa intermedia con polilisina, utilizando alginato 2% y gelificadas con CaCl_2 . En este escrito las denominaremos **ME CaCl₂**.

Al comparar distintos tipos de microencapsulación se realizaron algunas pruebas para determinar cual se ajustaba más a las necesidades en un futuro trasplante. Estas pruebas estaban orientadas a evaluar la resistencia y estabilidad, la permeabilidad y la capacidad de recuperar las células incluidas en el alginato para estudios posteriores. (Western Blot, RT-PCR, etc)

5.5.2 Tamaño

La primera diferencia macroscópica es el tamaño de las microesferas. Al utilizar alginato más concentrado se crea una gota más grande, que queda reflejada en una microsfera de superior tamaño como muestra la imagen siguiente. Esto representó un problema al tratar de comparar ambas microesferas en los estudios de permeabilidad, debido a la mayor capacidad de una sobre la otra.

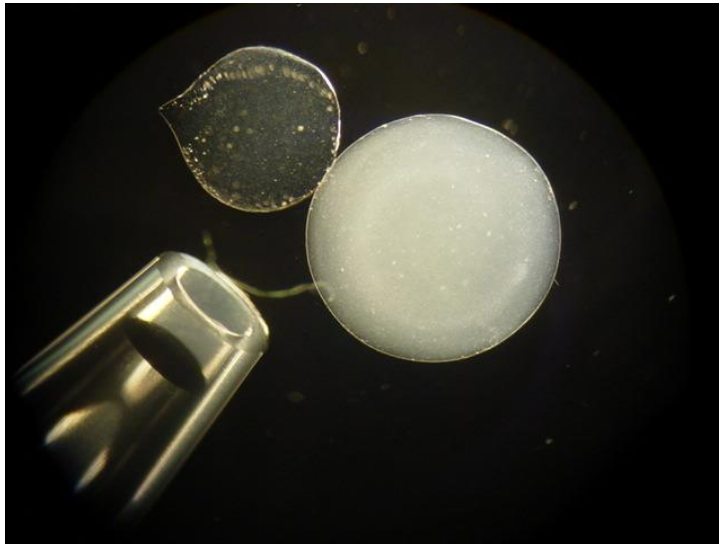


Imagen 2. Fotografía digitalizada bajo microscopio de contraste de fases de fases de microesferas ME APA (pequeña/izquierda) y ME BaCl₂ (grande/derecha). Se comparan los tamaños contra una punta de micropipeta (1 mm). 10X

5.5.3 Comparación de Estabilidad y Resistencia

Para evaluar la estabilidad de las microesferas y resistencia a distintas condiciones de pH, los dos tipos de microesferas que contenían la línea celular FLG (línea continúa de leucoblastos) fueron expuestos a distintos compuestos utilizados en la literatura para disolver el alginato. Es así como se mantuvieron las microesferas en medios con Citrato de Sodio y Carbonato de Sodio a pH 8,8 y 9,5. Se observó la disolución casi completa de las microesferas de Alginato-Polilisina-Alginato (ME APA), a partir de los 4 minutos de incubación. En cambio, las microesferas de Alginato 2% gelificadas en BaCl₂ (ME-BaCl₂) no se disolvieron tras el período de incubación (48 hrs) (Fig. 18 y 19)

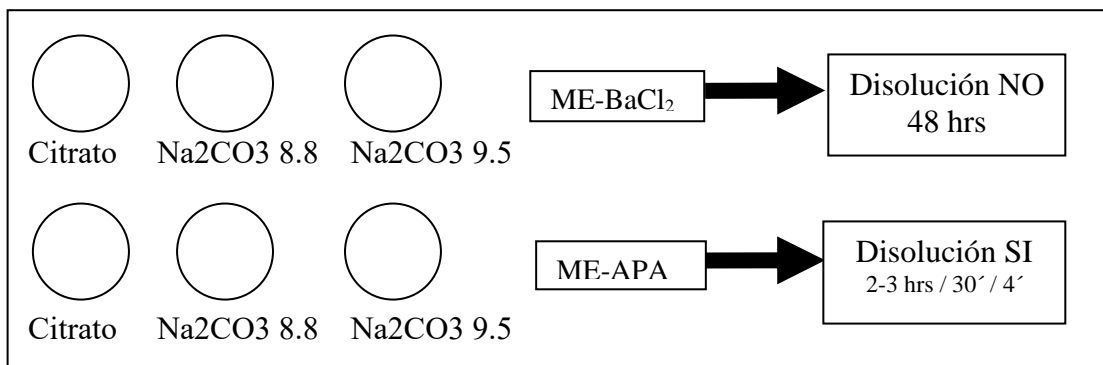


Fig.
18.

Disolución de Microesferas ME-APA y ME-BaCl₂. No se logró disolver las ME- BaCl₂. Las ME-APA fueron disueltas a partir de los 4 min con Na₂CO₃ pH 9.5, a los 30 min con Na₂CO₃ pH 8.8 y a las 2 hrs con Citrato de Sodio 1%.



Fig. 19. Visualización Microscópica (10x) de la disolución de Microesferas APA (A). Disolución con EDTA 50mM, Carbonato de Calcio pH 8.8, Citrato de Sodio 50 mM. Las ME-BaCl₂ no fueron alteradas tras la incubación por > 48 hrs. (B).

Otra observación llamativa fue la fragilidad y disolución espontánea de las Microesferas de APA CaCl₂, que posterior al proceso de microencapsulación fueron muy inestables a la agitación suave. Esto se observó en por lo menos 3 ensayos consecutivos. (Fig. 20)

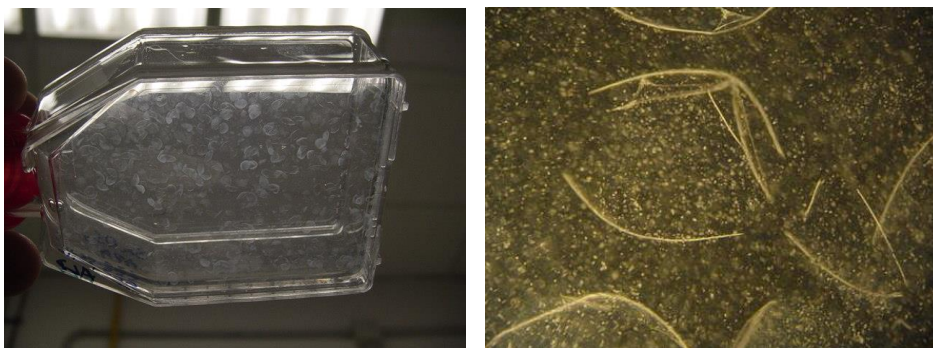


Fig. 20. Disolución espontánea de ME-APA. A la izquierda visión macroscópica de las microesferas rotas. A la derecha imagen de microscopía de ontraste de fases 10X de las ME-APA disueltas con liberación completa de las células.

Una vez evaluada la resistencia frente a estos compuestos y condiciones de pH, se evaluó la recuperación de las células y su vitalidad. La disolución sólo fue posible en las ME-APA, por lo cual sólo se evaluó sobre este método de microencapsulación.



Fig. 21. Vitalidad post disolución de ME-APA. No se obtuvo células vivas después de estos métodos de disolución. Se utilizó tinción de azul tripán para evaluar la vitalidad.

La vitalidad de las células recuperadas después de la disolución con citrato y carbonato de sodio fue nula (Fig. 21)

Basados en la literatura, consideramos modificar las microesferas, no utilizando Polilisina por su potencial citotoxicidad (*Arnold y cols 1979*), realizando la disolución con EDTA 50 mM (*Weber M y cols 2002*)

Se diseñó una prueba en que se comparó la disolución con EDTA 50 mM, en los tres tipos de Microesferas (ME-APA, ME-BaCl₂ y ME-CaCl₂), y la vitalidad (azul tripán) de las células recuperadas utilizando la línea celular FLG (Línea continua de Leucoblastos con

diferenciación osteoclástica / crecen en suspensión celular). Los resultados se ven en la Tabla 1. Nuevamente no se logró la disolución de las ME-BaCl₂.

Tabla 1. Disolución de Microesferas con EDTA 50 mM. Recuperación celular (FLG) y vitalidad.

Tipo de ME	Tiempo en que se logra la disolución	Número de células recuperadas	Vitalidad (azul tripán)
ME-CaCl ₂	48 hrs	39.444 células	36%
ME-BaCl ₂	48 hrs	0 células (no disolución)	----
ME-APA	2 hrs	298.000 células	23.6%

5.5.4 Disolución de ME y recuperación de BSA a 15 y 60 minutos

Para determinar un patrón de temporalidad en la disolución del alginato (ME cargadas con BSA 4mg/ml alginato), se intentó medir la concentración de BSA liberada en el medio, a distintos tiempos del proceso de disolución de alginato. (15 y 60 minutos).

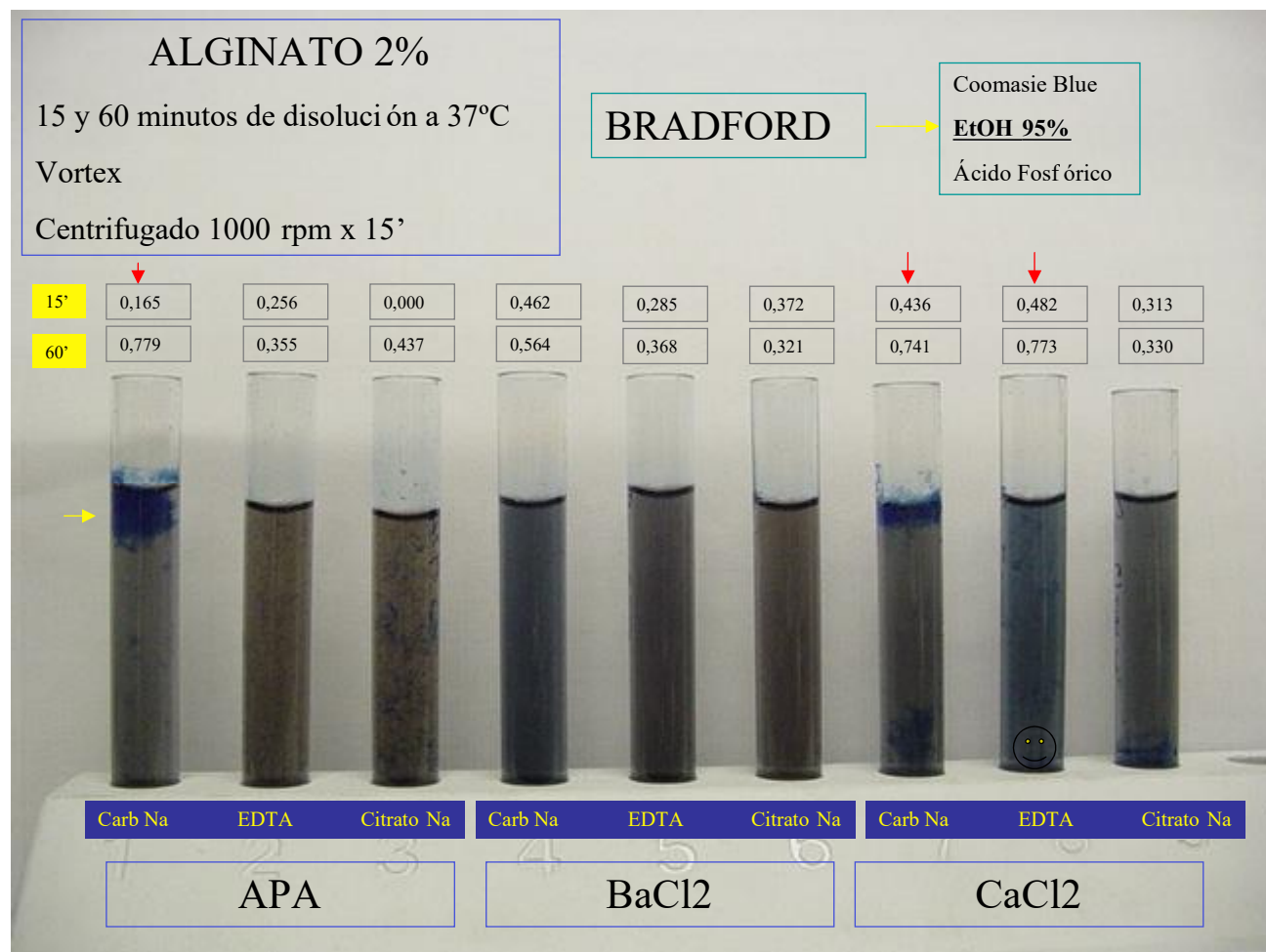


Fig. 22. Disolución de ME de Alginato a 15 y 60 minutos. Durante la aplicación del reactivo de Bradford se evidenció precipitación del alginato lo que frustró el experimento.

La figura 22 muestra la inmediata precipitación del alginato disuelto en las muestras (flecha amarilla), probablemente debido a la presencia de Etanol en el reactivo de Bradford (Fig. 22). Esto da cuenta de la presencia de alginato disuelto en las muestras lisadas.

5.5.5 Permeabilidad de las Microesferas

5.5.5.1 Permeabilidad de Albúmina

Para medir la permeabilidad de las microesferas se utilizó albúmina, proteína de 66 kDa fácil de cuantificar por método de Bradford.

Como mencionamos, las diferencias de tamaño no hacen posible comparar la permeabilidad entre tipos de microesfera. Por lo tanto, se utilizó una sola concentración de alginato (2%) para comparar los distintos tipos de gelificación (BaCl_2 y CaCl_2).

El mismo número de microesferas fueron cargadas con Albúmina Bovina (BSA) en una concentración de 4 mg/ml. Luego fueron incubadas por 24 hrs en agua destilada, la que fue rescatada para la cuantificación de proteínas por Bradford (Tabla 2 y Fig. 23).

Tabla 2. Recuperación de Albúmina desde microesferas de Alginato 2% cargadas con 4 mg/ml de BSA.

Alginato 2%	Absorbancia	[] $\mu\text{g. prot.}$	p
ME- BaCl_2	0,138	7,751	< 0.001
	0,137	7,528	
ME- CaCl_2	0,235	23,14	0.12
	0,244	24,55	
ME-APA	0,256	26,51	
	0,283	30,78	
Controles	Referencia	Referencia	

Se observa una disminución significativa de recuperación de BSA en las ME- BaCl_2 .

