



ESTUDIO DE CORRELACIÓN ENTRE EL HIPOTIROIDISMO DE LARGA EVOLUCIÓN INDUCIDO EN LA RATA Y LA APARICIÓN DE HIPERPARATIROIDISMO

STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN HYPOTHYROIDISM OF LONG EVOLUTION INDUCED IN THE RAT, HAN THE APPARITION HYPERPARATHYROIDISM

Rueda JC¹, Criado MJ², Ortiz JA³, Mallo F⁴, Piñeiro L⁵, Larraz A⁶

¹ Catedrático E.U. Cirugía Universidad de Vigo. ² F.E.A. Anestesia. Complejo Hospitalario de Pontevedra.

³ Médico Adjunto. Servicio Anatomía Patológica. POVISA. Vigo.

⁴ Profesor Titular de Fisiología. Universidad de Vigo.

⁵ Jefe de Servicio de Farmacia. Complejo Hospitalario de Pontevedra.

⁶ Jefe de la Unidad de Cirugía Endocrino-Metabólica. Clínica Ruber. Madrid.

PALABRAS CLAVE

Hipotiroidismo, ratas, hiperparatiroidismo, Ki67, experimental.

HEY WORDS:

Hyperparathyroidism, rats, hypothyroidism, Ki67, experimental

CORRESPONDENCIA:

DR. JUAN CARLOS RUEDA CHIMENO
c/ Blanco Porto, 7 1º
36002. Pontevedra
juancarlosrueda@ctv.es

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La coexistencia de hiperparatiroidismo y tumores de tiroides y/o tiroiditis crónica se ha postulado como posible relación etiológica. El presente estudio experimental fue diseñado para comprobar la posible asociación de estas dos patologías teniendo como punto común el contexto de un estado hipotiroideo mantenido. **MATERIAL Y MÉTODOS.** Se utilizaron dos grupos de diez ratas Wistar y cada uno fue tratado como sigue: el grupo A recibió agua con antitiroideos (aminotiazole) y estabilizantes y el grupo B agua con los mismos estabilizantes pero sin el fármaco. A los diez meses las ratas fueron sacrificadas. **RESULTADOS.** A nivel histológico se comprobó la aparición de crecimiento difuso del tiroides compatible con hipotiroidismo inducido farmacológicamente en el 100% de las ratas tratadas con el antitiroideo. En las células paratiroides la observación microscópica simple no reveló diferencias significativas. Sin embargo, la evaluación del estado proliferativo celular paratiroides mediante el Ki67 evidenció un aumento estadísticamente significativo del estado mitótico de las células paratiroides en las ratas en las que se había generado un estado hipotiroideo de larga evolución. **CONCLUSIÓN.** Se desarrolla un hipotiroidismo histológicamente evidente tras 10 meses de tratamiento de las ratas Wistar con antitiroideos. Dicho estado de hipotiroidismo parece asociarse a un aumento en la proliferación de las células paratiroides.

SUMMARY

The authors have an experimental study in rats to evaluate the repercussions of different pathologic situations of the thyroid gland, associated with a chronic hypothyroid state.

INTRODUCCIÓN

El hiperparatiroidismo es la causa más frecuente de hipercalcemia en pacientes menores de 50 años de edad¹. Se ha descrito una incidencia de 15 a 40 nuevos casos por cada 100.000 habitantes y año. Las mujeres se ven afectadas dos a cuatro veces más que los hombres y la incidencia aumenta después de la cuarta década.

El diagnóstico se hace habitualmente en los estadios iniciales de la enfermedad porque la hipercalcemia es detectada de manera fortuita cuando los pacientes realizan una analítica rutinaria de sangre. Así, la mayoría de los pacientes son asintomáticos aunque pueden tener ya pérdida significativa de hueso especialmente si son mujeres menopáusicas².

Las asociaciones etiológicas incluyen³:

* Radiación de cabeza y cuello durante la infancia.

* Tratamiento con yodo radiactivo

* Predisposición genética tal como Neoplasia Endocrina Múltiple (MEN) tipo I y 2 A .

* Hiperparatiroidismo familiar.

* Tratamiento con sustancias tales como litio administradas para enfermedades psiquiátricas.

Durante tiempo la asociación de lesiones tiroideas con hiperparatiroidismo primario ha sido motivo de estudios clínicos. Sin embargo, esta asociación ha sido considerada fortuita por muchos autores porque son enfermedades endocrinas relativamente comunes.

