

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

"DESARROLLO Y COMPROBACION DE  
UN METODO PARA LA  
CRIOCONSERVACION DE  
GLANDULAS PARATIROIDEAS"

AUTOR: D. JOSE IGNACIO MARTINEZ PUEYO

DIRECTOR: DR. D. FELIPE DE LA CRUZ VIGO

SUPERVISOR: PROF. D. FELIPE DE LA CRUZ CARO

TESIS REALIZADA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA  
Y CIRUGIA

MADRID, SEPTIEMBRE de 1992.

## INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

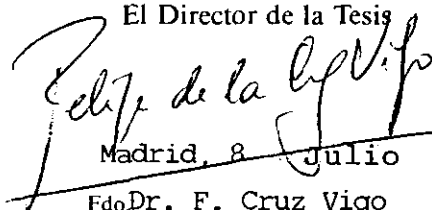
El trabajo de investigación realizado por D. JOSE IGNACIO MARTINEZ PUEYO, sobre "DESARROLLO Y COMPROBACION DE UN METODO PARA LA CRIOCONSERVACION DE GLANDULAS PARATIROIDIAS", cumple los requisitos metodológicos, tiene la suficiente calidad y muestra el rigor científico requeridos para ser defendida por el autor como Tesis Doctoral.

V.º B.º  
EL TUTOR (2)

Fdo.: \_\_\_\_\_  
(fecha y firma)

D.N.I.:

El Director de la Tesis



Madrid, 8 Julio 1992

Fdo. Dr. F. Cruz Vigo  
(fecha y firma)

D.N.I.: 31.184.342-E

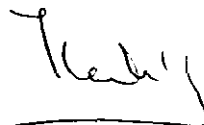
## INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral "Desarrollo y comprobación de un método para la crioconservación de glándulas paratiroidias", realizada por D. Jose Ignacio Martínez Pueyo, bajo la dirección del Prof. F. de la Cruz Vigo, ha sido considerada por el Consejo del Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión  
Consejo Departamento

13 de Julio 1.992

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. J.L. Balibrea  
(fecha y firma)

15 de Julio 1.992

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO PARCIALMENTE FINANCIADA  
CON UNA AYUDA DEL F.I.S.S. PARA LA INVESTIGACION

A MI FAMILIA

## **AGRADECIMIENTOS**

Desde que decidí comenzar la formación MIR para llegar a ser especialista en Cirugía general y del Aparato Digestivo hasta el momento actual, han transcurrido unos cuantos años, en los que he ido cubriendo etapas como profesional y como ser humano.

La idea de realizar este trabajo data de 1984, y es sin duda el aspecto de mi vida profesional que más esfuerzos ha requerido. Pero desde el primer momento en que D. Felipe de la Cruz Vigo y yo decidimos ponernos en marcha para esbozar el plan de trabajo, han sido innumerables las personas que me han prestado su ayuda y me han animado a seguir adelante en esta ardua labor, impidiendo que el desánimo diera al traste con este trabajo. En estos años me han demostrado su amistad. A todas estas personas les debo mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar al Profesor D. Felipe de la Cruz Caro, Jefe del Servicio de Cirugía General al que pertenezco y Catedrático de Patología Quirúrgica. En todo momento ha sido ejemplo de Humanidad y de Amor a la Medicina. Bajo su dirección me he formado como Cirujano. Gracias por su confianza. Gracias por sus continuos consejos y permanente aliento. Gracias por la supervisión de este trabajo.

Al Dr. D. Felipe de la Cruz Vigo, Director de esta Tesis Doctoral. Por su gran paciencia, meticulosidad y rigor científico en todo trabajo que emprende, que contagia a los que estamos a su alrededor. Pero sobre todo, gracias

por su amistad.

A la Dra. Doña María Luisa Larrodera, médico del Laboratorio de Bioquímica donde hemos realizado la parte analítica del trabajo, por su inestimable colaboración. Pero principalmente gracias por su generosidad, por sus consejos y enseñanzas, por su interés, por su confianza en este proyecto. Gracias a los ATS de su laboratorio por el esfuerzo realizado.

