

Las células C tiroideas están disminuidas en la hernia diafragmática experimental*

L. Martínez¹, M. De Ceano-Vivas¹, S. González-Reyes¹, V. Fernández-Dumont¹, W.M. Calonge¹, E. Ruiz², J.I. Rodríguez², J.A. Tovar²

¹Departamentos de Cirugía Pediátrica, ²Anatomía Patológica, Hospital Universitario La Paz, Madrid. Hospital Universitario Santa Cristina, Madrid.

RESUMEN: Introducción/objetivo. La hernia diafragmática congénita (HDC) experimental a menudo se asocia con malformaciones de origen neurocristal. Algunas de estas alteraciones están también presentes en la entidad humana, por lo que el mecanismo patogénico podría ser similar. El objetivo de este trabajo es estudiar si las células parafoliculares tiroideas (células C), también directamente derivadas de la cresta neural, son anormales en este modelo animal.

Metodos. Ratas gestantes fueron expuestas a 100 mg de nitrofen por vía intragástrica (grupo nitrofen) o 1 mL de excipiente (grupo control) en el día 9,5 de gestación. Los fetos fueron recuperados en el día 21 de gestación y los tiroides de aquellos que presentaban HDC (68%) fueron procesados para su estudio inmunohistoquímico con anticuerpo anticalcitonina. El número de células teñidas por campo microscópico de gran aumento fue establecido usando un método informático automatizado en al menos 5 cortes de cada tiroides. Se estudió igualmente la distribución de las células dentro de la glándula. Las comparaciones entre grupos se hicieron con métodos no paramétricos, estableciendo un nivel de significación estadística de $p < 0,05$.

Resultados. El número total de células estaba reducido drásticamente en los animales del grupo nitrofen comparados con los controles ($23,1 \pm 37$ vs $101,2 \pm 61,3$; $p < 0,0001$). La histología del tiroides fue similar en los 2 grupos, pero la distribución de las células parafoliculares dentro de la glándula seguía un patrón anormal en el grupo nitrofen.

Conclusiones. El herbicida nitrofen induce una disminución severa del número total de células parafoliculares así como una distribución anormal de las mismas dentro del tiroides. Estos resultados refuerzan la evidencia del papel patogénico de una disregulación de la cresta neural como mecanismo de esta malformación en roedores. La semejanza del modelo experimental y la HDC en humanos invita a realizar investigaciones paralelas en las 2 especies.

Correspondencia: Dr. Leopoldo Martínez Martínez. Departamento de Cirugía Pediátrica. Hospital Universitario «La Paz». P. de la Castellana, 261, 28046, Madrid, Spain.

Email: lmartinezm.hulp@saludm.madrid.org

*Trabajo subvencionado parcialmente por las ayudas FIS (Fondo de Investigación Sanitaria) #01/0532 and #02/1220 FIS y por Beca de Investigador Asociado del Hospital Universitario La Paz.

*Trabajo presentado en el XLIV Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica y XIII Congreso de la Sociedad Portuguesa de Cirugía Pediátrica. Funchal, Madeira, Portugal, 18-21 Mayo 2005.

Recibido: Mayo 2005

Aceptado: Febrero 2006

PALABRAS CLAVE: Hernia diafragmática congénita; Nitrofen; Cresta neural; Células parafoliculares.

THYROID C CELLS ARE DECREASED IN EXPERIMENTAL CDH

ABSTRACT: Background/aim. Experimental CDH is often associated with malformations of neural crest origin. Several of these features are present in human CDH and therefore likely similar pathogenic mechanisms should be explored. The aim of the present study is to examine whether thyroid C-cells, another neural crest derivative, are abnormal in this rat model.

Methods. Pregnant rats were exposed either to 100 mg of 2-4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether (nitrofen) or vehicle (controls) on 9.5 day of gestation. Fetuses were recovered on day 21st and the thyroids of those with CDH (68%) were immuno-histochemically stained with anti-calcitonin antibody. The number of positively stained cells per high power field were counted using a computer-assisted image analysis method in at least 5 sections per thyroid. The distribution of the cells within the gland was assessed as well. Comparisons between CDH and control rats were made by non-parametric tests with a significance threshold of $p < 0.05$.