En 1947 se describe la asociación de mixedema e hiperparatiroidismo ⁴.

Una revisión de varias series descubrió que entre 10 y 54% de los pacientes con hiperparatiroidismo tenían patología tiroidea. La coexistencia fortuita es presentada por Kaplan y Lever que estudiaron 124 pacientes con hiperparatiroidismo primario y encontraron que 54% tenían anomalías macroscópicas en tiroides. Estos pacientes fueron comparados con un grupo control sin hiperparatiroidismo y encontraron más o menos la misma incidencia de anomalías en tiroides. Así concluyeron que no había diferencia estadísticamente significativa en la prevalencia de patología tiroidea entre los pacientes que presentaban hiperparatiroidismo y el grupo control⁵.

En otras sí parece haber relación entre la presencia de enfermedad tiroidea e hiperparatiroidismo. Se describe una alta incidencia de enfermedad tiroidea en el hiperparatiroidismo, casi un 20%⁶. Es más, la incidencia de hipotiroidismo y esta patología llega a ser del 47% en alguna otra serie.

El intervalo entre el inicio del hipotiroidismo y el desarrollo de hiperparatiroidismo fue de 30 años en algunos casos, un amplio período para los efectos de TSH circulante elevada.

A nivel experimental existe escasa bibliografía que evalúe la asociación de hiperparatiroidismo y enfermedades tiroideas como exponen algunos de los autores de artículos clínicos⁵.

El denominador común entre estos desórdenes puede ser un estado hipotiroideo clínico o subclínico mantenido⁷.

Esta hipótesis es la que pretendemos evaluar a nivel experimental en ratas Wistar.

Por tanto, los objetivos de este estudio son:

* Inducción y mantenimiento de hipotiroidismo farmacológico en rata Wistar.

* Comprobar el posible desarrollo de hiperparatiroidismo y su cuantificación morfológica

MATERIAL Y MÉTODOS

Dos grupos de 10 ratas hembras Wistar fueron mantenidas durante 10 meses en un estabulario en sus condiciones habituales.

• Grupo A fue tratado con:

- antitiroideos, aminotriazole (AMT) 3gr/l)
- albúmina de suero bovino (BSA) 1gr/l
- CLH (6 ml/l)
- agua cantidad suficiente para 1 litro de solución.

• Grupo B fue tratado con la misma mezcla pero sin antitiroideos.

Los dos grupos tomaron sus respectivos preparados durante diez meses como única fuente de bebida. Todas las ratas comieron lo mismo y se mantuvieron en el mismo habitat.

Se eligieron ratas hembras porque la prevalencia de hiperparatiroidismo es mayor en ellas.

Tras diez meses se realizaron los siguientes pasos:

- Extracción bajo Anestesia Gral (atropina, diazepam y ketamina intraperitoneal) de sangre canalizando yugular interna derecha con cánula de silicona previamente heparinizada. Se desecharon los primeros 2 cc y los 4 cc siguientes se pasaron a un tubo con EDTA siendo posteriormente ultrafiltrados y el suero congelado para posterior determinación de TSHrta, PTH, T4, P y Calcio en una segunda fase del estudio.

- Sacrificio de las ratas y obtención del bloque faringo-traqueal que incluye tiroides y paratiroides. Las piezas se fijaron en formol para posterior inclusión en parafina.

Con estos bloques incluidos en parafina se hicieron cortes seriados de 3 micras de grosor y se tiñeron con Hematoxilina-eosina. Se seleccionaron de cada caso aquellos cortes en los que aparecieron las paratiroides junto a la tiroides al ser revisados con microscopio óptico.

Asimismo, se realizó el estudio inmunohistoquímico utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón que reacciona frente al antígeno Ki67 ^{8,9} que es una proteína nuclear que se expresa durante las fases activas del ciclo celular, G1, S, G2 y M, desapareciendo rápidamente en el resto de las células, G0.

El fundamento del proceso inmunohistoquímico consiste, brevemente, en un sistema de detección que está encaminado a la producción de una señal de color. La gran mayoría de estos sistemas se basan en ligar al anticuerpo una enzima que cataliza la reacción de una sustancia que llamamos cromógeno produciendo un precipitado de color. La complejidad del sistema empleado suele estar encaminada a obtener una amplificación de la señal, esto es, conseguir que por cada molécula de anticuerpo 1º unida, se introduzcan cuantas más unidades de enzima sea posible.