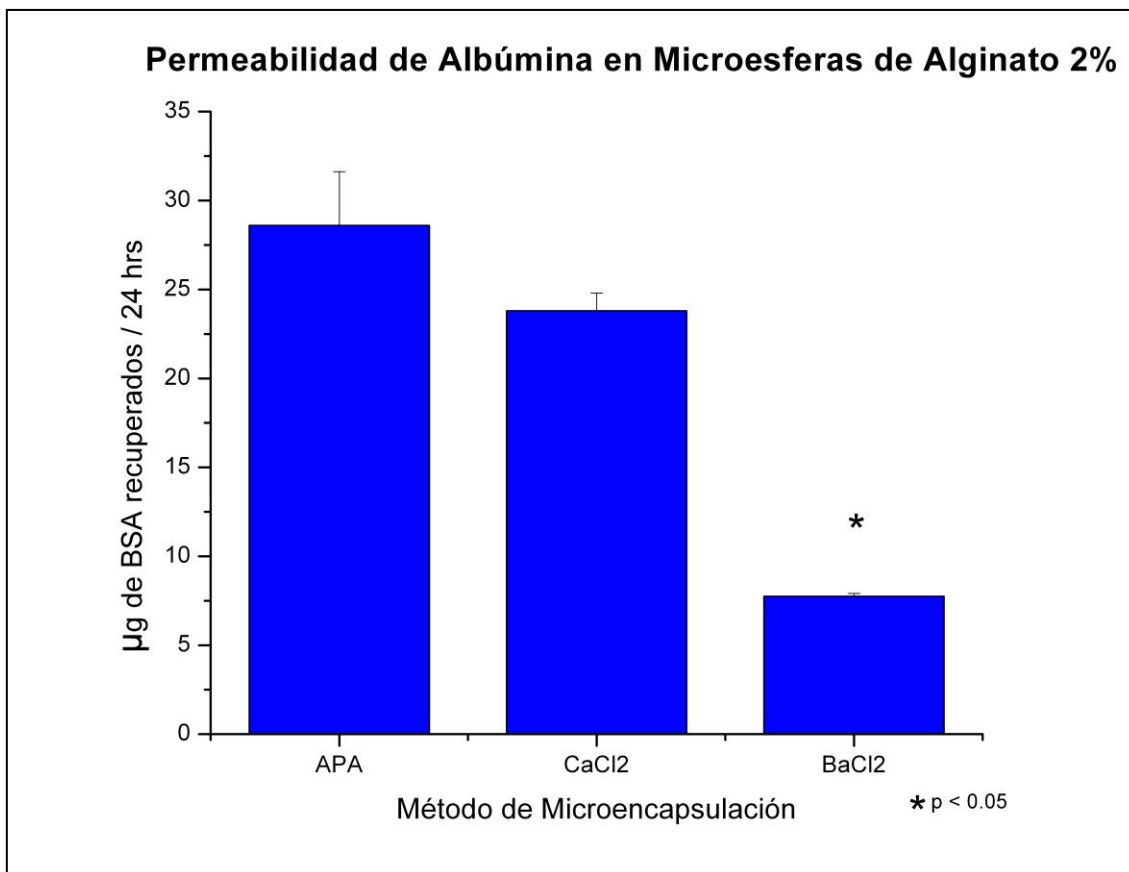


Fig. 23. Recuperación de BSA desde microesferas APA, CaCl₂ y BaCl₂, luego de incubación por 24 hrs en agua destilada. No existe diferencia estadística al utilizar CaCl₂ con o sin polilisina. Las ME BaCl₂ tienen menor permeabilidad a BSA. (n=2 / p<0.05)

Con el método de permeabilidad a BSA se logra dar cuenta de la diferencia de la permeabilidad de albúmina (en una concentración de 4 mg/ml de alginato) que existe al utilizar los distintos tipos de cobertura (CaCl₂ – BaCl₂ – APA).

Como se muestra en la figura 23, la permeabilidad entre las microesferas cubiertas con APA y con CaCl₂ no tiene diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, la cobertura con BaCl₂ disminuye drásticamente la permeabilidad de BSA en 24 hrs. (p< 0.05)

5.5.5.2 Permeabilidad de Fosfatasa Alcalina (FA) soluble (9 kDa)

La línea tumoral SaOS2 (osteoblastoma) secreta FA en forma soluble e insoluble. Estudios previos afirman que la mayor parte de la actividad de FA está dada por una proteína insoluble, que se logra identificar en una fracción hidrofóbica mediante separación con Triton X-114. Esta enzima está probablemente unida a membrana celular (vesículas de exocitosis), por lo que es insoluble. El objetivo de este experimento es evidenciar el paso de la enzima FA a través de la membrana de alginato de los distintos tipos de ME (ME APA, ME BaCl₂).

Suponemos que la fracción insoluble no será capaz de atravesar la membrana de alginato. Para evaluar la actividad total se consideró una condición de céls SaOS₂ sin ME (en adhesión) y se midió la actividad total de FA de las células dentro de las microesferas.

El método implica el uso de un sustrato de la enzima (pNFP) que tiene un PM de 9 kDa. Como ya sabemos nuestras microesferas son permeables a proteínas de 66 kDa, por lo tanto, esta molécula atraviesa la membrana de alginato sin problemas. A su vez, la FA es una proteína de 84 kDa. De esta forma se evaluó la actividad de la enzima en las microesferas y en el medio condicionado (según el esquema de Materials y Métodos). Los datos están expresados en U/min. La conversión a U/min se llevó a cabo con el software DigiWin v.3.17. (Tabla 3 y Fig. 25)

Se intentó normalizar por contenido de DNA para confrontar los resultados. Sólo fue posible realizar la curva estándar. No se logró medir el contenido de DNA de las muestras, por no disponibilidad del equipo (utilizado por otro proyecto a tiempo completo por el grupo florentino). Por esto, sólo se pueden confrontar los resultados de un mismo tipo de cultivo (adhesión v/s adhesión y ME v/s ME) y método de ME (BaCl₂ – APA). (Realizado en Florencia – Italia, Fig. 24)

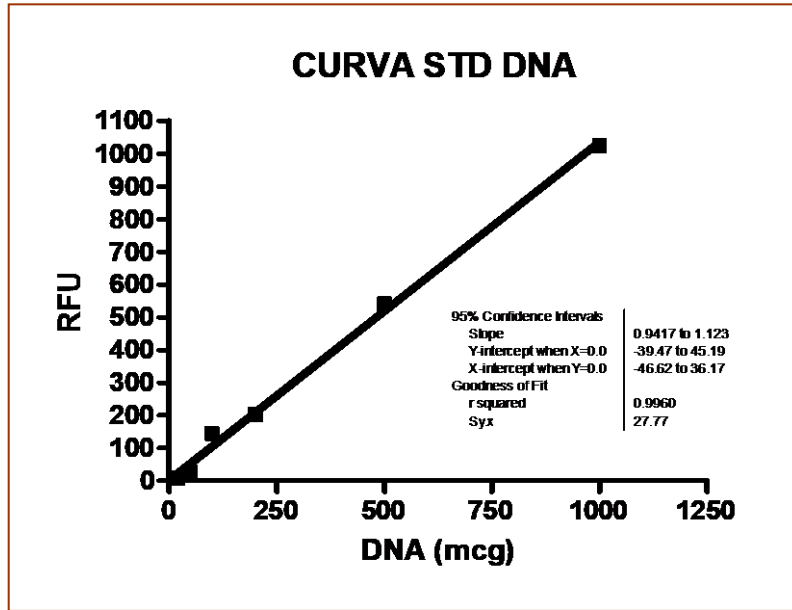


Fig. 24. Curva Estándar de DNA, realizada con método espectrofotométrico con tinción de Hoescht 33258.

Tabla 3. Medición de Actividad de Fosfatasa Alcalina Total y Secretada al Medio Condicionado (MC) de células SaOS₂ Microencapsuladas (alginato 2% - ME-BaCl₂)

	Actividad (U/min)
ADHESIÓN	2,041
MC – ADHESIÓN	0,262
ME	1,010
MC - ME	0,121

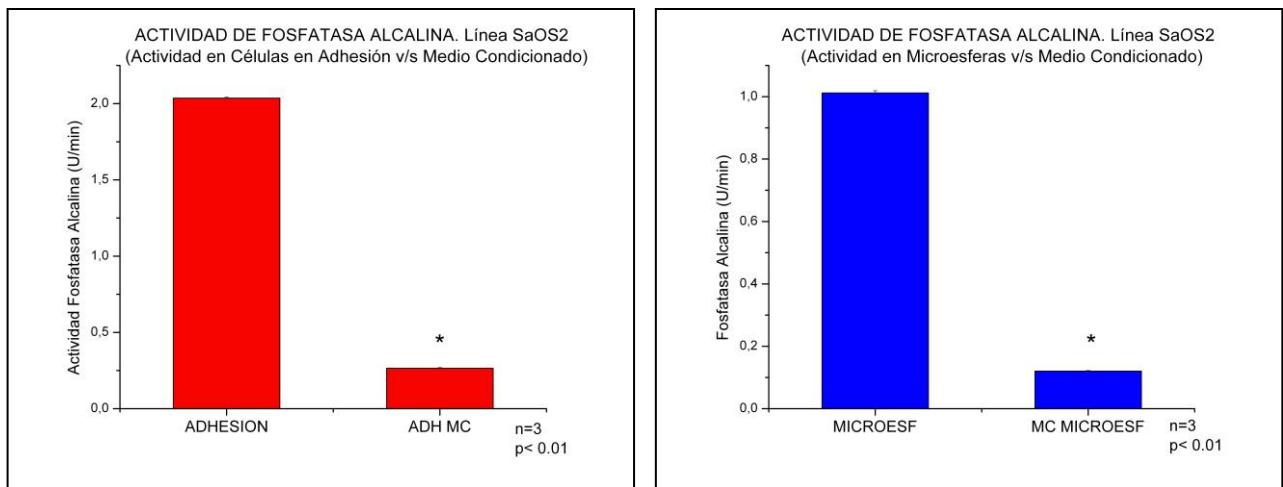


Fig. 25. Actividad de Fosfatasa Alcalina (U/min) total y secretada, de células SaOS₂ cultivadas en adhesión y microencapsuladas (ME-BaCl₂).

De esta forma podemos decir que las microesferas de alginato 2% gelificadas con BaCl₂ son permeables a Fosfatasa Alcalina, y el porcentaje de actividad detectada en el medio condicionado es muy similar al de las células en adhesión (10% de la actividad de FA secretada aproximadamente).

Es decir, las ME-BaCl₂ **son permeables** a una proteína de 84 KDa secretada por una célula.

Además, se evaluó la actividad de fosfatasa alcalina en el medio condicionado a 3 y 10 días de cultivo de las células SaOS₂ microencapsuladas (ME-BaCl₂), observándose actividad a 3 y 10 días. Podemos ver que las microesferas siguen siendo permeables a 10 días de manera similar a la inicial. (Fig. 26)

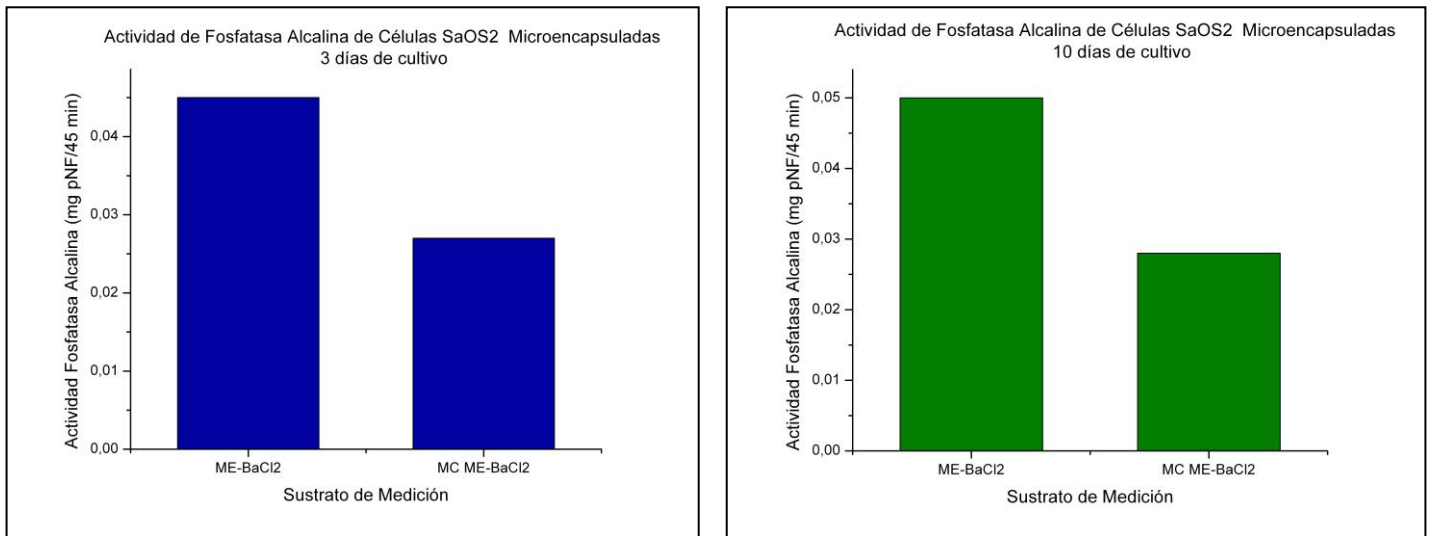


Fig. 26. Determinación de actividad de fosfatasa alcalina total (ME-BaCl₂) y secretada (soluble en el MC – MC ME-BaCl₂), a los 3 y 10 días de cultivo. (n=3 / p< 0.05)

5.5.6 Recuperación de DNA de células microencapsuladas

5.5.6.1 Por congelación en Nitrogeno liquido, homogenización y método Tiocianato

Para el estudio genético de las células microencapsuladas se debe recuperar las células el RNA-DNA de las células de una forma segura. Como ya se mencionó, la disolución de la ME compromete la vitalidad. Por lo tanto, para este problema específico, se diseñó un protocolo de extracción por congelación y homogenización en presencia de Guadinina Tiocianato y Guanidina Clorhidrato (como inhibidores de RNAsas), para la recuperación de células y RNA para RT-PCR, desde las microesferas. Para esto se utilizó la línea celular de Leucoblastos (FLG) (Fig. 27)