Results. The number of c-cells was dramatically reduced in CDH animals in comparison with controls (101.2 ± 61.3 vs 23.1 ± 37 , $p < 0.0001$). Histology of the thyroid was similar in both groups, but the distribution of positive C-cells within the gland followed an abnormal pattern in CDH rats with the cells tending to be located at the periphery rather than at the core of the lobes.

Conclusions. Nitrofen induces a severe decrease in thyroid C cells accompanied by abnormal distribution patterns. These results add further evidence of the involvement of a neural crest dysregulation as a component of the pathogenesis of experimental CDH. Whether there is or not a clinical counterpart to these findings is still unknown, but the nature of the cardiovascular and crano-facial malformations in some babies with CDH strongly support further research in this field.

KEY WORDS: Congenital diaphragmatic hernia; Nitrofen; Neural crest; Parafollicular cells.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia de los pacientes con hernia diafragmática congénita (HDC) viene básicamente determinada por el

Tabla I Estructuras derivadas de la cresta neural

<i>Tipo celular</i>	<i>Tejidos y órganos con células de la CN</i>
Adipocitos	Tejido adiposo
Neuronas adrenérgicas	Médula adrenal
Angioblastos	Vasos sanguíneos
Células productoras de calcitonina (células parafoliculares o cél. C)	Cerebro
Mesénquima cardíaco	Tejido conectivo
Neuronas colinérgicas	Esqueleto craneofacial
Condroblastos y condrocitos	Cartílagos craneofaciales
Células cromafines	Dermis
Fibroblastos	Ojo (córnea, coroides, esclera, músculos pupilares y ciliares)
Células gliales	Tejido conjuntivo glandular (paratiroides, tiroides, timo, hipófisis, lacrimal)
Melanocitos	Corazón (arco aórtico, tabique, tronco-cono)
Odontoblastos	Sistema nervioso parasimpático
Osteoblastos y osteocitos	Sistema nervioso periférico
Células de Rohon-Beard	Ganglios espinales
Células satélite	Sistema nervioso simpático
Células de Schwann	Células tiroideas (células C)
Neuronas sensitivas	Papila y dentina
Algunos mioblastos estriados y lisos (i.e. músculos intraoculares)	Cuerpo último branquial

grado de hipoplasia pulmonar presente al nacimiento⁽¹⁻³⁾. Sin embargo, otros factores como las malformaciones asociadas contribuyen de forma significativa al pronóstico de estos pacientes^(4, 5). Muchas de estas malformaciones afectan de manera directa a órganos derivados directamente de la cresta neural. Esta estructura embrionaria transitoria aparece de forma precoz en el desarrollo a ambos lados del tubo neural a medida que éste comienza a cerrarse. Las células neurocristales entonces migran a diferentes partes del embrión, contribuyendo al desarrollo y diferenciación de diversas partes del mismo. Éstas incluyen huesos y cartílagos del cráneo y cara, el oído medio, el timo, las paratiroides, los grandes vasos cardíacos, el sistema nervioso entérico o los melanocitos (Tabla I)⁽⁶⁾. Las células C tiroideas o células parafoliculares forman parte del sistema neuroendocrino conocido como sistema APUD y también están derivadas directamente desde las células de la cresta neural. Su papel en la síntesis, almacenaje y excreción de calcitonina, una hormona involucrada en la homeostasis del calcio, facilita su tinción con técnicas de inmunohistoquímica, por lo que representan un fácil marcador de alteraciones de la cresta neural en diversos modelos experimentales⁽⁷⁾.