El proceso se basa en que la avidina o la estreptavidina son proteínas que presentan una altísima afinidad por la molécula de biotina y así las usaremos para conseguir una amplificación de la señal. Usaremos un anticuerpo 2º, que lleva unidas moléculas de biotina covalentemente, como puente entre el anticuerpo 1º y la enzima, que se introduce unida a avidina o estreptoavidina. Con esto conseguimos, por un lado, amplificar enormemente la señal ya que cada anticuerpo 2º puede ir conjugado con varias moléculas de biotina y a cada molécula de avidina o estreptavidina se le puede unir más de una molécula de enzima, por tanto hemos multiplicado la cantidad de unidades de enzima que introducimos por cada anticuerpo 1º unido al antígeno. Por otro lado, podemos reducir significativamente los tiempos de los pasos intermedios debido a la rapidez de la interacción Av-Bi. El resultado final es, como habíamos dicho, la tinción nuclear de aquellas células que están en proceso de división, dando así una idea del grado de proliferación celular de ese tejido estudiado, en nuestro estudio las glándulas paratiroides. El nº total de núcleos Ki 67 positivos en la sección entera del tejido fue dividido por el área de la sección que se calcula aplicando la fórmula matemática de la elipse, proporcionando así una evaluación del

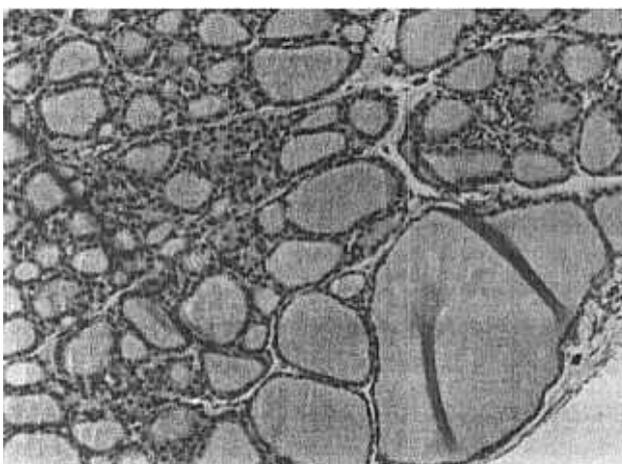


Figura 1.- Tiroides de aspecto normal. Cápsula fina con predominio de los folículos de mayor tamaño en la periferia. Corresponde a las ratas del Grupo B.

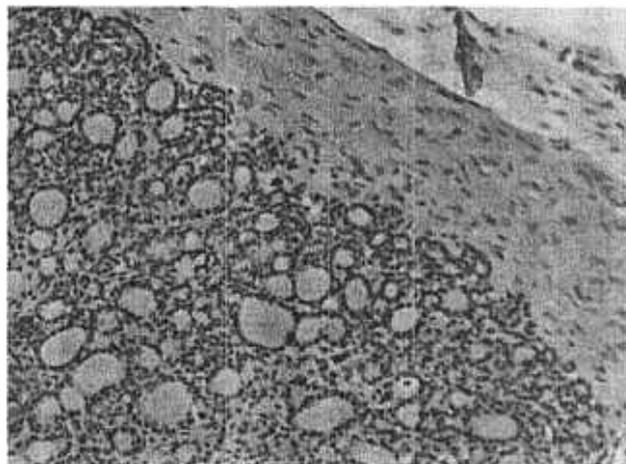


Figura 2.- Rata del grupo A. Gran engrosamiento capsular y pérdida de la zonación periférica de los folículos de mayor tamaño.

conjunto de la sección y no de áreas seleccionadas del mismo corte. Las mediciones de los diámetros se realizaron con el microscopio óptico y se usó el factor de corrección correspondiente para convertirlas en micras.

RESULTADOS

Después de 10 meses de tratamiento el estudio histológico reveló que el grupo A tratado con antitiroideos había efecti-

vamente desarrollado un hipotiroidismo claro como esperábamos. En cambio en el grupo B que no había tomado los antitiroideos la imagen observada difería claramente de la primera.

La **Figura 1**, grupo B, muestra un tiroides normal con los folículos externos más dilatados, descrito como zonación periférica de los folículos de mayor tamaño, y el epitelio de estos más plano, indicativo de menor actividad, además de ausencia de grasa.