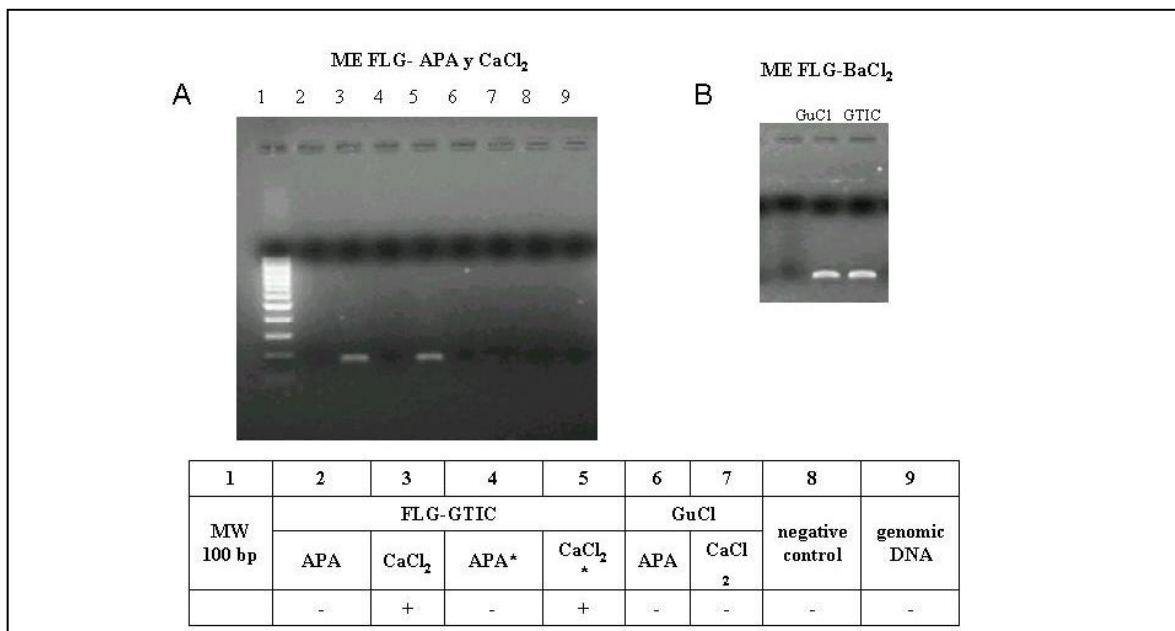


Fig. 27. RT-PCR de B-actina en células FLG microencapsuladas en: A) ME APA y ME CaCl₂ y B) ME BaCl₂. No hubo amplificación en las condiciones de ME APA. Hubo mayor amplificación de RNA d B-actina n la condiciones de extracción en presencia de GTIC y ausencia de polilisina (ME APA). * Segundo lavado a través de sílica-gel

De esta forma, podemos notar que la recuperación de RNA y su posterior utilización en RT-PCR es mejor cuando se utiliza una técnica de microencapsulación que no utiliza polilisina. Por otro lado, las microesferas gelificadas en BaCl₂ permiten extraer el RNA por un método de congelación-agitación en presencia de los dos compuestos probados (GuCl y GTIC).

5.6 Microencapsulación de Tejido Humano

El paso siguiente fue probar la microencapsulación de tejido humano. Esto fue realizado en el contexto de la planificación de un Alotrasplante en una paciente con Hipoparatiroidismo Postquirúrgico que requería infusión continua de calcio para sobrevivir. Luego del 3er cuadro de sepsis por catéter se decidió realizar un alotrasplante de tejido paratiroideo microencapsulado.

El procedimiento llevado a cabo fue descrito en Material y Métodos, la única variación es la utilización de una aguja de mayor calibre que permitió el paso de los trozos de tejido (14 G). De esta forma se obtienen ME BaCL₂ de 3 mm de diámetro aproximadamente. (Imagen 4)

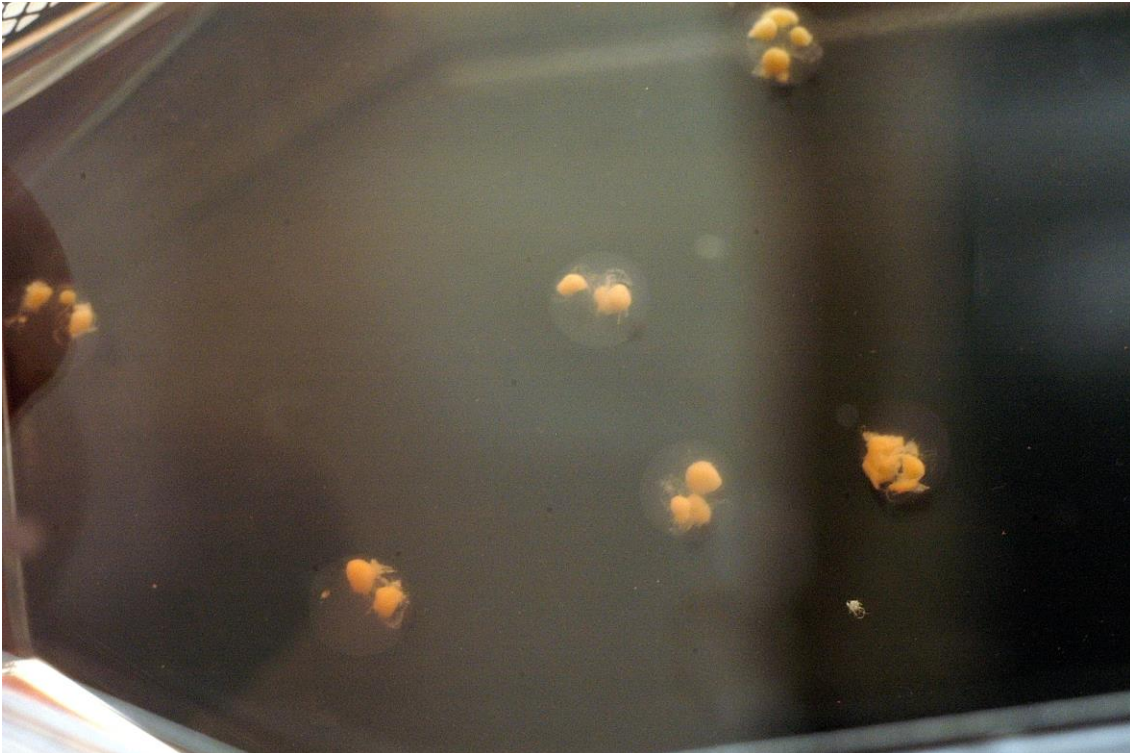


Imagen 4. Microesferas ME BaCl₂ conteniendo tejido paratiroideo hiperplásico, en botella de cultivo.

Se determinó los niveles de PTH intacta posterior a 24 hrs de incubación de 5 ME resrvadas para este efecto, a los 3 meses de microencapsulado el tejido. Los niveles de PTH intacta detectada excedieron el límite máximo de detección del kit (> 2.500 pg/ml).

5.7 Banco de tejido y casos clínicos de auto y alotrasplante:

Como una necesidad, e impulsado por los antecedentes recogidos durante este proyecto, se establece un Banco de Tejidos en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Este Banco tiene como fin criopreservar las glándulas paratiroides resecadas de pacientes con hiperparatiroidismo secundario, para ser utilizadas en Autotrasplantes en caso de una evolución desfavorable hacia el hipoparatiroidismo, o para ser utilizadas en alotrasplante de pacientes con hipoparatiroidismo postquirurgico (post-tiroidectomía)

5.7.1 Criopreservación del Tejido

Hasta el momento, y con la metodología descrita, se ha criopreservado tejido de 21 pacientes en el banco de criopreservación. De estos sólo 2 han evolucionado con hipoparatiroidismo postquirúrgico (una vez descartado un síndrome de hueso hambriento). Estos pacientes fueron sometidos a un autotrasplante del tejido paratiroideo criopreservado. Además, gracias a este banco de tejido, logramos realizar el primer alotrasplante microencapsulado de paratiroides a una paciente con hipoparatiroidismo postquirúrgico severo.

5.7.2 Casos de Autotrasplante:

Para todos los casos descritos se utilizó tejido autólogo criopreservado según las condiciones descritas en Material y Métodos.

Caso 1:

Paciente de sexo masculino, de 54 años de edad con IRC de causa desconocida, en diálisis trisemanal. En sus antecedentes consta el haber recibido 2 trasplantes renales (1996 y 1998) rechazando ambos riñones. En la evolución presentó hiperparatiroidismo secundario severo con PTH plasmática de 1.665 pg/ml. Fue intervenido, realizándose una paratiroidectomía subtotal 7/8, evolucionando con hipocalcemia persistente en el postoperatorio, con PTH plasmática de 6.9 pg/ml. Para evitar la sintomatología se administró carbonato de calcio 12 gr/día más Rocaltrol ® 0,5 µg/día. Por la persistencia de este cuadro, el paciente fue sometido a un autotrasplante de paratiroides a los 6 meses. Bajo anestesia local se realizó una incisión en antebrazo derecho (contrario a la fístula arteriovenosa (A-V)) (Imagen 5). Se incindió la fascia de los músculos antebraquiales y se elaboraron bolsillos por divulsión roma, depositando el tejido paratiroideo previamente criopreservado. Se injertó una cantidad equivalente a una paratiroides normal. El paciente requirió de la mantención de su terapia oral por al menos 2 semanas en el postoperatorio. Los niveles de PTH plasmática subieron hasta 52 pg/ml en controles posteriores, logrando mantener una terapia de calcio oral de 1 gr c/8 hrs. El paciente fallece por su patología de base 6 meses post injerto. El

paciente mantenía un control poco regular, por lo que no se obtuvo mediciones de PTH más seguidos. (Fig 28)



Imagen 5. Sitio de autoinjerto de Tejido Paratiroideo Criopreservado.

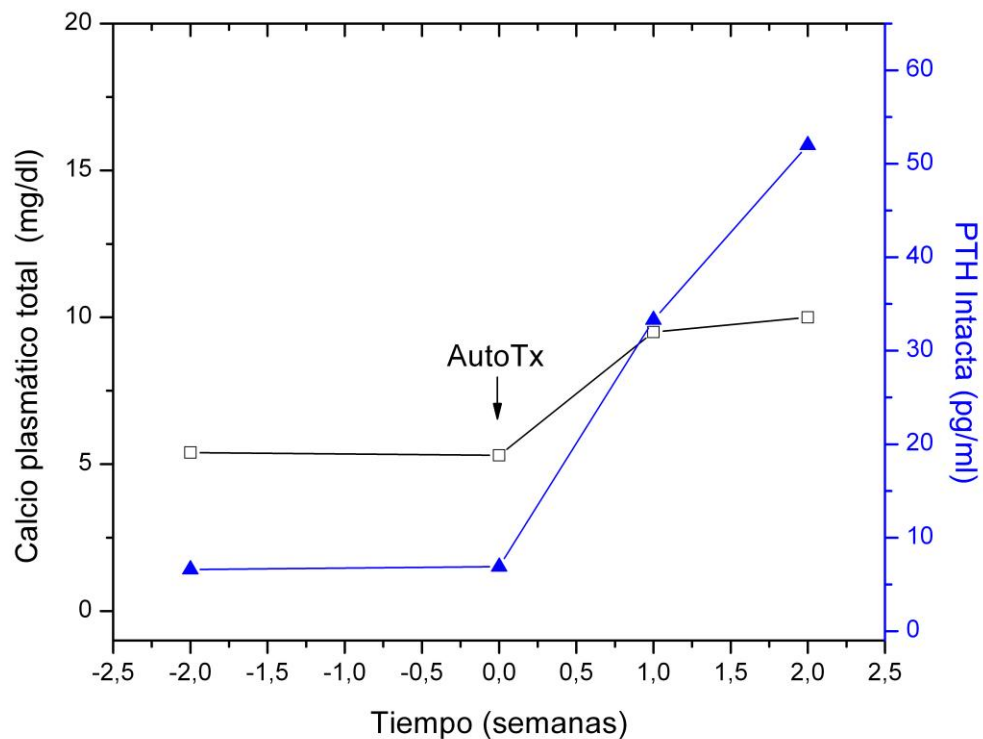


Fig 28. Controles de PTH plasmática Caso 1 autotrasplante. Se registra PTH (▲) y Calcemia (□) desde 2 semanas previas al autoinjerto. Se observa el aumento de la PTH plasmática post trasplante hasta valores normales.

Caso 2:

Paciente de sexo femenino, de 39 años de edad, con antecedentes de pielonefritis aguda a repetición en la infancia por lo que desarrolló IRC. Fue trasplantada a los 9 años de edad, sufriendo un rechazo agudo. Mantuvo hemodiálisis por un tiempo y luego peritoneodiálisis. En la evolución presentó niveles de PTH plasmática > 2.500 pg/ml. Ecografía cervical compatible con hiperplasia de paratiroides. Fue sometida a paratiroidectomía subtotal 7/8 y criopreservación. La PTH rápida intraoperatoria (qPTH) basal fue de 1.372 pg/ml, a los 15 minutos de reseca la glándula fue de 183 y a los 30 minutos de 62,4 pg/ml, con estos resultados la cirugía fue considerada exitosa. En el postoperatorio evolucionó con

hipocalcemia persistente atribuida a síndrome de hueso hambriento. Después de 2 años de evolución el cuadro de hipoparatiroidismo sintomático persistió, con niveles de PTH plasmática de <1 pg/ml y requerimientos de calcio de 3 gr al día más rocaltrol 0,25 µgr al día. Ante ello, se decidió realizar un autotrasplante de paratiroides. Se llevó a cabo el autoinjerto del tejido criopreservado por 24 meses en músculo deltoides derecho, para evitar comprometer una futura fístula arterio-venosa (A-V). Los niveles de PTH se mantuvieron en < 1 pg/ml por una semana, luego se elevaron a 8,5 pg/ml (día 7) y a 10 pg/ml al día 14. A los 2 meses del autoinjerto la PTH plasmática alcanzó 59,4 pg/ml. Por la rápida adaptación del tejido y por haber mantenido la suplementación, la paciente presentó calcemia de 12 mg/dl a los 14 días de trasplantada, y normalizó sus niveles de calcemia una vez disminuido el aporte oral a 500 mg c/12 hrs. Se asumió la funcionalidad del injerto debido al rápido ascenso y mantención de PTH plasmática post autotrasplante. No se controló niveles de PTH diferenciada por el sitio de injerto (deltoides). Un mes post injerto se realizó un Cintigrama Sestamibi- Tc99m que no evidenció captación del marcador a nivel cervical ni deltoideo (Fig.29 y 30).