Existen varios modelos que reproducen la HDC en animales. El más usado es el inducido con el herbicida nitrofen, entre otras razones porque no sólo es capaz de provocar el defecto herniario, sino también las alteraciones que la acompañan en el humano. De este modo, la hipoplasia pulmonar, la inmadurez bioquímica, las cardiopatías congénitas o las alteraciones craneofaciales que, entre otros, presentan los pacientes con HDC, también están presentes en las ratas o ratones expuestos a nitrofen⁽⁸⁻¹¹⁾. Muchas de estas malformaciones y otras estudiadas hasta la fecha tan sólo en animales⁽¹²⁾ afectan a órganos derivados de la CN, motivo por el que puede especularse sobre una alteración en esta estructura como factor etiológico de la HDC.

En este trabajo partimos de la hipótesis de que las células C tiroideas, derivadas directamente de la CN, están alteradas en el modelo experimental de HDC inducida con nitrofen.

MÉTODOS

Animales de experimentación. Empleamos 10 ratas Sprague-Dawley hembras vírgenes de 220-250 g de peso y machos de fertilidad probada. Los animales fueron alojados en las instalaciones del laboratorio experimental del hospital La Paz de Madrid y fueron alimentados con el granulado especial y agua de bebida *ad libitum*. Su manipulación se ajustó a las exigencias de la Unión Europea vigentes (E.C. 86/L609) y a las recogidas en el R.D. 223/1988.

Las hembras fueron enjauladas con macho (3x1) para su fecundación durante una noche. El día 0 de la gestación fue contado a partir del momento en que en el frotis vaginal se demostró la presencia de espermatozoides. Las ratas fueron entonces divididas de forma aleatoria en dos grupos: control (n=5) y nitrofen (n=5).

En el día 9,5 de gestación se administró a las madres del grupo nitrofen una dosis de 100 mg de nitrofen diluido en 1 mL de aceite de oliva puro por vía intragástrica. A los animales del grupo control se les administró por la misma vía el mismo volumen de excipiente.

Los fetos fueron recuperados en el día 21 de gestación (término=22). Tras ser sacrificados, fueron pesados y examinados para evaluar la presencia de HDC y otras malformaciones. Finalmente los animales fueron conservados en formol al 10% durante al menos 7 días tras los cuales se extrajo con ayuda de un microscopio quirúrgico el bloque formado por la tráquea y ambos lóbulos tiroideos.

Procesamiento de los tiroides. Los bloques obtenidos fueron parafinados y cortados en planos coronales con un grosor de 3 mm, tiñendo uno de cada 10 con hematoxilina/eosina hasta alcanzar el área máxima de superficie tiroidea. Siguiendo una metodología descrita previamente⁽¹³⁾, se escogieron desde este punto el primero, quinto, décimo, decimoquinto y vigésimo cortes para ser procesados mediante técnica inmunohistoquímica. De esta manera se aseguró una

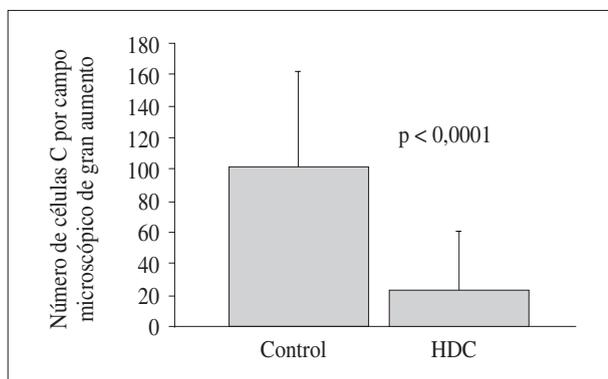


Figura 1. Número total de células C en los grupos control y HDC.

correcta evaluación del número de células C presentes en cada tiroides.

Inmunohistoquímica. Las cinco secciones obtenidas fueron pretratadas con peróxido de hidrógeno y metanol, incubadas con suero de cabra e incubadas de nuevo con anticuerpo anticalcitonina de conejo (Dako Diagnostic, Glostrup, Dinamarca). Posteriormente, las preparaciones fueron tratadas con el anticuerpo secundario correspondiente y, por último, reveladas con diaminobenzidina y contrateñidas con hematoxilina de Mayer^(14, 15).