Gracias a D. Joaquin Otero, Jefe de Sección del Servicio de Microbiología (Laboratorio de Virus), por sus consejos para llevar a cabo la congelación del tejido. Gracias por su ayuda en la preparación de los medios de cultivo.

A Gema Rodríguez, ATS del laboratorio de virus. Ella se ha encargado de preparar los medios de cultivo y los crioviales con gran paciencia y dedicación.

Al Dr. D. Juan Enrique Riese, que ha sido el artífice de todo el trabajo con las células. Sin su saber hacer, este trabajo habría estado condenado al fracaso. Me ha enseñado a pipetear, teñir, contar células, decantar, y un sinfín de técnicas más. Cuando los resultados eran desalentadores, allí estaba su ánimo para volver a empezar. Tengo la suerte de contar con su amistad.

A Antibióticos-Farma S.A., que puso a mi disposición sus recursos materiales y humanos para realizar este trabajo.

A la Dra. Irene Vegh, del Servicio de Oncología Médica, por su insistencia en que siguiera adelante. Gracias por su ayuda en la corrección del texto.

Gracias a la Dra. Maria Victoria Castells, del Servicio de Anestesia y Reanimación, por su ayuda en el capítulo de Técnica Anestésica y por su ayuda en la corrección del texto.

Gracias a la Dra. Sandra Blanco por su ayuda en el apartado de Embriología y Anatomía. Su Tesina ha sido de gran ayuda.

A las personas que trabajan en el Laboratorio de Retipaje del Servicio de Hematología. Todo han sido facilidades y simpatía a la hora de pedir sueros.

A los componentes del Servicio de Nefrología, por su colaboración en el manejo de los pacientes.

Gracias a todos y cada uno de mis compañeros del Servicio de Cirugía General "A", por permitirme trabajar a su lado; por sus enseñanzas desde que llegué a este Servicio; porque al realizar ellos sus Tesis Doctorales me



han servido de estímulo para seguir adelante. Gracias en especial al Dr. D. José María Menéndez Rubio, compañero en el quehacer de cada día.

A los Médicos Residentes del Servicio de Cirugía General, por su permanente inquietud e interés por aprender.

A todos los miembros del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo "A".

A mi hija Almudena, compañera de aquellas tardes de los Sábados en el laboratorio al principio del trabajo. Gracias por sus continuas preguntas acerca de la marcha del trabajo.

A mis padres, porque gracias a ellos he llegado hasta aquí. Gracias por su inmensa generosidad.

## **JUSTIFICACION**

Desde que inicié mi formación como Médico Residente en el Servicio de Cirugía General del Hospital Primero de Octubre, he tenido la oportunidad de vivir de cerca, y casi día a día, la problemática de la cirugía paratiroidea.

Esta cirugía requería de una gran meticulosidad, siempre acompañada de una enorme paciencia, para ir buscando de forma sistemática las glándulas paratiroideas, que a veces parecían querer esconderse a nuestra vista.

Tras numerosas intervenciones, tanto en los casos de Hiperparatiroidismo Primario como Secundario, llegamos a tener una gran experiencia en este campo, y logramos una técnica quirúrgica sistematizada, que en la mayoría de los casos se veía coronada por el éxito.

Pero nos quedaba pendiente el aspecto de la crioconservación de las glándulas paratiroideas, para un posible autotrasplante diferido en caso de que así fuera necesario. No disponíamos de la técnica de la crioconservación de tejidos, ni parecía posible contar con ella en un tiempo razonable, dado su elevado coste. Esto nos obligaba a realizar autotrasplantes con tejido fresco a todos los pacientes sometidos a paratiroidectomía total, y dependíamos de nuestra técnica depurada, y de la buena fortuna, para que ningún paciente quedara hipoparatiroideo.

La necesidad nos impulsó a buscar un método alternativo de crioconservación, que fuera barato y de manejo sencillo, y nos ofreciera la suficiente garantía de fiabilidad.

Proponemos un método de crioconservación que baja la temperatura del tejido de una manera secuencial, y aprovecha la infraestructura ya existente en nuestro hospital, con lo que el coste es mínimo (el único gasto realizado fué para la adquisición del contenedor de nitrógeno líquido).