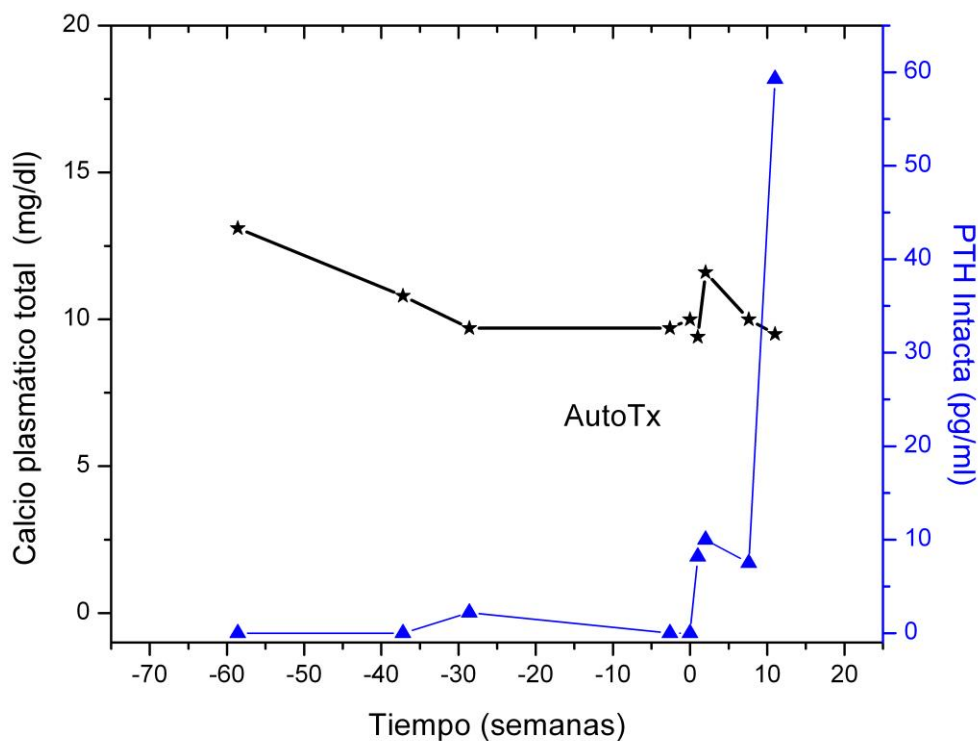


Fig. 29. Controles de PTH plasmática Caso 2 autotrasplante. Se registra PTH (▲) y Calcemia (★) desde 1 año previo al autoinjerto. Se observa un rápido aumento de la PTH plasmática post trasplante hasta valores normales.

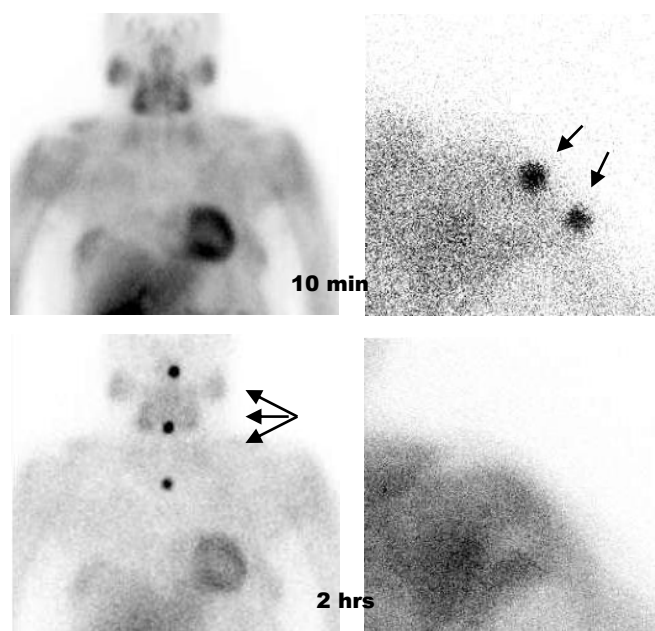


Fig. 30 . Cintigrama con sestamibi 1 mes post autoinjerto. No se evidencia captación del marcador en deltoides ni en región cervical. (Las flechas muestran marcas de referencia en piel).

5.7.3 Caso de Alotrasplante:

Para el siguiente caso se utilizó tejido paratiroideo criopreservado por 12 meses, proveniente de una paciente femenina, insuficiente renal que padecía Hiperparatiroidismo Secundario con PTH intacta de 1.680 pg/ml. La paciente accedió a criopreservar su tejido asumiendo la posibilidad de que este fuera utilizado para alotrasplante (consentimiento informado). Se realizó tamizaje viral que resultó negativo. El segundo alotrasplante fue

realizado con tejido de un paciente masculino con IRC e hiperparatiroidismo secundario, con PTH intacta preoperatorio de 850 pg/ml y tamizaje viral negativo.

Caso 3:

Paciente de sexo femenino, de 45 años de edad, con antecedentes de tiroidectomía total (marzo de 2004) por cáncer oncocítico. Evolucionó con hipoparatiroidismo permanente severo, con PTH persistentemente $< 0,1$ pg/ml y requerimiento de hasta 16 gr/día de carbonato de calcio y 2 μ g de calcitriol al día. Por cuadros de tetania a repetición se administró una infusión continua de calcio endovenoso (7 gr/día), mediante la instalación de un catéter de quimioterapia. Presentó 3 cuadros de sepsis por catéter. Por esto, se decidió realizar un alotrasplante experimental de tejido paratiroideo microencapsulado en alginato, para solucionar su problema, dos años post tiroidectomía. Mediante la técnica de microencapsulación celular se prepararon 23 microesferas de alginato con tejido paratiroideo de un donante vivo sometido a paratiroidectomía subtotal. Utilizando la misma técnica quirúrgica se implantaron las esferas en el antebrazo derecho. A los 6 días post injerto se logró suspender la terapia endovenosa y retirar el catéter venoso central. La paciente presentó un alza de los niveles de PTH plasmática hasta 5,7 pg/ml a los 8 meses de evolución. Se decidió realizar un nuevo alotrasplante para lograr niveles normales de PTH. En esta oportunidad se injertaron 40 microesferas en muslo derecho, logrando llegar a niveles de PTH plasmática de 9,3 pg/ml. Actualmente tiene 18 y 12 meses de evolución desde el primer y segundo alotrasplante, respectivamente. No ha requerido terapia endovenosa continua. Mantiene aporte oral de 6 gr de calcio Sandoz® y 1 ampolla de colecalciferol a la semana. A las 2 semanas de realizado el primer alotrasplante se realizó un cintigrama con Sestamibi-Tc99m de paratiroides, sin evidenciar acumulación del radioisótopo en tejido paratiroideo funcionando en región cervical ni antebrazo. A los 17 meses de seguimiento se realizó medición de PTH diferencial entre el brazo izquierdo y brazo derecho certificando un nivel plasmático mayor en el brazo injertado con un delta igual a 1,5 (brazo der: 4,4 v/s brazo izq: 2,9 pg/ml). (Fig. 31 y 32)

Cabe destacar que al momento del primer alotrasplante se reservó 5 ME con tejido paratiroideo para evaluar la funcionalidad en el tiempo. A los 3 meses de microencapsulado

el tejido y realizado el alotrasplante se midió los niveles de PTH en el medio de cultivo (24 hrs de incubación) de dichas ME resultando tener niveles superiores al máximo de detección del kit utilizado (> 2.500 pg/ml).

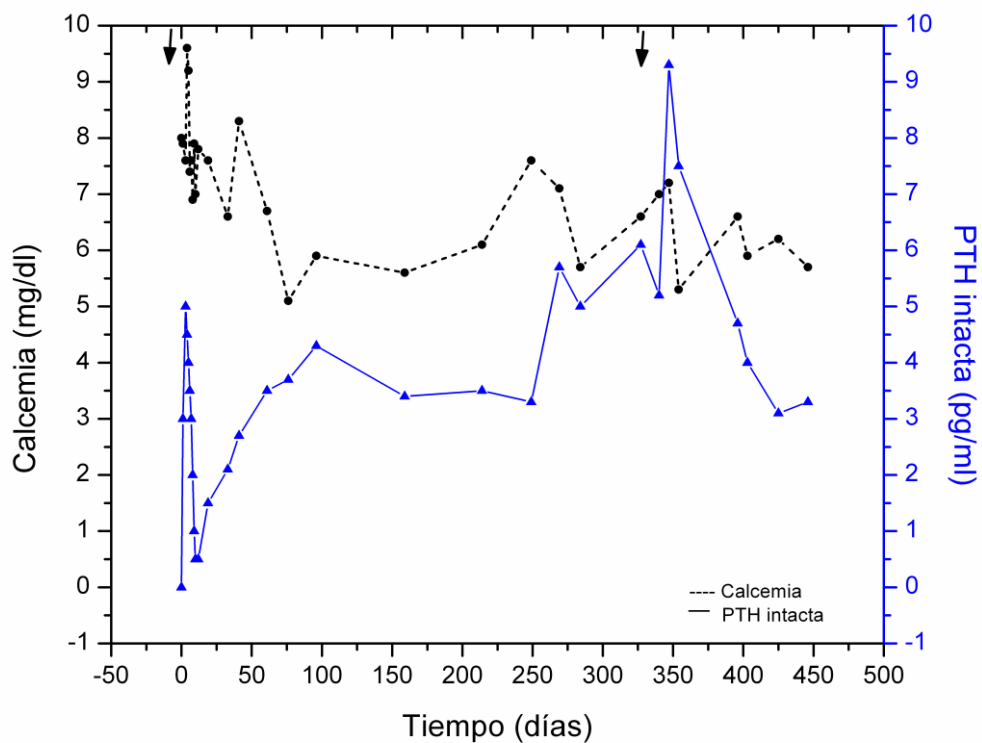


Fig. 31. Calcemia y PTH plasmática. Caso Alotrasplante de paratiroides. Las flechas indican el primer y segundo alotrasplantes.

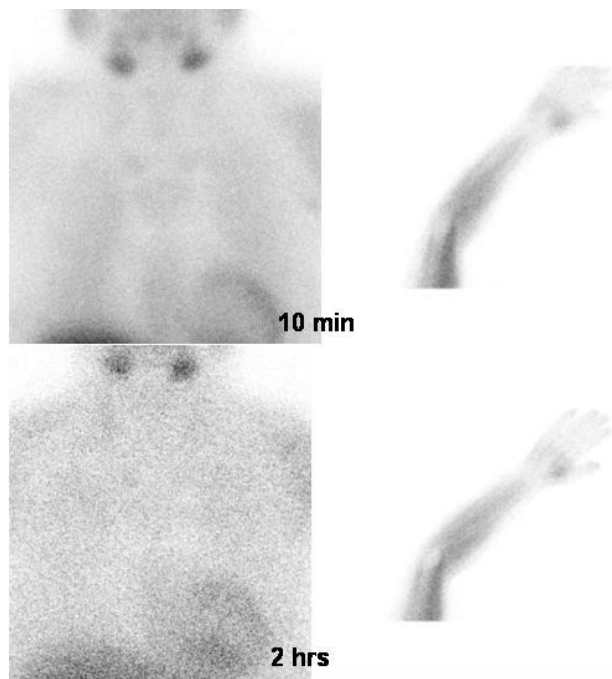


Fig. 32. Cintigrama de paratiroides (Sestamibi) antebrazo y región cervical. No se observa captación en región cervical. Tampoco se ve captación en antebrazo (baja resolución del examen).

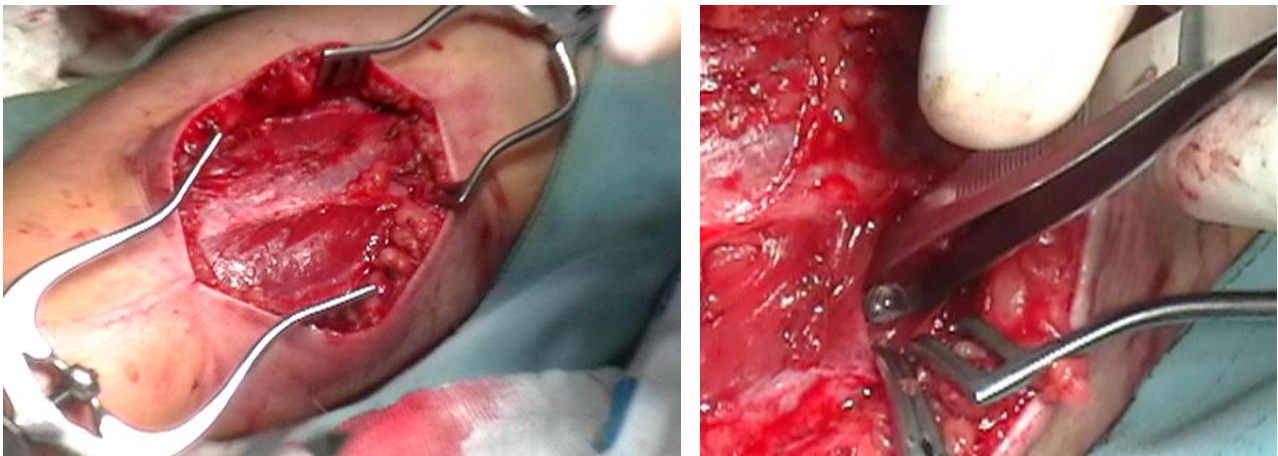


Fig. Imagen 6. Exposición de musculatura antebraquial (izq) y microsferas con tejido paratiroideo en bolsillos de músculo antebraquial (der). El procedimiento completo se puede ver en <http://www.youtube.com/watch?v=JobLDGUcOt4>.

6. DISCUSIÓN

El hipoparatiroidismo postquirúrgico sigue siendo un problema clínico importante, aún con todos los adelantos en prevención, pre e intraoperatoria. Ello hace necesario el desarrollo de nuevas y mejores terapias. No es el número de pacientes, sino la gravedad de algunos de estos, que llegan a requerir terapia endovenosa continua, con múltiples y graves complicaciones. (*Cabané y cols 2008* en revisión Transp. Proceedings) Los intentos por optimizar el cultivo de paratiroides para acercarse a la posibilidad de realizar terapia celular en estos pacientes ha sido infructuosa, con escasa sobrevivencia de los cultivos y pérdida de la función a largo plazo. (*Picariello y cols 2000 / Roussanne 1998 / Brandi 1986*)

Este proyecto cumple con su primer objetivo al crear una fuente inagotable de células de paratiroides humana, funcional a largo plazo (línea continua de paratiroides humana, RCPTH). La línea RCPTH se obtuvo gracias al método de inmortalización descrito por el Dr. Raúl Caviedes (*Caviedes y cols 1992*), con el cual se han establecido distintas líneas continuas de células humanas que mantienen sus características de células diferenciadas a largo plazo, sin evidencias de tumorigenicidad (*Cabané y cols 2007*). La línea de paratiroides humana descrita (RCPTH) demuestra ser una línea continua con una curva de crecimiento exponencial, sin senescencia, que mantiene sus características morfológicas por más de 200 días de cultivo y más de 100 subcultivos. Además se evidenció producción y secreción de PTH con respuesta variable a concentraciones de calcio extracelular, y la expresión del receptor de membrana Calcio Sensible (CaSR).