Contabilización de las células. Las imágenes resultantes tras la inmunohistoquímica fueron digitalizadas mediante una cámara digital (Evolution LC, MediaCybernetics, Estados Unidos) adaptada a un microscopio óptico (Olympus CX40, Hamburgo, Alemania). Las células teñidas positivas en cada sección tiroidea fueron contabilizadas mediante un software de análisis de imagen (Image ProPlus v5.0.1, MediaCybernetics, Estados Unidos). Para evitar sesgos, el conteo se realizó al menos en dos ocasiones separadas por un período de tiempo superior a 2 semanas. Como las células C tiroideas siguen un patrón de distribución regular y constante dentro de la glándula tiroidea en todos los mamíferos^(16, 17), también se analizó la localización de las células en ambos grupos experimentales. El análisis estadístico se realizó mediante tests no paramétricos con un nivel de significación estadística $p < 0,05$.

RESULTADOS

De los 45 fetos expuestos a nitrofen, 31 (68,8%) presentaban una HDC, que en todos los casos fue derecha y que no se encontró en ningún feto del grupo control. Se escogieron de manera aleatoria 10 fetos con HDC y otros 10 controles (2 fetos por camada) para la evaluación de las células C tiroideas.

El número de células C tiroideas fue significativamente inferior en el grupo con HDC que en los controles ($23,1 \pm 37$

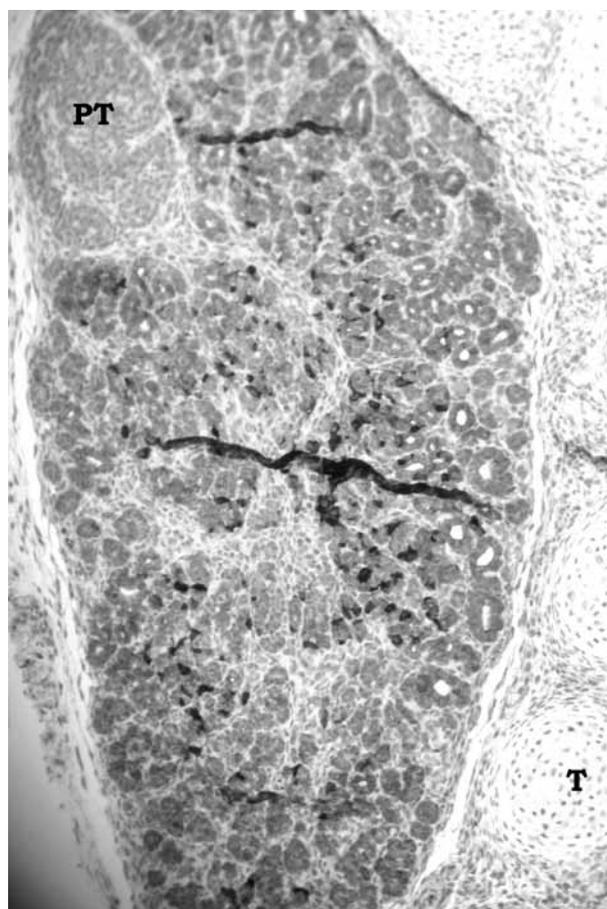


Figura 2. Sección coronal del lóbulo tiroideo derecho de un feto control. Las células C están teñidas con anticuerpo anticalcitonina y aparecen en color más oscuro. Su distribución sigue un patrón característico en el centro de la glándula. PT: paratiroides. T: tráquea. Magnificación original x200.

vs $101,2 \pm 61,3$, $p < 0,01$) (Fig. 1). En el grupo control la distribución de las células seguía un patrón constante y acorde con las descripciones previas^(16, 18, 19), con mayor número en las áreas centrales y menor en ambos polos y en la periferia (Fig. 2). Sin embargo, en el grupo nitrofen, 3 animales de los 10 analizados tenían células parafoliculares en un hemitiroide pero ninguna en el otro. En todas las restantes glándulas analizadas la distribución de las células siguió un patrón anormal, localizándose tanto en la periferia como en ambos polos tiroideos, hecho que no ocurrió en ningún animal del grupo control (Fig. 3). En uno de los animales, además, existía una ectopia tímica.