La duración del estudio se ha prolongado en el tiempo debido a que trabajamos con tejido humano, y estamos sujetos al escaso número de pacientes que se hacen acreedores al tratamiento quirúrgico por hiperparatiroidismo secundario.

**INDICE**

I-INTRODUCCION . . . . .	5
1.1.HISTORIA . . . . .	6
1.1.1.DESCUBRIMIENTO DE LAS GLANDULAS PARATIROIDES . . . . .	6
1.1.2.FISIOLOGIA DE LAS GLANDULAS PARATIROIDES . . . . .	7
1.1.3.TRASPLANTE DE GLANDULAS PARATIROIDES . . . . .	9
1.1.4.LAS PRIMERAS PARATIROIDECTOMIAS . . . . .	11
1.2.METABOLISMO DEL CALCIO . . . . .	13
1.2.1.HORMONA PARATIROIDEA . . . . .	13
1.2.2.VITAMINA D . . . . .	16
1.2.4.CALCITONINA . . . . .	17
1.3.FISIOPATOLOGIA DEL HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO . . . . .	18
1.4.FISIOPATOLOGIA DEL HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO . . . . .	20
1.5.CLINICA . . . . .	23
1.6.ANATOMIA QUIRURGICA . . . . .	25
1.6.1.EMBRIOLOGIA . . . . .	25
1.6.2.VARIACIONES NUMERICAS . . . . .	28
1.6.3.SITUACION Y RELACIONES . . . . .	30
1.6.4.ASPECTO MACROSCOPICO . . . . .	31
1.6.5.VASCULARIZACION . . . . .	32
1.7.TRATAMIENTO . . . . .	33
1.7.1.INDICACIONES . . . . .	33
1.7.2.CONTRAINDICACIONES . . . . .	35
1.7.3.TECNICA ANESTESICA . . . . .	36

1.7.4.TECNICA QUIRURGICA . . . . .	41
1.7.4.1.ADENOMAS . . . . .	45
1.7.4.2.HIPERPLASIA . . . . .	46
1.7.4.3.TECNICA DE LA PARATIROIDECTOMIA TOTAL Y AUTOTRASPLANTE . . . . .	47
1.7.4.4.EVOLUCION POSTOPERATORIA . . . . .	49
1.8.REINTERVENCIONES EN CIRUGIA PARATIROIDEA . . . . .	52
1.8.1.METODOS DE LOCALIZACION . . . . .	54
1.8.2.METODOS MINIMAMENTE O NO INVASIVOS . . . . .	56
1.8.2.1.ECOGRAFIA . . . . .	56
1.8.2.2.GAMMAGRAFIA POR SUBSTRACCION CON TALIO-TECNECIO . . . . .	57
1.8.2.3.TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTARIZADA . . . . .	59
1.8.2.4.RESONANCIA NUCLEAR MAGNETICA . . . . .	60
1.8.2.5.ANGIOGRAFIA INTRAVENOSA CON SUBSTRACCION DIGITAL . . . . .	61
1.8.3.METODOS INVASIVOS . . . . .	62
1.8.3.1.ARTERIOGRAFIA SELECTIVA . . . . .	62
1.8.3.2.CATETERIZACION VENOSA SELECTIVA Y MUESTREO DE PTH . . . . .	63
1.8.4.REINTERVENCION . . . . .	65
1.9.AUTOTRASPLANTE DE TEJIDO PARATIROIDEO FRESCO Y CRIOCONSERVADO . . . . .	68
1.9.1.INDICACIONES PARA EL AUTOTRASPLANTE DE TEJIDO FRESCO . . . . .	69
1.9.1.1.HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO POR HIPERPLASIA . . . . .	69