Todo lo anterior demuestra que se trata de una línea continua y funcional de paratiroides humana.

La utilización clínica de ésta línea celular está limitada por su eventual tumorigenicidad. Si bien, los resultados de la prueba de crecimiento en agar blando demuestran que no hay proliferación, esto debe ser confirmado con experimentos de tumorigenicidad *in vivo*, injertando células de la línea RCPTH en ratas atímicas (*nude mice*), estudio de elevado costo y no disponible en Chile. El experimento de crecimiento en agar blando (soft agar) es considerado el *Gold Standard* de tumorigenicidad *in vitro*, sin embargo, hay evidencias de formación de colonias de células de paratiroides humana de glándulas hiperplásicas y

adenomas (patología benigna) cultivados en estas condiciones (*Bradley y cols 1980*), lo que exige aún más la certificación de tumorigenicidad *in vivo* para esta línea celular, antes de considerar su uso en un estudio clínico en humanos.

6.1 Optimización y cocultivo

Para la optimización de la funcionalidad de las células de paratiroides se probó el cocultivo con células de granulosa humana (RCGH). Lamentablemente el kit de ELISA para PTH recibido estaba vencido y no permitió obtener resultados comparables entre las distintas condiciones. Sólo se puede rescatar que la línea RCPTH mantiene su funcionalidad a largo plazo, y destacar que la condición de cocultivo con células de granulosa humana se detecta mayor cantidad de PTH en el medio.

Este hallazgo sumado al efecto del medio condicionado de RCGH de aumentar el tiempo de duplicación y disminuir la proliferación puede traducir un efecto sobre la diferenciación que aumenta la secreción de PTH o la sensibilidad al calcio extracelular. A este respecto, cabe señalar que no existe información en la literatura en relación al uso de cocultivos con células de paratiroides y otros tipos celulares.

La separación en gradientes de percoll permitió evidenciar que hay distintos tipos celulares, y que en la fracción 1.035 – 1.055 gr/dl se ubica la mayor parte de las células principales (PTH +), lo que resultó comparable a lo descrito por *Rudberg y cols*.

Esto permitirá en el futuro desarrollar conglomerados celulares con distintas proporciones celulares para asemejar la proporcionalidad de una glándula normal o establecer la fórmula más efectiva. Es claro, sin embargo, que con esta línea se podrá continuar investigando las alternativas de cultivo y cocultivo para la optimización de vitalidad y función a largo plazo.

6.2 Aplicación clínica, criopreservación y microncapsulación

Por otro lado, los intentos clínicos en terapia celular con células o tejido paratiroideo en casos de hipoparatiroidismo postquirúrgico tampoco han sido efectivos.

La primera experiencia fue presentada por *Tollozcko* en 1996 con 40 alotrasplantes de células de paratiroides humanas cultivadas y seleccionadas in Vitro (sólo células productoras de PTH). Recientemente el mismo grupo publicó una serie con 116 casos de aloinjertos de células paratiroides cultivadas por 6 semanas y congeladas. El cultivo permite disminuir la expresión del antígeno leucocitario humano (HLA I y II) y así disminuir la antigenicidad (*Timm y cols 2001*). Pero, la sobrevida de los injertos fue de sólo 6 +/- 13 meses y sólo el 55% de los casos demostró funcionalidad por más de 2 meses, con escaso impacto clínico (*Nawrot y cols 2007*).

Dentro de los factores que pueden explicar esta escasa efectividad y sobrevida está la técnica utilizada por estos autores, que selecciona de manera estricta sólo las células productoras de PTH lo que perjudica la regulación auto y paracrina de la glándula. Hay evidencia de que no sólo las células principales producen y secretan PTH en glándulas hiperplásicas; las células oxifílicas también son funcionales incluso en alotrasplantes en modelos animales (tejido humano a ratas atímicas) elevan los niveles de PTH plasmática de manera dosis dependiente (cantidad de tejido trasplantado)(*Tanaka y cols 1996*). Esto da cuenta de lo complejo que puede ser la regulación y activación de la función endocrina de las distintas células de la glándula paratiroides, por lo tanto, es poco atractivo seleccionar sólo células principales teniendo como objetivo la obtención de un tejido o células con función y respuesta endocrina normal. Además se ha demostrado que la criopreservación puede afectar la viabilidad y función de las células paratiroides. En efecto, se ha demostrado que la criopreservación de paratiroides es más efectiva al congelar células en suspensión versus tejido (90 v/s 70% de vitalidad al descongelar). Sin embargo, las suspensiones celulares congeladas y recuperadas ven comprometida su sensibilidad al calcio extracelular (*McHenry y cols 1997, Ulrich y cols 2001*). También ha sido reportado necrosis parcial al criopreservar tejido paratiroideo completo (*Wagner PK y cols 1984. Fortschr Med*)

Por lo anterior, creemos que lo más conveniente es utilizar tejido completo disgregado mecánicamente o enzimáticamente para la criopreservación y terapia celular.

Otro factor vital es el rechazo por inmunosensibilización. Algunos autores reportan mejoría parcial de los síntomas de hipocalcemia en pacientes con hipoparatiroidismo postquirúrgico realizando aloinjertos de tejido paratiroideo desnudo sin inmunosupresión. Estos injertos tienen corta sobrevida (2 meses aprox). Algunos grupos han intentado el uso de aloinjerto repetido de tejido, sin embargo, el rechazo ocurre en menor tiempo, probablemente debido a inmunosensibilización (*Kunori y cols 1991, Tolloczko y cols 1997*).

Existen reportes de uso de inmunosupresores por tiempo limitado (ciclosporina) en modelos animales, pero ellos no demuestran ningún beneficio pues no logran evitar el rechazo. (*Timm y cols 2003*). A este respecto, hoy en día existen tratamientos inmunosupresores altamente efectivos, evidenciado en especial en pacientes trasplantados renales en quienes hay reportes de hasta 13 años de función de un injerto de paratiroides (*Alfrey y cols 1992*). Sin embargo, las complicaciones de la terapia inmunosupresora pueden ser muy severas, lo que no justifica su utilización en estos pacientes.

Cuando no existe inmunosupresión por otra causa, se ha adoptado la técnica de microencapsulación celular para evitar el rechazo del tejido. Existen escasos reportes de esta aplicación en que se ha obtenido efectividad clínica parcial, pero se considera como una técnica promisoriosa por su bajo costo y fácil aplicación. Sin embargo para el desarrollo de estas técnicas es necesario contar con capacitación adecuada y una infraestructura acorde. Es así como durante el desarrollo de este proyecto fue necesario capacitación en el extranjero en microencapsulación celular y el desarrollo y montaje de un banco de tejidos que cumpla con las exigencias sanitarias para terapia celular.

La microencapsulación busca contener y proteger células viables en membranas semipermeables. Estas membranas deben ser permeables a las moléculas esenciales para la sobrevida celular, pero no deben permitir el paso de moléculas más grandes que el tamaño deseado (anticuerpos, complemento). Con esto, se logra crear una barrera inmunológica sin usar drogas inmunosupresoras que conllevan variadas complicaciones derivadas de su uso (*Uludag y cols 2000*). Esta tecnología no se usa solamente con el fin de trasplantar células y tejidos, sino también en la producción de moléculas a gran escala y otros tipos de cultivo

para experimentación (selección clonal, crecimiento celular con cotancto célula a célula, diferenciación celular etc.) (*Steintert y cols 2003, Weber y cols 2002*).

Entre estos dos objetivos principales (viabilidad e inmunoprotección), la microencapsulación requiere múltiples y variados estudios, donde se deben considerar la determinación de las características físico-químicas de resistencia y estabilidad de los materiales utilizados, así como, estudios de biocompatibilidad, viabilidad y función celular, e inmunocompetencia. Con este fin se han utilizado varios compuestos naturales y sintéticos para lograr la microencapsulación (alginato, agarosa, chitosan y variados polímeros sintéticos). Estos compuestos son polímeros aniónicos que al interactuar con soluciones catiónicas conforman complejos polímeros viscosos homogéneos que permiten atrapar células y/o tejidos (*Uludag y cols 2000, Hsen Lee y cols 2004*). De ellos, el más utilizado es el alginato, que se obtiene de algas marinas de costas africanas y chilenas principalmente.

El microambiente y la historia ecológica de las algas es vital para el éxito de la obtención de alginato úti para la microencapsulación. Así es como *Edding y cols* reportaron el fracaso en la utilización de alginato para microencapsulación de 20 sitios distintos (*Edding y cols 1994* – paper de H Zimm). Las algas con características óptimas para la recuperación de alginato son *Lessonia Nigrescens* y *Lessonia Trabeculata*, que crecen específicamente en costas chilenas. Estos dos tipos de alga tienen ubicaciones geográficas y condiciones ambientales externas distintas. Mientras *L. Nigrescens* crece en la superficie resistiendo vientos y mareas, *L. Trabeculata* crece a 5-30 metros de profundidad. Esto hace que tengan características de elasticidad diferente, lo que se traduce en una constitución molecular distinta del alginato que contienen. *L. Nigrescens* es mucho más elástica y contiene un 60% de ácido manurónico, mientras *L. Trabeculata* es más rígida y presenta 90% de ácido gulorónico (*Vásquez JA y cols 1992, Venegas M y cols 1993, Leinfelder U 2003*).

El grupo de *Zimmermann y cols (2007)*, tiene la mayor experiencia mundial en el uso de alginato y microencapsulación. Ellos describen que una proporción 1:1 de ambas algas, para la obtención de alginato, permite recuperar concentraciones de ácido manurónico 35% y gulorónico 65% lo que da propiedades elásticas y mecánicas ideales para la microencapsulación. Es así como este grupo ha desarrollado una técnica sencilla y de bajo

costo para la obtención y purificación de alginato de alta viscosidad para uso clínico (UHV alginate 0,1%) (*Zimmermann U 2001 NY Acad Sci*).

6.3 Estabilidad y resistencia: disolución y recuperación de RNA.

La estabilidad y resistencia mecánica de las microesferas se refiere a la capacidad de mantener la integridad de las microesferas en el microambiente específico al que serán sometidas (injerto en músculo, peritoneo, subcutáneo, etc.). Así como también, a propiedades que permitan la disolución controlada del alginato para la recuperación de las células en este ambiente y así permitir estudios de biología molecular.

El primer hallazgo en nuestro proyecto fue la diferencia de tamaño de las microesferas (ME) debido a la viscosidad variable al usar una u otra técnica de microencapsulación (1,3% v/s 2% alginato de sodio). Al homogenizar estas condiciones se logró obtener resultados comparables.

Las microesferas Alginato-Polilisina-Alginato (ME APA) eran llamativamente más frágiles que las Microesferas Alginato-BaCl₂ (ME BaCl₂). Esto se refleja en la figura 21 en que se observó la disolución espontánea de las ME, así como frente a una ligera agitación del frasco de cultivo.

Para evaluar la disolución del alginato y recuperación celular, se probaron distintas soluciones utilizadas por otros autores con este fin (*Zimmermann H y cols 2007, Weber y cols 2002*). Las ME APA fueron disueltas fácilmente con citrato de sodio y carbonato de sodio a pH 8,8 y 9,5. Pero no se logró recuperar células vivas. Al utilizar EDTA 50 mM (*Groot y cols 2003, Weber y cols 2002*), se logró la disolución de las ME APA y ME CaCl₂ con baja vitalidad de las células recuperadas (36 y 23,6%). En ninguna de las condiciones anteriores se logró la disolución y recuperación de células en las ME BaCl₂. Lo mismo se intentó microencapsulando BSA (albúmina de suero de bovino) con las distintas técnicas de ME. Nuevamente, sólo se logró la disolución de las ME APA y CaCl₂. Sin embargo, la determinación de BSA en el medio no se consiguió por precipitación del alginato disuelto en contacto con el reactivo de Bradford, que contiene alcohol, que justamente es utilizado para precipitar el alginato durante el proceso de purificación.

Para evaluar el efecto de la ME sobre la expresión de mRNA de diversos genes se diseñó un protocolo, anexo a los objetivos de esta tesis, de recuperación de RNA de las ME BaCl₂. Utilizando un método de congelación y homogenización, en presencia de guanidina tiocianato o guanidina clorhidrato para la protección del material nucleico, y utilizando filtros de celulosa para concentrarlo y recuperarlo, se logró extraer RNA de las ME APA, CaCl₂ y BaCl₂ para estudios posteriores. Llama la atención que no se logró amplificar mRNA en las condiciones que tenían polilisina (reportado por provocar interferencia en PCR) (*Hoemann C y cols 2001*). Este experimento solucionó un problema en los proyectos llevados a cabo por los investigadores italianos (Universidad de Florencia), quienes buscaban evaluar la expresión de mRNA de colágeno tipo I en condrocitos microencapsulados (*Carossino y cols 2007*).

6.4 Permeabilidad

Se estudió la permeabilidad de las membranas semipermeables de alginato en condiciones *in vitro*, utilizando moléculas de distintos peso molecular o ensayos de flujo de agua libre (*Zimmermann y cols 2001 NY Acad Sci*). Utilizando alginatos en concentraciones de solución al 0,9% - 2%, se detectaron moléculas permeables de peso molecular hasta 147.8 kDa (*Petruzzo P y cols 1997*). Esto es vital al considerar que las inmunoglobulinas tienen pesos moleculares desde 150 a 950 kDa. (*Ouyang W y cols 2004*).

Otros autores, han utilizado microesferas complejas de múltiples capas de Glycol Chitosan-Alginato. En un estudio de *Sakai y cols*, se confirmó que la ME de 4 capas de este compuesto impide el paso de inmunoglobulinas y permite la difusión libre de glucosa, albúmina e insulina (*Sakai y cols 2000*).

Con base en esta evidencia, diseñamos el experimento de permeabilidad a BSA y fosfatasa alcalina (FA) en la ME desarrolladas (APA, CaCl₂ y BaCl₂). Con esto se logró corroborar la permeabilidad de albumina en los tres tipos de ME. Llamó la atención la menor permeabilidad detectada en las microesferas gelificadas con BaCl₂, sin embargo, el hecho de que sean permeables y más resistentes las hace más atractivas para su utilización en terapia celular. La menor permeabilidad incluso puede significar mayor protección frente a moléculas más grandes.