DISCUSIÓN

Este trabajo demuestra una severa alteración en las células parafoliculares tiroideas en el modelo de HDC inducida

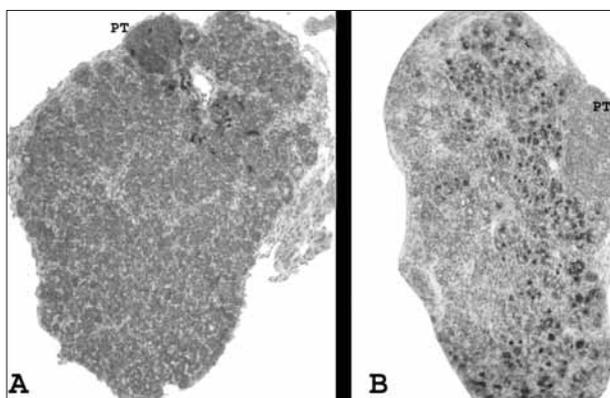


Figura 3. Fotomontaje que muestra sendos cortes coronales de 2 hemitiroides de animales del grupo experimental. A) Número anormalmente disminuido de células C, con localización ectópica en la periferia y dentro de la glándula paratiroides (PT). B) Distribución anómala de las células dentro del tiroides, con presencia en ambos polos y cerca de la periferia. Magnificación original x200.

con nitrofen. Al igual que muchas otras malformaciones estudiadas en este modelo, ésta es un reflejo directo de una disfunción en la migración, desarrollo o diferenciación de las células de la CN, por lo que podemos suponer un papel etiológico de esta estructura en la HDC experimental.

A pesar de ser un modelo establecido, poco se conoce sobre el mecanismo de acción del nitrofen. Según los datos experimentales, este herbicida actuaría como un oxidante interfiriendo los procesos intracelulares de oxidación y reducción, y alterando las cascadas moleculares involucradas en la organogénesis precoz⁽²⁰⁻²²⁾. Diversos estudios apoyan esta teoría, así como el hecho de que otros teratógenos que son capaces de inducir HDC también actúen como oxidantes⁽²³⁻²⁵⁾.

A nivel molecular, posiblemente los mecanismos sobre los que actúa el nitrofen tengan relación con el control ejercido por algunos genes reguladores del desarrollo embrionario. Algunos de estos genes son los Hox, factores de transcripción que, desde la mosca del vinagre hasta el humano, se encargan de la segmentación anteroposterior del organismo activando o desactivando otros genes por debajo de ellos⁽²⁶⁾. En los mamíferos, los 39 genes Hox existentes se encuentran divididos en 4 grupos en 4 cromosomas distintos. De los estudios hechos con animales mutantes en los que la función de un gen Hox determinado se pierde o se multiplica, sabemos que algunos de ellos están involucrados en la formación de estructuras derivadas de la cresta neural. Así, los ratones mutantes o knock-out para Hoxa3 son atímicos, aparatirodeos, tienen cardiopatías conotruncales y un fenotipo similar al del síndrome de DiGeorge, así como un número de células C tiroideas disminuido^(27, 28). Los knock-out para Hoxa5 presentan obstrucción laringotraqueal e histología pulmonar anormal⁽²⁹⁾, y los mutantes combinados para Hoxa3, Hoxb3 y Hoxd3 exhiben un fenotipo peculiar que afecta tanto a las vértebras cervicales como a los órganos derivados del tercer y

cuarto arco branquial⁽³⁰⁾. Además, los knock-out para TTF-1, gen diana de algunos genes Hox e involucrado en la organogénesis pulmonar, presentan una hipoplasia pulmonar similar a la de los animales con HDC⁽³¹⁾. De todo ello podemos deducir que, probablemente, el mecanismo de acción del teratógeno pase por alterar la expresión de alguno de estos u otros genes e interferir así, entre otros procesos, con la migración o diferenciación de las células de la CN. El hecho de que esta migración coincida con la ventana embrionaria en la que el nitrofen produce la HDC en las ratas gestantes (día 9,5 aproximadamente) no haría sino avalar esta teoría.