1.9.1.2.HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO	69
1.9.1.3.REINTERVENCIONES . . . . .	70
1.9.2.INDICACIONES PARA EL AUTOTRASPLANTE DE TEJIDO CRIOCONSERVADO . . . . .	71
1.9.2.1.HIPOPARIATIROIDISMO DESPUES DE PARATIROIDECTOMIA    SUBTOTAL    O PARATIROIDECTOMIA    TOTAL    CON AUTOTRASPLANTE . . . . .	71
1.9.2.2.HIPOPARIATIROIDISMO DESPUES DE REINTERVENCIONES . . . . .	72
1.10.CRIOCONSERVACION DE TEJIDOS . . . . .	73
1.10.1.CRIOCONSERVACION DE LAS GLANDULAS PARATIROIDES . . . . .	81
1.11.ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DEL TEJIDO CRIOCONSERVADO . . . . .	87
II.OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO. . . . .	89
2.1.OBJETIVOS . . . . .	90
2.2.PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO. . . . .	90
III.MATERIAL Y METODOS. . . . .	92
3.1.MATERIAL. . . . .	93
3.2.METODOLOGIA. . . . .	101
3.2.1.PREPARACION DEL M. DE CONGELACION. . . .	101
3.2.2.CRIOVIALES. . . . .	102
3.2.3.PREPARACION DEL TEJIDO PARA CRIOCONSERVACION . . . . .	103
3.2.4.CONGELACION DEL TEJIDO . . . . .	104



3.2.5. ESTUDIO EN FRESCO . . . . .	105
3.2.6. DESCONGELACION Y ESTUDIO DEL TEJIDO CRIOCONSERVADO . . . . .	107
3.2.7. DETERMINACION DE LA HORMONA PARATIROIDEA . . . . .	114
3.2.8. METODO ESTADISTICO . . . . .	118
IV-RESULTADOS. . . . .	121
4.1. RESULTADOS . . . . .	122
V-DISCUSSION . . . . .	130
VI-RESUMEN . . . . .	144
VI-CONCLUSIONES . . . . .	148
VII-BIBLIOGRAFIA . . . . .	150

## **INTRODUCCION**

## 1. HISTORIA

### 1.1. DESCUBRIMIENTO DE LAS GLANDULAS PARATIROIDES

La primera descripción anatómica de las glándulas paratiroides fue realizada por Richard Owen a la Sociedad Zoológica de Londres el 12 de Febrero de 1850, tras realizar la autopsia a un rinoceronte de la India muerto en el Zoo de Londres:

"Aparece un pequeño cuerpo glandular compacto de color amarillento, adherido al tiroides en el punto en que emergen las venas"<sup>(138)</sup>.

Owen se limitó a describir su hallazgo en el rinoceronte, pero ya no se refirió a otros animales, ni tampoco hizo descripción microscópica.

Posteriormente Ivar Sandstrom describe las paratiroides en el perro (1877), y en el gato y el conejo (1879), y comienza a buscarlas en el hombre<sup>(155)</sup>.

"Cuál sería mi asombro cuando al examinar el primer cadáver humano encontré a ambos lados del tiroides y en su polo inferior, un órgano del tamaño de un pequeño guisante, que no parecía un ganglio ni un tiroides accesorio, y cuyo examen histológico mostró una estructura bastante peculiar.

Después de varias autopsias no sólo tuve la certeza de su constancia, sino que vi que eran bilaterales en la mayoría de los casos"<sup>(173)</sup>.

Supuso que eran restos embrionarios del tiroides, y no fue capaz de determinar su función, pero propuso que deberían llamarse glándulas paratiroides.

## 1.2.FISIOLOGIA DE LAS GLANDULAS PARATIROIDES

La tetania postoperatoria se describe por primera vez en 1879 en el primer paciente de Billroth que sobrevivió a una tiroidectomía total. La tetania se describía como un estado de hiperexcitabilidad del sistema nervioso con crisis de espasmos que solían afectar a toda la musculatura del paciente, y se suponía que se debía a alteraciones en la vascularización del cuello tras la cirugía o bien a la incapacidad de eliminar determinadas toxinas excitantes del SNC al faltar el tiroides.

Gley en 1891 provoca tetania en ratas al proceder a la extirpación de las paratiroides, y es el primero en relacionar directamente la tetania con la falta de las mismas<sup>(166)</sup>.