Tabla I

DATOS MORFOMÉTRICOS DE LOS FOLÍCULOS TIROIDEOS EN LAS RATAS TRATADAS CON ANTITIROIDEOS. GRUPO A

GRUPO A	CÁSPSULA MICRAS	DIAM. MÁX. FOL.PERIF.	DIAM. MÍN FOL.PERIF.	ÁREA MICRAS ² FOL.PERIF.	DIAM. MÁX. FOL.PERIF.	DIAM. MÍN FOL.PERIF.	ÁREA MICRAS ² FOL.PERIF.
MEDIA	280,3	32,05	29,65	764,42982	33,7	30,4	812,2803
MEDIANA	282,25	30,00	28,25	693,11550	35,0	30,0	819,7613
DESV.ST.	63,42	6,59	5,63	288,57945	5,12	3,57	190,5655
PERCENT.25	239,37	27,88	25,75	563,81903	30,0	27,5	677,4075
PERCENT.75	326,875	36,75	35,00	907,13700	37,50	34,25	975,8595

Tabla II

DATOS MORFOMÉTRICOS DE LOS FOLÍCULOS TIROIDEOS EN LAS RATAS QUE NO RECIBIERON ANTITIROIDEOS. GRUPO B

GRUPO B	CÁSPSULA MICRAS	DIAM. MÁX. FOL.PERIF.	DIAM. MÍN FOL.PERIF.	ÁREA MICRAS ² FOL.PERIF.	DIAM. MÁX. FOL.CENT.	DIAM. MÍN FOL.PERIF.	ÁREA MICRAS ² FOL.PERIF.
MEDIA	36,25	125,55	104,2	10281,868	34,9	37,0	1026,7927
MEDIANA	33,75	130,0	106,0	10469,382	35,0	35,00	975,8595
DESV. ST.	14,00	20,64	24,80	3039,8660	6,79	5,12	295,3286
PERCENT. 25	26,87	108,13	80,25	8165,2148	30,25	32,50	810,4346
PERCENT. 75	42,50	138,75	128,00	11362,775	39,00	42,75	1237,0050

Tabla III

TEST DE MANN-WHITNEY APLICADO A ÁREA DE FOLÍCULOS CENTRALES, PERIFÉRICOS Y DIMENSIONES DE LA CÁPSULA DEL GRUPO A CON RESPECTO AL GRUPO B

	AREA PERIF.	ÁREACENTRAL	CÁPSULA
Mann-Whitney U			
Wilcoxon W			
Z			
Asymp.Sig. (2-tailed)			
Exact.Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0.000 ^a	0.143 a	0.000 ^a

a: no corregido por colas

La **Figura 2**, grupo A presenta desaparición de la imagen de zonación periférica de los folículos de mayor tamaño característica de los tiroides normales. El epitelio está constituido por células más altas, casi cúbicas y más agrupadas, signo de mayor actividad. Además la cápsula está muy engrosada con respecto a la del grupo B.

A pesar de que la imagen era suficientemente sugestiva de las diferencias entre los dos grupos se procedió a la realización del estudio estadístico. Para ello se compararon las cápsulas, los folículos periféricos y los centrales de ambos grupos tras realizar mediciones con el microscopio óptico del grosor de las cápsulas y de los diámetros mayor y menor de los folículos.

Se aplicaron los tests no paramétricos, dado el número de casos, concretamente el de Mann-Whitney y se observó que había diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre las cápsulas y los folículos periféricos, no existiendo sin embargo en el caso de los folículos centrales. **Tablas I-III.**

En cuanto a las paratiroides, se encontraron en todos los casos en nº de dos de localización externa y posterior, siendo el corte coronal el que nos facilitó más su localización. Se

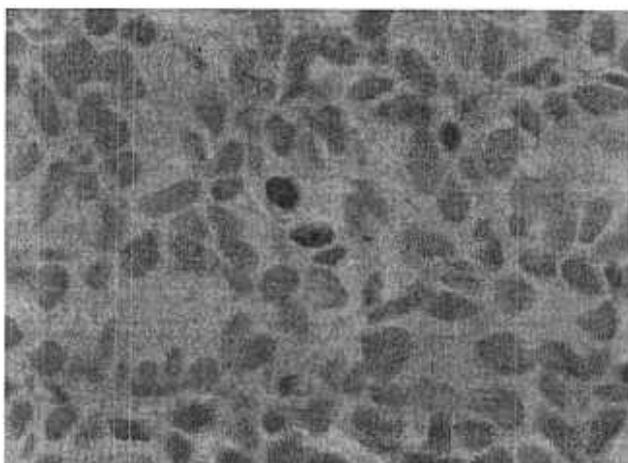


Figura 3.- Células paratiroides con tinción positiva con el Ki67.