Las células C o parafoliculares del tiroides derivan del cuerpo último branquial, una porción ventral alargada del cuarto bolsón faríngeo que se desprende de la pared de la faringe para descender hasta contactar con el tiroides, con quien se funde de manera que sus células se distribuyen dentro de la glándula en un proceso que termina aproximadamente el día 14 de gestación en el ratón⁽³²⁻³⁴⁾. El hecho de que en el grupo control existan tanto tiroides sin células parafoliculares como otros con alteraciones en la distribución de las mismas, habla a favor de una alteración en los procesos de migración celular o en la interacción de las células de la CN con el mesénquima del cuerpo último branquial.

Las similitudes entre las malformaciones asociadas a la HDC en el modelo experimental y las observadas en el humano, hacen pensar que el mecanismo etiopatológico de ambas está relacionado. No existen estudios en humanos que valoren el contenido o la función de las células parafoliculares en los tiroides de los pacientes con HDC; probablemente, los datos revisados de las necropsias así como los estudios funcionales de los supervivientes nos permitan aclarar si, como cabe suponer, las células C son anormales en la HDC humana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jesudason EC. Challenging embryological theories on congenital diaphragmatic hernia: future therapeutic implications for paediatric surgery. *Ann R Coll Surg Engl* 2002;**84**:252-259.
2. Paranka MS, Clark RH, Yoder BA, Null DM, Jr. Predictors of failure of high-frequency oscillatory ventilation in term infants with severe respiratory failure. *Pediatrics* 1995;**95**:400-404.
3. Thibeault DW, Olsen SL, Truog WE, Hubbell MM. Pre-ECMO predictors of nonsurvival in congenital diaphragmatic hernia. *J Perinatol* 2002;**22**:682-683; author reply 684.
4. Robert E, Kallen B, Harris J. The epidemiology of diaphragmatic hernia. *Eur J Epidemiol* 1997;**13**:665-673.
5. Martínez-Frias ML, Prieto L, Urioste M, Bermejo E. Clinical/epidemiological analysis of congenital anomalies associated with diaphragmatic hernia [errata aparecida en *Am J Med Genet* 1996 May 17;63(2):416]. *Am J Med Genet* 1996;**62**:71-76.
6. Le Douarin N, Kalcheim C. *The neural crest*. Cambridge University Press, Cambridge, UK 1999.
7. Copp D. Calcitonin: discovery, development, and clinical application. *Clin Invest Med* 1994;**17**:268-277.