Vassale y Generali confirman estas observaciones poco tiempo después (1896), y sugieren el efecto desintoxicante de las glándulas paratiroides<sup>(177)</sup>.

Erdheim, profesor de Anatomía Patológica en Viena, en 1906 destruye las paratiroides de las ratas mediante cauterización<sup>(59)</sup> y confirma las observaciones de Gley, pues reproduce la tetania y aprecia falta de depósito del calcio

en los dientes. Posteriormente (1907), realiza autopsias a todos los pacientes muertos con enfermedad ósea y encuentra que tienen hiperplasiadas las glándulas paratiroides. Es el primero en asociar a las glándulas paratiroides con la enfermedad ósea, aunque se equivoca al decir que la hiperplasia es secundaria a la enfermedad ósea, y no la causa de la misma<sup>(60)</sup>.

En 1891 Von Recklinghausen ya había descrito la enfermedad ósea en siete pacientes llamándola Osteitis Fibrosa Quística<sup>(178)</sup>.

En 1903 Askanazy<sup>(10)</sup> realiza la autopsia a un paciente aquejado de osteomalacia y fracturas patológicas que presentaba un tumor de 4,5x2x2 cm. junto al lóbulo izquierdo del tiroides y sugiere que pueda tratarse de un tumor paratiroideo, lo que confirma en 1930 cuando vuelve a examinar al microscopio las preparaciones.

Al mismo tiempo que esto sucedía en Europa, en los Estados Unidos, MacCallum y Voegtlin tratan con sales de calcio y extractos de paratiroides la tetania posttiroidectomía, y establecen que la función de la hormona paratiroidea tiene que ver con la regulación del metabolismo del calcio<sup>(45,110)</sup>. Pero en esa época muchos autores siguen pensando en el efecto desintoxicador de las glándulas paratiroides, lo que les hace dudar durante los años siguientes<sup>(39)</sup>.

En 1924, MacCallum afirma que está absolutamente convencido de que la tetania es la consecuencia directa de la falta de calcio<sup>(111)</sup>.

### 1.3. TRASPLANTE DE GLANDULAS PARATIROIDES

A raíz de los descubrimientos de Gley, el interés de los cirujanos se centró en preservar las glandulas paratiroides durante la cirugía tiroidea, y en tratar la tetania postoperatoria mediante el trasplante de las mismas.

El primer trasplante de glandula paratiroides se llevó a cabo en Viena por Von Eiselsberg en 1892, que trasplantó en un gato medio tiroides con sus correspondientes glándulas paratiroides en el espacio comprendido entre el músculo recto anterior del abdomen y el peritoneo. El otro hemitiroides era extirpado varios días después y el gato no mostraba signos de tetania. Después extirpaba el tejido trasplantado con lo que el gato moría de tetania y el examen anatomopatológico del tiroides trasplantado revelaba neoformación vascular, signo inequívoco de que el injerto había "prendido".

Durante las dos siguientes décadas se sucedieron las investigaciones acerca del trasplante de tiroides y paratiroides, llegando a la conclusión de que el tejido paratiroideo mostraba una especial facilidad para ser trasplantado, aunque se requería de un cierto tiempo antes de que el injerto empezara a ser funcionante.

Pfeiffer y Mayer en 1907 son los primeros en realizar autotrasplantes paratiroideos humanos con éxito<sup>(173)</sup>.

Alrededor de estas fechas se intentan los alotrasplantes, pero sin éxito.

Entre 1907 y 1909 Halsted<sup>(80,84)</sup> realiza autotrasplantes en perros y enuncia la Ley de la Deficiencia:

"El autotrasplante paratiroideo sólo será eficaz en aquellos pacientes en que la función glandular esté disminuida como mínimo a la mitad".

Esta teoría tuvo vigencia durante los siguientes treinta años.

Halsted también utiliza el calcio para tratar la tetania y hace hincapié en la importancia de ser muy cuidadoso con las glándulas paratiroides en el curso de la cirugía tiroidea. Además describe la vascularización de las glándulas paratiroides y advierte de la importancia de no ligar la arteria tiroidea inferior, ya que de ella proviene la vascularización paratiroidea<sup>(83)</sup>.