En cuanto a la permeabilidad de FA, se microencapsularon células SaOS₂ en Alginato-BaCl₂ 2% (ME BaCl₂). El método utilizado para determinar la actividad de FA es colorimétrico, en el que se agrega el sustrato de la enzima, *para-nitro-fenil-fosfato* (pNFP – 9kDa) que es metabolizado en *para-nitro-fenol* (pNF) de color amarillo, siendo ambas moléculas permeables en las ME. Estas células tienen una fracción de FA adherida a la membrana y otra fracción secretada (FA soluble – 84 kDa) (*Anh DJ y cols 2001*), por lo que la actividad medida en el medio condicionado da cuenta de la permeabilidad de la FA soluble en este tipo de ME.

Si bien no se logró la normalización por el contenido de DNA, podemos concluir que la actividad porcentual de FA en el medio condicionado es igual en la condición de cultivo en adhesión v/s microencapsulada (se sembró y microencapsuló el mismo número de células). Por lo tanto, comprobamos que células vivas son capaces de secretar una proteína de 84 kDa y que es permeable en la ME BaCl₂ 2%. Ello se evaluó también a 3 y 10 días de cultivo, no existiendo diferencias porcentuales de la actividad de FA total v/s soluble. Por lo tanto la permeabilidad no varió en el tiempo examinado.

6.5 Vitalidad

La vitalidad de las células microencapsuladas se estudió mediante técnicas de visualización por microscopia o espectrofotometría, de células vivas y muertas (calceína/propidio, JC1, MTT, etc.) (*Schneider y cols 2003*). En nuestros experimentos se logró dar cuenta de la vitalidad de las células microencapsuladas SaOS₂ a 3 y 10 días de incubación. Sin embargo, la prueba de vitalidad más fehaciente, es la mantención en el tiempo de los niveles de PTH en la paciente alotrasplantada. Junto con la evidencia de producción y liberación de PTH en el medio de ME con tejido paratiroideo remanente del primer Alotrasplante (> 2.500 pg/ml). Considerando todo lo anterior, hay muchos factores que deben ser considerados al momento de elegir el tipo de microencapsulación según células y tejido; se debe estudiar cuales son las condiciones óptimas para cada uno. Es así como recientemente *Moskalenko y cols* reportaron que la microencapsulación de células o clusters (acúmulos) celulares de paratiroides humana es mejor que la microencapsulación de tejido, ya que se observó necrosis periférica en esta última condición. Por otra parte, la calidad (homogeneidad y

superficie de las ME) es mucho mayor en las ME con células o acúmulos celulares (obtenidos por digestión enzimática con colagenasa II). A su vez, la respuesta al calcio extracelular y la vitalidad fue idéntica en el tejido digerido con o sin microencapsulación (*Moskalenko y cols 2007*).

6.6 Biocompatibilidad

Esto se refiere a la reacción del huésped frente a los distintos tipos de ME, hecho que se traduce en inflamación y fibrosis. Los alginatos comerciales son considerados altamente fibróticos (*Leinfelder y cols 2003*), por las impurezas que contienen. Los esfuerzos en purificar el alginato apuntan a disminuir el contenido de compuestos mitogénicos que aumentan la reacción a cuerpo extraño, inflamación y fibrosis.

Esto ha sido evaluado por medición de la activación de la cascada de las MAPK y test de estimulación de linfocitos, evidenciando que los alginatos obtenidos de algas chilenas son menos mitogénicos (*Zimmermann U y cols 2001 Wiley, Zimmermann U y cols 2001 NY Acad Sci, Leinfelder y cols 2003*). Sin embargo, se observa inflamación y fibrosis con todos los compuestos, una parte debida a la inflamación producida por el acto quirúrgico, pero no se puede descartar reacción inmune inespecífica (a cuerpo extraño). Es imposible saber en cuanto tiempo habrá una fibrosis tal que comprometa la vitalidad del tejido o células contenido en la ME. En nuestro proyecto se utilizó alginato comercial para el alotrasplante con 1 año y medio de funcionalidad de éste, confirmado por medición de PTH diferencial a 17 meses post injerto. Es posible que con alginato purificados la sobrevida sea aún mayor.

6.7 Inmunocompetencia:

La inmunocompetencia depende principalmente de la permeabilidad selectiva que evita el paso de inmunoglobulinas y moléculas del complemento (*Ouyang y col 2004*). Así, existen evidencias variadas de la citotoxicidad mediada por respuesta inmune específica que corroboran la inmunoprotección otorgada por las ME APA (*Okada y cols 1997*) y ME BaCl₂ (*Leinfelder y cols 2003*). Sin embargo, hay estudios que indican que la ME sólo retarda la respuesta inmune citotóxica del huésped contra el alotrasplante de paratiroides

(Bohrer T y cols 2006). Esto podría deberse a disolución de las microesferas en el tiempo por las condiciones del medio o por respuesta inflamatoria.

Cabe destacar, que los distintos autores mencionados realizaron sus experimentos con alginatos de algas distintas y a concentraciones distintas. Por lo tanto, la comparación de los resultados debe ser cuidadosa y debemos continuar el desarrollo y búsqueda de la mejor combinación de materiales y técnicas para cada tipo celular que nos interese microencapsular.

Lo anterior abre otro polo importante de desarrollo en tecnología aplicada en Chile, ya que son las especies de algas nativas en el país las que proporcionan una fuente ideal de obtención de alginato para microencapsulación.

6.8 Banco de tejidos y aplicación clínica

El Banco de tejidos creado durante el desarrollo de este proyecto, cuenta con la tecnología y controles internos de bioseguridad necesarios para criopreservar el tejido para su utilización posterior en trasplante. Este laboratorio fue creado para la criopreservación de tejido para trasplante de médula ósea, siendo aprobado por el Ministerio de Salud.

El Banco de Tejido de Paratiroides cuenta con infraestructura y personal adecuados, protocolos rigurosos de cadena de frío y de esterilidad, gran control en el registro y certificación de agentes patógenos. En nuestra experiencia inicial hemos visto el gran beneficio para cada uno de los pacientes, en caso de presentar un hipoparatiroidismo postquirúrgico. Es así como se ha logrado montar una herramienta terapéutica utilizada de regla en los grandes centros internacionales, la criopreservación de paratiroides para autotrasplante en pacientes con IRC sometidos a paratiroidectomía subtotal por hiperparatiroidismo.

El autotrasplante de tejido fresco, en el mismo acto operatorio, es un procedimiento sencillo y de bajo riesgo, que tiene gran efectividad (99%), debido probablemente a la gran capacidad angiogénica del tejido paratiroideo implantado (aumenta en 12 veces la expresión de VEGF) (*Carter y cols 2000*), logrando la vascularización a los 7 días y función endocrina con impacto clínico a las 2 semanas aproximadamente. (*Prigouris y cols 1996, Luts y cols 1998*).

Por otra parte, la efectividad del autotrasplante del tejido criopreservado es menor (aproximadamente 50%) (*Cohen y cols 2005*). Un factor que puede influir en la adecuada recuperación del tejido es el tiempo de criopreservación y los medios y métodos utilizados en ella. Con respecto a este punto, existen informes de casos exitosos de autotrasplante de paratiroides con 21 y 30 meses de criopreservación. (*De Menezes y cols 2007*). A este respecto, nuestro segundo autotrasplante fue completamente exitoso teniendo impacto clínico incluso una semana antes de lo esperado (con 24 meses de criopreservación).

Por otro lado, el alotrasplante de paratiroides es una alternativa terapéutica innovadora que ofrece una solución a pacientes sometidos a tiroidectomías totales que evolucionan con hipoparatiroidismo postquirúrgico, por resección inadvertida o compromiso vascular de sus glándulas paratiroides. Hay autores que han intentado el alotrasplante de paratiroides sin inmunosupresión y sin microencapsulación, con escaso impacto clínico. (*Nawrot y cols 2007*)

En los dos primeros casos no realizamos medición de PTH diferenciada (sangre periférica del sitio de injerto v/s sangre periférica alejada del sitio de injerto) en el postoperatorio, debido a la historia de hipoparatiroidismo comprobado. Específicamente en el segundo caso de autotrasplante (2 años de evolución), el rápido ascenso de la PTH en el postoperatorio permite asumir que el tejido paratiroideo injertado está vital y funcionando. En cuanto al caso de alotrasplante se evidencia una diferencia significativa (delta 1,5) a 17 meses de realizado el primer injerto, aún teniendo un segundo injerto en muslo. Esto permite asumir la funcionalidad del injerto del antebrazo, y explicar el poco impacto en los niveles de PTH del segundo injerto, que probablemente no funcionó más de un mes. Esto último se explicaría por rechazo a cuerpo extraño o por mala calidad del tejido criopreservado (distinto donante). Si bien, hubo respuesta clínica y elevación de los niveles de PTH (desde niveles indetectables), debemos considerar la variabilidad interensayo del kit de

determinación de PTH intacta que resta validez a los valores medidos en el caso de alotrasplante.

Por otra parte, se ha descrito el uso de Sestamibi Tc99m en casos de persistencia o recurrencia del hiperparatiroidismo secundario. Con esta técnica estimamos posible visualizar y tener seguimiento del tejido trasplantado en nuestros pacientes. (*Chou FF y cols 2002, Ohta H y cols 1996, Fuster y cols 2002*) Sin embargo, en el corto período de evolución y debido al bajo volumen de tejido funcionante esto no ha sido observado. De todas maneras, el Cintigrama Sestamibi Tc99m descartó la presencia de tejido funcionante remanente a nivel cervical que explicara el alza de los niveles de PTH.

6.9 HACIA EL FUTURO

Creemos que ésta tecnología puede mejorar el margen de seguridad en la cirugía de paratiroides y así ampliar la indicación quirúrgica en pacientes insuficientes renales que sufren de hiperparatiroidismo secundario, con lo que tendrán mayor posibilidad de ser beneficiarios de un trasplante renal. Con el dominio de esta metodología, y contando con un grupo multidisciplinario, podemos ofrecer un banco de tejido paratiroideo como centro de referencia para todos los pacientes con hipoparatiroidismo. Teniendo distintas alternativas de trasplante:

- 1) Autotrasplante en los pacientes intervenidos en nuestro centro con criopreservación de sus paratiroides.
- 2) Alotrasplante sin microencapsulación en pacientes con hipoparatiroidismo que además estén bajo inmunosupresión por un trasplante renal asociado.
- 3) Alotrasplante con microencapsulación, en pacientes con hipoparatiroidismo congénito o post tiroidectomía, a los que se podrá ofrecer un alotrasplante de tejido paratiroideo microencapsulado (sin necesidad de inmunosupresión).

También hemos logrado establecer sistemas de cooperación para agilizar el transporte y criopreservación de tejido paratiroideo de pacientes intervenidos en otros centros (Hospital Padre Hurtado y Hospital San José).

6.10 En Resumen...

La optimización de los cultivos de paratiroides, en cuanto a sobrevivencia y función a largo plazo se cumplió cabalmente a obtener una línea celular humana de paratiroides, que ofrece una fuente inagotable de tejido paratiroideo y múltiples posibilidades de investigación y aplicación terapéutica en el futuro. Existe un convenio con la Universidad de South Florida – EEUU para realizar el estudio de tumorigenicidad en ratas atómicas y así iniciar un estudio Fase I de alotrasplante de RCPTH en hipoparatiroidismo postquirúrgico.

Se montó exitosamente la técnica de microencapsulación celular, logrando evaluar características de permeabilidad, disolución, resistencia, vitalidad e inferir aspectos de biocompatibilidad de los tipos de ME utilizados. Incluso se logró montar la técnica para aplicación clínica.

Actualmente, estamos trabajando en la purificación de alginato de algas chilenas en conjunto con otros investigadores del país, lo que nos permitirá continuar con la aplicación clínica de estas técnicas y desarrollar un polo importante de tecnología aplicada en nuestro país.

Finalmente, y gracias a todo lo anterior logramos desarrollar una herramienta terapéutica de aplicación directa en pacientes sometidos a paratiroidectomía por hiperparatiroidismo secundario a IRC, que permitirá adelantar la indicación quirúrgica y permitirles entrar a lista de trasplante renal. Además de lograr establecer un alotrasplante de paratiroides como alternativa en hipoparatiroidismo postquirúrgico.

Actualmente hay 7 pacientes en lista de espera de alotrasplante de paratiroides (4 pacientes chilenos, 1 peruano, 1 venezolano y un paciente mexicano).

7. REFERENCIAS

Agarwal, Gauray; Barakate, Michael; Robinson, Bruce; Wilkinson, Margaret; Brraclough, Bruce; Reeve, Tom; Delbridge, Leigh. (2004) Intraoperative quick parathyroid hormone versus same-day parathyroid hormone testing for minimally invasive parathyroidectomy: A cost-effectiveness study. *Surgery* 130: 963-967.

Alfrey, E; Perloff, L; Asplund, M; Dafoe, D; Grossman, R; Bromberg, J; Holland, T; Naji, A; Barker, C. (1992) Normocalcemia thirteen years after successful parathyroid allografting in a recipient of a renal transplant. *Surgery* 111: 234-236.

Almaden, Y; Felsenfel, A; Rodriguez, M; Cañadillas, S; Luque, F; Bas, A; Bravo, J; Torregrosa, V; Palma, A; Ramos, B; Sanchez, C; Martin-malo, A; Canalejo, A. (2003) Proliferation in hyperplastic human and normal rat parathyroid glands: role of phosphate, calcitriol, and gender. *Kidney Int* 64: 2311-2317.

Allen, D.D., Martín, J., Arriagada, C., Cárdenas, A.M., Rapoport, S.I., Caviedes, R. y Caviedes, P. (2000) Impaired cholinergic function in cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 mice. *Eur J Neurosci* 12(9): 3259 - 3264.

Anh, DJ; Eden, A; Farley, JR. (2001) Quantitation of soluble and skeletal alkaline phosphatase, and insoluble alkaline phosphatase anchor-hydrolase activities in human serum. *Clin Chim Acta* 311: 137-148.

Anton, G; Decker, G; Stark, J; Botha, JR; Margolius LP. (1994) Allotransplantation of parathyroid cells. *Lancet* 345 Jan 14: 124.

Arnold, LJ; Dagan, A; Gutheil, J; Kaplan, O. (1979) Antineoplastic activity of poly(L-lysine) with some ascites tumor cells. *PNAS* 76(7): 3246-3250.

Bisello, A; Chorev, M; Rosenblatt, M; Monticelli, L; Mierke, D; Ferrari, SL. (2002) Selective Ligand-induced Stabilization of Active and Desensitized Parathyroid Hormone Type 1 Receptor Conformations. *J Biol Chem* 277(41): 38524 - 38530.

Bohrer, T; Stelter, K; Stelter I. S; Dietrich, C; Sitter, H; Hasse Ch. (2006) Microencapsulation of allogeneic parathyroid tissue succeeds by delaying immunization of the host, not by protecting the graft against the host's activated immune system. *Transplantationsmedizin* 18: 36-42.