Tabla IV

VALORES DE Ki67 Y DATOS MORFOMÉTRICOS DE LAS CÉLULAS PARATIROIDEAS EN LAS RATAS TRATADAS CON ANTITIROIDEOS. GRUPO A

GRUPO A	Ki67+	DIAM.MAYOR MICRAS	DIAM.MENOR MICRAS	ÁREA MICRAS ²
MEDIA	17,2	592	416	192595,79
MEDIANA	19	550	425	185432,94
DESV.ST.	6,12	88,29	87,08	44623,16
PERCENT. 25	13,75	540	380	168468,3
PERCENT. 75	21,25	700	462	236798,1

Tabla V

VALORES DE Ki67 Y DATOS MORFOMÉTRICOS DE LAS CÉLULAS PARATIROIDEAS EN LAS RATAS NO TRATADAS CON ANTITIROIDEOS. GRUPO B

GRUPO B	Ki 67+	DIAM.MAYOR MICRAS	DIAM.MENOR MICRAS	ÁREA MICRAS ²
MEDIA	6,30	782	538	331988,58
MEDIANA	5	775	550	308858,55
DESV.ST.	3,77	120,26	93,78	92641,92
PERCENT. 25	3,75	737,50	440,00	263599,88
PERCENT. 75	8,25	850,00	597,50	364818,30

Tabla VI

APLICACIÓN DEL TEST DE MANN-WHITNEY PARA Ki67 EN GRUPOS A Y B

	Ki67+	Ki67+ /ÁREA
Mann-Whitney U		
Wilcoxon W		
Z		
Asymp.Sig.(2-tailed)		
Exact.Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		

a: no corregido por colas

encontraban recubiertas de tejido conectivo y eran más largas que anchas. Sin embargo, la microscopía óptica no nos permitió apuntar la posibilidad de existencia de diferencias entre grupos que sugiriese tendencia a hiperparatiroidismo como se había sugerido a nivel experimental ¹.

Esto nos indujo a realizar un segundo intento de comprobación de las posibles diferencias entre A y B a través del estudio inmunohistoquímico.

Para esto fue necesario realizar el conteo de los núcleos teñidos o Ki67 positivos y para constatar de forma objetiva la

Tabla VII

APLICACIÓN DEL TEST DE MANN-WHITNEY
PARA DIÁMETROS MAYOR Y MENOR Y ÁREA
EN GRUPOS A Y B

	DIÁMETRO MAYOR	DIÁMETRO MENOR	ÁREA
Mann-Whitney U	8,000	16,000	0,000
Wilcoxon W	63,000	71,000	55,000
	3,211	-2,584	-3,781
Asymp.Sig.(2-tailed)	0,001	0,010	0,000
Exact.Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	0,001 ^a	0,009 ^a	0,000 ^a

a: no corregido por colas

existencia o no de proliferación de las células paratiroides
Figura 3.

El conteo fue realizado sin saber a que grupo pertenecían los cortes.

Una vez hecho esto se procedió al estudio estadístico de los resultados aplicando nuevamente el test de Mann-Whitney (Tablas IV-IX) resultando ser estadísticamente significativa la diferencia entre el grupo A y el B en cuanto a nivel de proliferación celular, ($p < 0.01$) en el tejido paratiroideo, confirmando por tanto la tendencia al desarrollo de hiperparatiroidismo en el primer grupo en el que se había inducido un hipotiroidismo farmacológico y apoyando así la hipótesis propuesta de que el hipotiroidismo mantenido está relacionado con el desarrollo de hiperparatiroidismo.

DISCUSIÓN

El primer objetivo de este estudio era desarrollar un modelo de hipotiroidismo crónico no quirúrgico a nivel experimental.

Se obtuvo en las ratas tratadas con antitiroideos un importante engrosamiento de la cápsula tiroidea como ya había sido descrito en ratas hipotiroideas¹⁰.

Además, se constató la pérdida de la "zonalización periférica" de los folículos tiroideos más grandes como evidencia del desarrollo de hipotiroidismo a nivel histológico.

El segundo objetivo consistía en la constatación de la probable asociación de hiperparatiroidismo a hipotiroidismo a nivel experimental.

Las observaciones de autores de la asociación entre tiroiditis de Hashimoto y/o hipotiroidismo con hiperparatiroidismo³ forman la base de la hipótesis de que el estado hipotiroideo puede predisponer al desarrollo de hiperparatiroidismo.