8. Jesudason EC, Connell MG, Fernig DG, Lloyd DA, Losty PD. Early lung malformations in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2000;**35**:124-127; discussion 128.
9. Alfonso LF, Arnaiz A, Alvarez FJ, Qi B, Diez-Pardo JA, Vallisi-Soler A, Tovar JA. Lung hypoplasia and surfactant system immaturity induced in the fetal rat by prenatal exposure to nitrofen. *Biol Neonate* 1996;**69**:94-100.
10. Migliazza L, Xia H, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Skeletal malformations associated with congenital diaphragmatic hernia: experimental and human studies. *J Pediatr Surg* 1999;**34**:1624-1629.
11. Migliazza L, Otten C, Xia H, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Cardiovascular malformations in congenital diaphragmatic hernia: human and experimental studies. *J Pediatr Surg* 1999;**34**:1352-1358.
12. Yu J, Gonzalez S, Rodriguez JI, Diez-Pardo JA, Tovar JA. Neural crest-derived defects in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 2001;**17**:294-298.
13. Monsour PA, Kruger BJ, Barnes A. Calcitonin cell population and distribution in the thyroid gland of the rat. *J Morphol* 1985;**186**:271-278.
14. Palacios J, Gamallo C, Garcia M, Rodriguez J. Decrease in thyrocalcitonin-containing cells and analysis of other congenital anomalies in 11 patients with DiGeorge anomaly. *Am J Med Genet* 1993;**46**:641-646.
15. Gamallo C, Garcia M, Palacios J, Rodriguez J. Decrease in calcitonin-containing cells in truncus arteriosus. *Am J Med Genet* 1993;**46**:149-153.
16. Sawicki B, Zabel M. Immunocytochemical study of parafollicular (C) cells of the thyroid in some wild rodents. *Anat Anz* 1999;**181**:173-180.
17. Sarrat R, Torres A, Whyte J, Lostale F. Peculiarities of the thyroid gland structure (with special reference to the presence of ganglion cells). *Histol Histopathol* 1994;**9**:95-103.
18. Wolfe HJ, DeLellis RA, Voelkel EF, Tashjian AH, Jr. Distribution of calcitonin-containing cells in the normal neonatal human thyroid gland: a correlation of morphology with peptide content. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;**41**:1076-1081.
19. Kameda Y. The occurrence and distribution of the parafollicular cells in the thyroid, parathyroid IV and thymus IV in some mammals. *Arch Histol Jpn* 1971;**33**:283-299.
20. Schnitzer JJ. Control and regulation of pulmonary hypoplasia associated with congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2004;**13**:37-43.
21. Kling DE, Aidlen JT, Fisher JC, Kinane TB, Donahoe PK, Schnitzer JJ. Nitrofen induces a redox-dependent apoptosis associated with increased p38 activity in P19 teratocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 2005;**19**:1-10.
22. Losada A, Tovar JA, Xia HM, Diez-Pardo JA, Santisteban P. Down-regulation of thyroid transcription factor-1 gene expression in fetal lung hypoplasia is restored by glucocorticoids. *Endocrinology* 2000;**141**:2166-2173.
23. Mey J, Babiuk RP, Clugston R, Zhang W, Greer JJ. Retinal dehydrogenase-2 is inhibited by compounds that induce congenital diaphragmatic hernias in rodents. *Am J Pathol* 2003;**162**:673-679.
24. Solomon HM, Wier PJ, Johnson CM, Posobiec LM, Rendemonti JE, Rumberger DF. Benzofuranyl ureas with potent cardiovascular teratogenicity in rats. *Teratology* 2000;**61**:211-221.
25. Taleporos P, Salgo MP, Oster G. Teratogenic action of bis(dichloroacetyl) diamine on rats: patterns of malformations produced in high incidence at time-limited periods of development. *Teratology* 1978;**18**:5-15.
26. Veraksa A, Del Campo M, McGinnis W. Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol Genet Metab* 2000;**69**:85-100.
27. Chisaka O, Musci TS, Capecchi MR. Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene Hox-1.6. *Nature* 1992;**355**:516-520.
28. Chisaka O, Capecchi MR. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene hox-1.5. *Nature* 1991;**350**:473-479.
29. Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Berard J, Jeannotte L. Early postnatal lethality in Hoxa-5 mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol* 1997;**192**:432-445.
30. Manley NR, Capecchi MR. Hox group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Dev Biol* 1997;**192**:274-288.
31. Minoo P, King RJ. Epithelial-mesenchymal interactions in lung development. *Annu Rev Physiol* 1994;**56**:13-45.
32. Pearse A, Carnevali A. Cytochemical evidence for an ultimobranchial origin of rodent thyroid C cells. *Nature* 1967;**214**:929-930.
33. Pearse A. Calcitonin and the C cells: role models for the neuroendocrine system. *Bone Miner* 1992;**16**:166-168.
34. Ayer-Le Lievre C, Fontaine-Perus J. The neural crest: its relations with APUD and paraneuron concepts. *Arch Histol Jpn* 1982;**45**:409-427.