Bradley, EC; Reichert, CM; Brennan, ME; Von Hoff, DD. (1980) Direct cloning of human parathyroid hyperplasia cells in soft-agar culture. *Cancer Res* 40(10): 3694-3696.

Brandi, ML; Fitzpatrick, LA; Coon, H; Aurbach, G. (1986) Bovine parathyroid cells: cultured maintained for more than 140 population doublings. *PNAS* 83: 1709-1713.

Brown, E; Gamba, G; Riccardi, D; Lombardi, M; Butters, R; Kifor, O; Sun, A; Hediger, M; Lytton, J; Hebert, SC. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca^{+2} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366(9): 575-580.

Cabané, P; Oviedo, S; Romero, C; Rossi, R; Caviedes, R; Caviedes, P. (2003) Cultivo primario e inmortalización de células de paratiroides para trasplante celular en hipoparatiroidismo postquirúrgico. *Rev Chil Cirugía* 55(6): 617-621.

Cabané P, Rossi R, Oviedo S, Romero C, Caviedes R y Caviedes P. (2006) Primera Línea Celular Inmortal de Paratiroides Humana. *Revista HCUCh* 17(1): 13 – 19.

Cabané, P; Gac, P; Amat V, J; Caviedes, R; Rossi, R; Caviedes, P. (2008) Allograft of microencapsulated parathyroid tissue in severe post-surgical hypoparathyroidism. Aceptado para publicación en *Transpl Proc*. Junio 2008

Cabané, P; Díaz, JC; Rojas, J; Maluenda, F; Rencoret, G; Saud, K; Godoy, L; Ibacache, D; Ledezma, A; Caviedes, R; Caviedes, P. (2007) Optimización de cultivos de hepatocitos humanos para estudios de citotoxicidad. *Rev Chil Cir* 59(2): 116-121.

Cameron, D; Hushen, J; Nazian, S; Willing, A; Saporta, S; Sanberg, P. (2001) Formation of Sertoli cell-enriched tissue constructs utilizing simulated microgravity technology. *Ann NY Acad Sc* 944: 420-428.

Cameron, D; Hushen, J; Nazian, S. (2001) Formation of insulin-secreting, sertoli enriched tissue constructs by microgravity coculture of isolated pig islets and rat sertoli cells. *In Vitro Cell Develop Biol* 37(8): 490-498.

Carossino, AM; Recente, R; Carossino, R; Piscitelli, E; Gozzini, A; Martineti, V; Mavilia, C; Franchi, A; Danielli, D; Aglietti, P; Ciardullo, A; Galli, G; Tongarini, I; Moggi, A; Cagnoni, M; Brandi, ML. (2007) Methodological models for in vitro amplification and maintenance of human articular chondrocytes from elderly patients. *Biogerontology* 8(5): 483-498.

Carter, WB; Crowell, SL; Boswell, CA; Williams, SK. (1996) Stimulation of angiogenesis by canine parathyroid tissue. *Surgery* 120(6): 1089-1094.

Carter, WB; Uy, K; Ward, MD; Hoying, JB. (2000) Parathyroid-induced Angiogenesis VEGF-dependent. *J Vasc Surg* 128(3):458-464.

Carter, WB; Uy, K; Ward, MD; Hoying, JB. (2000) Parathyroid-induced Angiogenesis VEGF-dependent. *Surgery* 128: 458-464.

Canalejo, A; Almaden, Y; Torregrosa, V; Rodriguez, M. (2000) The in vitro effect of calcitriol on parathyroid cell proliferation and apoptosis. *J Am Nephrol* 11: 1865-1872.

Caviedes, R.; Liberona, J.L.; Hidalgo, J.; Tascon, S.; Salas, K.; Jaimovich, E. (1992) A human skeletal muscle cell line obtained from an adult donor. *Bioch Biophys Acta* 1134: 247-255

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

Cohen, MS; Wells, SA Jr; Moley JF, Doherty, GM; Sicard, GA; Skinner, MK; Norton, JA; DeBenedetti, MK; Lairmore, TC. Long-term functionality of cryopreserved parathyroid autografts: a 13-year prospective analysis. Paper 9 in 26th Annual Meeting of the American Association of Endocrine Surgeons. April 3rd – 5th, 2005, Cancún.

Chen, Qingxian; Kaji, Hiroshi; Fu, Mei-Fway; Nomura, Rikako; Sowa, Hideaki; Yamauchi, Mika; Tsukamoto, Tatsuo; Sugimoto, Toshitsugu; Chihara, Kazuo. (2003) Effects of an excess and a deficiency of endogenous parathyroid hormone on volumetric Bone Mineral Density and bone geometry determined by peripheral quantitative computed tomography in female subjects. *J Clin Endocrin Metab* 88(10): 4655-4658.

Chou, Fong-Fu; Lee, Chiang-Hsuan; Chen, Hue-Yon; Chen, Jin-Bon; Hsu, Kuo-Tai; Sheen-Chen, Shyr-Ming. (2002) Persistent and recurrent hyperparathyroidism after total parathyroidectomy with autotransplantation. *Ann Surg* 235(1): 99-104.

Chunxiao, W; Jingjing, L; Yire, X; Min, D; Zhaohui, W; Gaofu, Q; Xiangchun, S; Xuejun, W; Jie, W; Taiming, L. (2007) Study on preparation and activity of a novel recombinant human parathyroid hormone (1-34) analog with N-terminal Pro-Pro extension. *Regul Pept* 141(1-3): 35-43.

Corbetta, S; Lania, A; Filopanti, M; Vicentini, L; Ballaré, E; Spada, A. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascade in human normal and tumoral parathyroid cells. *J Clin Endocrin Metab* 87(5): 2201-2205.

Dedeurwaerdere, F; Van Damme, B. (2001) Histopathology of the parathyroid glands. *Acta oto-rhino-laryngologica belg* 55: 95-101.

Demay, M; Kiernam, S; DeLuca, H; Kronenberg, H. (1992) Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *PNAS* 89: 8097-8101.

De Menezes, FL; Custódio, MR; Arap, SS; Reis, LM; Sonohara, S; Castro, IV; et al. (2007) Successful implant of long-term cryopreserved parathyroid glands after total parathyroidectomy. *Head Neck* 29(3):296-300.

Denkova, R; Bourneva, B; Baleva, K; Yaneva, E; Nakolov, B; Christov, L; Ivanov, I. (2000) Modulation of steroidogenesis in human ovarian granulosa cells during aging. *Endoc Regulations* 34: 157-160.

Dickson, B; Yang, H; Savekoll, H. Rowden, G. (2003) Islet transplantation in the discordant tilapia-to-mouse model: a novel application of alginate microencapsulation in the study of xenograft rejection. *Transplantation* 75: 599-606.

Drüeke, T. (2000) Cell biology of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 11: 1141-1152.

Eguchi, S; Hirata, Y; Imai, T; Kanno, K; Akiba, T; Sakamoto, A; Yanagisawa, M; Masaki, T; Marumo, F. (1992) Endothelin receptors in human parathyroid gland. *Biochem Biophys Res Communications* 184(3): 1448-1455.

Fasciotto, B; Gorr, S-U; Bourdeau, A; Cohn, D. (1990) Autocrine regulation of parathyroid secretion: Inhibition of secretion by chromogranin-A (Secretory protein-I) and potentiation of secretion by chromogranin-A and pancreastatin antibodies. *Endocrinology* 127(3): 1329-1335.

Fujii, Y; Moreira, J; Orlando, C; Maggi, M; Aurbach, G; Brandi, ML; Sakaguchi, K. (1991) Endothelin as an autocrine factor in the regulation of parathyroid cells. *PNAS* 88: 4235-4239.

Fuster D; Torregrosa, JV; Ortega, M; Mas, M; Martín, F; Setoain, FJ; et al. Diagnosis of recurrent secondary hyperparathyroidism using double-phase 99m-Tc-MIBI gammagraphy after total parathyroidectomy with autotransplantation. *Nefrología* 2002; 22(4):377-80

Gac, P; Cabané, P; Amat, J; Huidobro, F; Rossi , R; Rodríguez, M, Ferrada, C; Cardemil, F. Incidencia de hipocalcemia pos tiroidectomía total. Rev Med Chile 2007; 135: 26-30.

Garkavenko, O; Elliott, RB; Escobar, L; Muzina, M; Diatranz Ltd. Growing cells for xenotransplantation in culture. 20th Annual Scientific Meeting, Canberra, Australia 2002. The transplantation society of Australia.

Garret, J; Capuano, I; Hammerland, L; Hung, B; Brown, E; Hebert, S; Nemeth, E; Fuller, F. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. J Biol Chem 1995; 270(21): 12919-12925.

Groot, M; Leuvnink, H; Keizer, P; Fekken, Susan; Schuurs, T; van Shilfgaarde, R. Effective removal of alginate poly-L-lysine microcapsules from pancreatic islets by use of trypsin-EDTA. J Biomed Mat Res 2003; 67A(2): 679-683.

Hasse, C; Bohre, T; Barth, P; Stinner, B; Cohen, R; Cramer, H; Zimmerman, U; Rothmund, M. Parathyroid xenotransplantation without immunosuppression in experimental hypoparathyroidism: long-term in vivo function following microencapsulation with clinically suitable alginate. World J Surg 2000; 24: 1361-1366.

Hasse, Ch; Schrezenmeir, J.; Stinner, B.; Schark, C.; Wagner, P; Neumann, K; Rothmund, Matthias. Successful Allotransplantation of Microencapsulated parathyroids in rats. World J Surg 1994; 18: 630-634

Hasse, Ch; Klöck, G; Shlosser, A; Zimmermann, U; Rothmund, M. Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. Lancet 1997; 350: 1296-1297

Hsen Lee, C; Jiin Wang, Y; Ming Kuo, S; Jen Chang, S. Microencapsulation of parathyroid tissue with photosensitive poly(L-Lysine) and short chain alginate-co-MPEG. Art Organs 2004; 28(6): 537-542.

Hörandner, Helmut; Neyer, Ulrich. The regional classification of parathyroid tissue as used for tissue selection prior to autotransplantation. <http://www.uninet.edu/cin2003/conf/horandner/horandner.html>

Kald, BA; Mollerup, CL Risk factors for severe postoperative hypocalcemia after operations for primary hyperparathyroidism. *Eur J Surg* 2002; 168(10): 552-556.

Korbitt, GS; Elliot, JF; Rajotte, RV. Cotransplantation of allogeneic islets with allogeneic testicular cell aggregates allows long-term graft survival without systemic immunosuppression. *Diabetes* 1997; 46(2): 317-322.

Kunori, T; Tsuchiya, T; Itoh, J; Watabe, S; Arai, M; Satomi, T; Takakura, K, Yamaguchi, H. Improvement of postoperative hypocalcemia by repeated allotransplantation of parathyroid tissue without anti-rejection therapy. *Tohoku J Exp Med* 1991; 165(1):33-40.

Lahey, F.H. The transplantation of parathyroids in partial thyroidectomy. *Surg Gynecol Obstet* 1926; 62: 508-509.

Leinfelder, U; Brunnenmeier, F; Cramer, H; Schiller, J; Arnold, K; Vásquez, JA; Zimmermann, U. A highly sensitive cell assay for validation of purification regimes of alginates. *Biomaterials* 2003; 24: 4161-4172.

Lindblom, Pia; Westerdahl, Johan; Bergenfelz, Anders. Low parathyroid hormone levels after thyroid surgery: A feasible predictor of hypocalcemia. *Surgery* 2002; 131: 515-520.

Liu, B; Tang, J; Ji, J; Gu, J. The expression of functional human parathyroid hormone in a gene therapy model of osteoporosis. *Cell Tissue Res* 2004; 317(1): 57-63.

Liu, W; Ridefelt, P; Akerström, G; Hellman, P. Differentiation of human parathyroid cells in culture. *J Endocrin* 2001; 168: 417-425

Luts, Lena; Sundler, Frank. Autotransplantation of rat parathyroid glands. *Transplantation* 1998; 66(4): 446-453.

McHenry, CR; Stenger, DB; Calandro, NK. The effect of cryopreservation on parathyroid cell viability and function. *Am J Surg* 1997; 174:481

Marx, Stephen. Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. *N Engl J Med* 2000 Dec 21; 343(25): 1863-1875.

Masi, L; Cimaz, R; Simonini, G; Bindi, G; Stagi, S; Gozzini, A; Malentacchi, C; Brandi, ML; Falcini, F. Association of low bone mass with vitamin D receptor gene and calcitonin receptor gene polymorphism in juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29(10): 2225-2231.

Melick, RA; Gill, JR Jr; Berson, SA; Yalow, RS; Barter, FC; Potts, JT; Aurbach, GP. Antibodies and clinical resistance to parathyroid hormone. *N Engl J Med* 1967 Jan 19; 276(3): 144-147.

Mihai, R; Farndon, JR. Parathyroid disease and calcium metabolism. *Br J Anaesth* 2000; 85: 29-43.

Moskalenko, V; Ulrichs, K-, Kerscher, A; Blind, E; Otto, C; Hamelmann, W; Demidchik, Y; Timm, S. Preoperative valuation of microencapsulated human parathyroid tissue aids selection of the optimal bioartificial graft for human parathyroid allotransplantation. *Transpl Int* 2007; 20(8): 688-696.

Nawrot, I; Wozniewicz, B; Tolloczko, T; Sawicki, A; Gorski, A; Chudzinski, W; Wojtaszek, M; Grzsiuk, W; Sladowski, D; Karwacki, J; Zawitkowska, T; Szmidt, J. Allotransplantation of cultured parathyroid progenitor cells without immunosuppression: clinical results. *Transplantatio* 2007; 83(6): 734-740.

Neer, R; Arnaud, C; Zanchetta, J; Prince, R; Gaich, G; Reginster, J-Y; Hodsmann, A; Eriksen, E; Ish-Shalom, S; Genant, Harry; Wnag, O; Mitlak, B. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *NJM* 2001; 344(19): 1434-1441.

Neyer, Ulrich; Horandner, Helmut; Haid, Anton; Zimmermann, Gerhard; Niederle, Bruno. Total parathyroidectomy with autotransplantation in renal hyperparathyroidism: low recurrence after intra-operative tissue selection. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 625-629.

Olson, John; DeBenedetti, Mary; Baumann, Dirk; Wells, Samuel. Parathyroid Autotransplantation during thyroidectomy. *Ann Surg* 1996; 223: 472-480.