El denominador común entre estos estudios parece ser el estado hipotiroideo¹¹. Algunos hablan de hiperplasia de paratiroides hasta en el 95% de los casos de este hipotiroidismo mantenido a lo largo del tiempo sea clínico o subclínico y del 30% de aumento del PTH circulante. Pueden pasar años desde el momento de inicio del estado hipotiroideo si este es subclínico y la aparición o diagnóstico del hiperparatiroidismo.

A nivel experimental¹ se ha descrito la elevación de PTH con descenso de fósforo en sangre y calcemia normal. Este fenómeno podría explicarse por el breve período en el que los animales fueron estudiados, 12 semanas, motivo por el cual en nuestro estudio decidimos conservar las ratas bajo las condiciones experimentales a las que fueron sometidas durante 10 meses. Así, es de esperar, que apareciendo estos cambios precursores del hiperparatiroidismo con el tiempo el hiperparatiroidismo provoque la aparición de hipercalcemia.

Sin embargo, en nuestro estudio no hemos hallado con simple microscopía óptica los cambios histológicos en el grupo A que sugiriesen el desarrollo de hiperparatiroidismo primario en ninguno de los casos estudiados, como se había sugerido en el citado ensayo experimental¹, y ello nos llevó a utilizar la inmunohistoquímica como herramienta de apoyo diagnóstico para constatar la existencia o no de proliferación celular paratiroidea de forma más objetiva y reproducible.

La elevación mantenida de TSH estimula el crecimiento del tiroides. La actuación de dicha hormona podría vincularse a la estimulación de la producción de diversas sustancias estimulantes del crecimiento celular como son el factor de crecimiento epidérmico [EGF], entre otros.

El EGF y otros posibles factores podrían desarrollar su función estimulante de crecimiento celular de forma inespecífica tanto sobre la célula tiroidea como sobre las células paratiroides.

Entendemos que tanto prolactina como la hormona liberadora de tirotrópina podrían desarrollar algún papel en este proceso, todo ello unido a la confirmación por RIA de los distintos valores hormonales que permitan confirmar a nivel humoral la existencia de hipotiroidismo asociado a hiperparatiroidismo.

Sin embargo, la explicación de dicho fenómeno escapa a las posibilidades del presente estudio, que se limita a la consecución de un modelo de hipotiroidismo crónico en la rata y a la constatación histológica objetiva de proliferación celular paratiroidea en dicho contexto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Walker RP, Solapas R, Ernst K, Hessel P, Nayyar R, Lawrence AM, Paloyan E: Hyperparathyroidism Induced by Hypothyroidism. *Laryngoscope* 1993, 103:263-267.
2. Silverberg SJ, Shane E, Jacobs TP, Siris E and Bilezikian JP: A 10-year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery. *NEJM* 1999, 341, 17: 1249-1269.
3. Walter RP and Paloyan E: The Relationship Between Hashimoto's Thyroiditis, Thyroid Neoplasia, and Primary Hyperparathyroidism. *Otolaryngol Clin North Am* 1999, 23:291-302.
4. Kissin M and Bakst H: Coexisting myxedema and hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1947, 7: 152-156.
5. Lever EG, Refetoff S, Straus FH, Nguyen M and Kaplan EL: Coexisting Thyroid and Parathyroid Disease-Are They Related?. *Surgery* 1983, 94:893-900.

6. Hathaway K. Harvey,MD.: *Disorders of The Thyroid and Parathyroid. The Otolaryngologic Clinics Of North America* 1990, Vol. 23, N.2.
7. Lever, E.G.: *Primary Hyperparathyroidism Masked by Hypothyroidism. Am J Med.* 1983, 74:144-147.
8. Key G, Kubbutat MH and Gerdes J. *Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. J Immunol Methods* 1994, 177: 113-7.
9. Scholzen T and Gerdes J. *The Ki67 protein: from the known and the unknown [review]. J Cell Physiol* 2000,182: 311-22.
10. Wollman SH and Herveg JP. *Thyroid capsule changes during development of thyroid hyperplasia in the rat. Am J Pathol* 1978, 93: 639-654.
11. Walker PR, Kazuko E, Gopaisami C, Bassali J, Lawrence AM and Paloyan E. *Hyperparathyroidism associated with a chronic hypothyroid state. Laryngoscope* 1997, 107; 7: 903-9.