Ouyang, W; Chen, H; Jones, M; Metz, T; Haque, T; Martoni, C; Prakash, S. Artificial cell microcapsule for oral delivery of live bacterial cells for therapy : design, preparation, and i-vitro characterization. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2004, 7(3): 315-324.

Okada, N; Miyamoto, H; Yoshioka, T; Sakamoto, K; Katsume, A; Saito, H; Nakagawa, S; Ohsugi, Y; Mayumi, T. Immunological studies of SK2 hybridoma cells microencapsulated with alginate-poly(L)lysine-alginate (APA) membrane following allogeneic transplantation. *Bioch Biophys Res* 1997; 230: 524-527.

Ohta, H; Komibuchi, T; Nishimura, M; Nishimura, K; Nagao, Y; Watanabe, H. et al. ^{99m}Tc-MIBI accumulation in the parathyroid autograft in a patient with recurrent hyperparathyroidism. *Ann Nucl Med*. 1996; 10(2):247-9.

Pauls, T; Portis, F; Macri, E; Belser, B; Heitz, P; Diglioni, C; Celio, M. Parvalbumin is expressed in normal and pathological human parathyroid glands. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 105-111.

Petruzzo, P; Cappai, A; Ruiu, G; Dessy, E; Rescigno, A; Brotzu, G. Development of biocompatibl barium alginate microcapsules. *Transp Proc* 1997; 29: 2129-2130.

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.

Priguouris, S; Lorentziadis, M; Stylogiannis, S; Nafas, R; Masouras, A; Poulantzas, I. Experimental autotransplantation of the parathyroid gland. *Br J Surg* 1996; 83: 410-412.

Ricordi, Camillo. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nature Reviews* 2004; 4(April): 259-268.

Robertson, P. Islet transplantation as a treatment for diabetes: a work in progress. *N Engl Med* 2004; 350(7): 694-705.

Roussanne, MC; Gogusev, J; Hory, B; Duchambon, P; Souberbielle, JC; Nabarra, B; Pierrat, D; Sarfati, E; Drüeke, T; Bourdeau, A. Persistence of Ca²⁺-sensing receptor expression in functionally active, long-term human parathyroid cell cultures. *J Bone Mineral Res* 1998; 13: 354-362

Rudberg, C; Grimelius, L; Johanson, H; Ljunghall, S; Odselius, R; Pertoft, H; Rastad, J; Wide, L; Akerstrom, G. Alteration in density, morphology and parathyroid hormone release of dispersed parathyroid cells from patients with hyperparathyroidism. *Acta Path Microbiol Immunol Scand* 1986; 94(Sect. A): 253-261.

Sato, M.; MA, Y.L.; Hock, M.; Westmore, M.S.; Vahle, J.; Villanueva, A.; Turner, C.H. Skeletal efficacy with parathyroid hormone in rats was not entirely beneficial with long-term treatment. *JPET* 2002; 302: 304-313.

Sakaguchi, K. Acidic fibroblast growth factor autocrine system as a mediator of calcium-regulated parathyroid cell growth. *J Biol Chem* 1992; 267(34): 24554-24562.

Silver, Justin. Cycling with the parathyroid. *J Clin Invest* 2001; 107(9): 1079-1080.

Sakai, S; Ono, T; Ijima, H; Kawakami, K. Control of molecular weight cut-off for immunoisolation by multilayered glycol chitosan-alginate polyion complex on alginate-based microcapsules. *J Microencapsul* 2000; 17(6):691-699.

Sakwe, A; Engström, A; Larsson, M; Rask, L. Biosynthesis and secretion of parathyroid hormone are sensitive to proteasome inhibitors in dispersed bovine parathyroid cells. *J Biol Chem* 2002; 277(2): 17687-17695.

Schneider, S; Feilen, P; Cramer, H; Hillgärtner, M; Brunnemeir, F; Zimmermann, H; Weber, MM; Zimmermann U. Beneficial effects of human serum albumin on stability and functionality of alginate microcapsules fabricated in different ways. *J Microencapsul* 2003; 20(5): 627-636.

Shapiro, AM; Lakey, J; Ryan, E; Korbitt, E; Toth, E; Warnock, G; Kneteman, N; Rajotte, R. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl Med* 2000; 343(4): 230-238.

Sollinger, H.; Mack, E; Cook, K; Belzer, FO. Allograft transplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression. *Transplantation* 1983; 36(6): 599-602

Soto, ML; Del Rio, R; Alvarez, S; Martin, MS; Jara, A. Co-trasplante alógeno de células hepáticas e islotes en ratas diabéticas. *Mapfre Medicina* 2001; 12(3): 198-203.

Suarez-Pinzon, W; Korbitt, GS; Power, R; hooton, J; Rajotte, Ray; Rabinovitch, A. Testicular Sertoli cells protect islets (beta)-cells from autoimmune destruction in NOD Mice by transforming growth factor-(beta)1-dependent mechanism. *Diabetes* 2000; 49: 1810-1818.

Tanaka, Y; Funahashi, H; Imai, T; Seo, H; Tominaga, Y; Takagi, H. Oxyphil cell function in secondary parathyroid hyperplasia. *Nephron* 1996; 73(4): 580-6.

Tang, YL; Tang, Y; Zhang, C; Qian, K; Shen, L; Phillips, I. Improved graft mesenchymal stem cells survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1339-1350.

Timm, S; Otto, C; Begrich, D; Illert, B; Hamelmann, W; Ulrichs, K; Thiede, A; Timmermann, W. Short-term immunosuppression after rat parathyroid allotransplantation. *Microsurgery* 2003; 23(5): 503-507.

Timm, S; Otto, C; Hamelmann, W; Gassel, AM; Timmermann, W; Ulrichs, K; Thiede, A. Rat parathyroid allotransplantation: influence of MHC antigen expression on graft survival. *Microsurgery* 2001; 21(5): 221-222.

Timm, S; Hamelmann, W; Otto, C; Gassel, AM; Etzel, M; Ulrichs, K; Thiede, A; Timmermann, W. Influence of donor MHC class I antigen expression on graft survival after rat parathyroid allotransplantation. *Langenbecks Arch Surg* 2001; 386(6): 430-433.

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.

Tolloczko, T ; Wozniewicz, B; Sawicki, A; Górski, A. Allotransplantation of Cultured Human Parathyroid Cells: Present Status and Perspectives. *Transp Proc* 1997; 29: 998-1000.

Torregrosa, N; Rodriguez, JM; Llorente, S; Balsalobre, M; Rios, A; Majado, M; Gimeno, L; Parrilla, P. Tratamiento definitivo del hipoparatiroidismo persistente: alotrasplante de paratiroides. *Cir Esp* 2004; 75(2): 97-98.

Thomusch, Oliver; Machens, Andrea; Sekulla, Carsten; Ukkat, Jörg; Brauckhoff, Michael; Dralle, Henning. The impact of surgical technique on postoperative hypoparathyroidism in bilateral thyroid surgery: A multivariate analysis of 5846 consecutive patients. *Surgery* 2003; 133: 180-185.

Ulrich, F; Steinmüller, T; Rayes, N; Kleespieß, A; Grzonka, S; Gerlach, J; et al. Cryopreserved Human Parathyroid Tissue: Cell Cultures for In Vitro Testing of Function. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 666-667

Ulrich, F; Klupp, J; Thürner, F; Rayes, N; Seehofer, D; Tullius, SG; Geigle, P; Steinmüller, T; Neuhaus, P. Allograft transplantation of encapsulated human parathyroid tissue in patients with permanent hypoparathyroidism. *Transplantation* 2004; 78: 79.

Uludag, H; de Vos, P; Tresco, P. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 42: 29-64.

Usdin, TB; Gruber, C; Bonner, T. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 15455-15458.

Valdés, R; Elliot, R; Garibay, N; Garvavenko, D; Bracho, E; Macias, C; Silve, ML; Valencia, P. Safety and preliminary efficacy of porcine islets and sertoli cells implanted into an autologous collagen generatin device in type 1 diabetic humans. 5th International Congress of the Immunology of Diabetes Society 2001. Concurrent Session: Cell and Islet xenotransplantation. Chicago, IL, USA. 29 sept- 03 Oct. 2001.

van Raamsdonk, JM; Chang, PL. Osmotic pressure test: a simple, quantitative method to assess the mechanical stability of alginate microcapsules. *J Biomed Mater Res* 2001; 54(2): 264-271.

Wagner, PK. Cryopreservation of human parathyroid tissue. Effect of in vitro secretory behavior and morphology. *Fortschr Med* 1984; 102(39):989-992.

Weber, M; Steinert, A; Jork, A; Dimmler, A; Thürmer, F; Schütze, N; Hendrich, C; Zimmermann, U. Formation of cartilage matrix protein by BMP-transfected murine mesenchymal stem cells encapsulated in a novel class of alginates. *Biomaterial* 2002; 23: 2003-2013.

Winer, Karen, Wen Ko, Chia; Reynolds, James; Dowdy, Karen; Keil, Meg; Peterson, Donna; Gerber, Lynn; McGarvey, Charles; Cutler, Gordon. Long-term treatment of

hypoparathyroidism: A randomized controlled study comparing parathyroid hormone (1-34) versus calcitriol and calcium. *J Clin Endocrin Metab* 2003; 88(10): 4214-4220.

Wozniewicz, B. y cols. Cell Culture preparation of human parathyroid cells for allotransplantation without immunosuppression. *Tranplantation Proceedings* 1996; 28(6): 3542-3544.

Wu, JC; Chen, IY; Sundaresan, G; Min, JJ; De, A; Qiao, JH; Fischbein, MC; Gambir, SS. Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals using optical bioluminescence and positron emission tomography. *Circulation* 2003; 108(11): 1302-1305.

Zhang, P; Duchambon, P; Gogusev, J; Nabarra, B; Sarfati, E; Bourdeau, A; Drüeke, T. Apoptosis in parathyroid hyperplasia of patients with primary or secondary uremic hyperparathyroidism. *Kidney Int* 2000; 57: 437-445.

Zhu, YF; Ye, JL; Wang, SM. pCKM-mPTH recombinant plasmid therapy for hypoparathyroidism by polycationic liposome-mediated transfection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86(12): 837-840.

Zimmermann, H; Zimmermann, D; Reuss, R; Feilen, J; Manz, B; Katsen, A; Weber, M; Ihmig, FR; Ehrhart, F; Geßner, P; Behringer, M; Steinbach, A; Wegner, LH; Sukhorukov, VL; Vásquez, JA; Schneider, S; Weber, MM; Volk, F; Wolf, R; Zimmermann, U. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mat Sci* 2005; 16: 491-501.

Zimmermann, H; Wählich, F; Baier, C; Westhoff, M; Reuss, R; Zimmermann, D; Behringer, M; Ehrhart, F; Katsen-Globa, A; Giese, C; Marx, U; Sukhorukov, VL; Vásquez, JA; Jakob, P; Shirley, S; Zimmermann, U. Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials* 2007; 28: 1327-1345.

Zimmermann, U; Thürmer, F; Jork, A; Weber, M; Mimitz, A; Hillgärtner, M; Brunnenmeier, F; Zimmermann, H; Westphal, I; Fuhr, G; Nöth, U; Haase, A; Steinert,

A; Hendrich, C. A Novel Class of Antigenic Alginate microcapsules for Long-Term Immunosuppressed Transplantation. Ann NY Acad Sci 2001; 944: 199-215.

Zimmermann, U; Cramer, H; Jörk, A; Thürmer, F; Zimmermann, H; Fuhr, G; Hasse, Ch; Rothmund, M. Microencapsulated-based Cell Therapy. Biotechnology 2nd Edition (Volume10). Chapter 19. Edited by Rehm, Hans Jürgen / Reed, Gerald / Pühler, Alfred / Stadler, Peter. Wiley Edition - May 2001.



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombres:

Apellido Paterno:

Apellido Materno:

Por voluntad propia doy consentimiento para que se disponga de una muestra de biopsia de Glándula Paratiroides, destinada a estudiar y establecer una línea de células paratiroides como futuro tratamiento de trasplante celular en personas con déficit de producción de parathormona. Este estudio no constituye ningún riesgo para el paciente. La decisión de participar o no en el estudio no va alterar el tratamiento que sigue el paciente. Este estudio se prolongara en el tiempo hasta que se hayan obtenido biopsias de paratiroides suficientes para el establecimiento de una línea celular. El estudio será realizado por grupos de investigadores del Programa de Farmacología Molecular y Clínica del ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile bajo la dirección del Dr. Patricio Cabané; y en colaboración con médicos del Departamento de Cirugía del Hospital José Joaquín Aguirre.

La información generada deberá ser de absoluta confidencialidad y mi nombre, así como otros datos identificatorios personales, no podrán aparecer en ningún informe público derivado de este estudio. Consultas con respecto a este estudio se pueden realizar directamente con el Dr. Patricio Cabané Toledo al teléfono 6786075 o e-mail: pcaviede@machi.med.uchile.cl

Firma Paciente

Nombre, RUT y Firma del Médico.....

Hospital.....

Fecha : Día:.....Mes.....Año:.....

ANEXO 2

Los resultados de ésta tesis han sido presentados para publicación en diversas revistas con Comité Editorial:

Publicados

Cabané, P; Oviedo, S; Romero,C; Rossi, R; Caviedes, R; Caviedes, P. (2003) Cultivo primario e inmortalización de células de paratiroides para trasplante celular en hipoparatiroidismo postquirúrgico. Rev Chil Cirugía 55(6): 617-621.

Cabané P, Rossi R, Oviedo S, Romero C, Caviedes R y Caviedes P. (2006) Primera Línea Celular Inmortal de Paratiroides Humana. Revista HCUCh 17(1): 13 – 19.

Gac, P; Cabané, P; Amat, J; Huidobro, F; Rossi , R; Rodríguez, M, Ferrada, C; Cardemil, F. Incidencia de hipocalcemia pos tiroidectomía total. Rev Med Chile 2007; 135: 26-30.

Enviados a publicación (aceptados, en revisión)

Cabané, P; Gac, P; Amat V, J; Caviedes, R; Rossi, R; Caviedes, P. (2008) Allotransplant of microencapsulated parathyroid tissue in sever post-surgical hypoparathyroidism. Aceptado para publicación en Transpl Proc. Junio 2008

Cabané, P; Gac, P; Amat, J; Pineda, P; Saffie,A; Caviedes, P; Ortuondo, E ; Rodríguez, F; Alfaro, J; Caviedes, R; Massardo, T; Jaimovich, R. Criopreservación de Paratiroides: Banco de tejidos y su aplicación. Rev Med Chile 2008

Patentes

Patentamiento en proceso. Línea Celular RCPTH en convenio con Universidad de South Florida. WIPO.