Lahey en 1926<sup>(101)</sup> propone el autotrasplante del tejido paratiroideo en el músculo esternocleidomastoideo en el curso de tiroidectomías parciales.

#### 1.4.LAS PRIMERAS PARATIROIDECTOMIAS

La primera intervención para tratar el hiperparatiroidismo fué realizada en Viena por Félix Mandl el 30 de Julio de 1925, siguiendo las indicaciones que había hecho Schlagenhauser<sup>(164)</sup> en 1915: si sólo aparece una glándula aumentada, lo lógico sería extirpar únicamente dicha glándula.

Mandl extirpó un tumor paratiroideo a un paciente que tenía una larga y penosa historia de enfermedad ósea, con lo que se produjo una mejoría espectacular, aunque cinco años después el paciente presentó una recurrencia que le causó la muerte, posiblemente debido a que el tumor extirpado fuera un carcinoma con sus correspondientes metástasis productoras de hormona paratiroidea<sup>(122)</sup>.

Dubois en Enero de 1926 trata a un paciente llamado Charles Martell y lo diagnostica de tumor paratiroideo, por lo que es intervenido en múltiples ocasiones en busca del mismo, pero sin éxito, hasta que en el curso de la séptima intervención se le extirpa un tumor paratiroideo alojado en el mediastino.

A partir de este momento se crea en el Massachussetts General Hospital el primer grupo dedicado al tratamiento del hiperparatiroidismo dirigido por Aub.



En los años treinta se realiza un buen número de paratiroidectomías con éxito y proliferan los estudios anatómicos en cuanto al número y localización de las glándulas.

Ya en los años cuarenta se conoce mejor la enfermedad y se la relaciona también con la presencia de úlceras gástricas<sup>(95,144)</sup> y pancreatitis<sup>(42)</sup>.

En 1958 se describe el hiperparatiroidismo por hiperplasia de las células principales<sup>(173)</sup>.

En 1963 se desarrolla la técnica del radioinmunoanálisis para la hormona paratiroidea, que en una etapa inicial determina los fragmentos amino-terminal (de muy corta vida media) y carboxi-terminal, para llegar al momento actual en que ya podemos determinar la molécula intacta.

Por otro lado, la amplia difusión de los autoanalizadores para la determinación de la bioquímica sanguínea en los años sesenta, ha permitido la sistemática realización de este análisis a todos los pacientes, descubriendo un gran número de hipercalcemias asintomáticas.

## 2. METABOLISMO DEL CALCIO

En el sujeto normal, la concentración del calcio extracelular se mantiene en un estrecho margen gracias a un mecanismo homeostático en el que intervienen la PTH; la vitamina D y sus metabolitos; la calcitonina; el fosfato y el magnesio.

En condiciones normales, el descenso en los niveles circulantes del calcio, aún en pequeñas proporciones, es suficiente para provocar una rápida respuesta en las glándulas paratiroides, con la consiguiente suelta al torrente circulatorio de hormona paratiroidea<sup>(27,78)</sup>.

### 2.1. HORMONA PARATIROIDEA

La hormona paratiroidea (PTH) es un polipéptido formado por 84 aminoácidos con un peso molecular de 9.500, a partir de un precursor de 115 aminoácidos (Pre-Pro-Paratohormona) que se segrega como respuesta de las células paratiroides a la disminución de los niveles del calcio sérico (y en menor medida del magnesio).

En la circulación se encuentran varios fragmentos (amino-terminal, carboxilo-terminal) y la hormona intacta. De ellos sólo tienen actividad la molécula intacta y el fragmento amino-terminal (1-34).

## *Introducción*

La PTH se une a los receptores existentes en los órganos diana e inicia una serie de procesos encaminados a restablecer los niveles normales del calcio en el torrente circulatorio.

Los principales órganos diana de la PTH son los riñones, el hueso e indirectamente, a través de la vitamina D, el intestino. La principal función de la PTH es prevenir la hipocalcemia, lo que se consigue extrayendo calcio del hueso, aumentando la reabsorción tubular de calcio, aumentando la absorción intestinal de calcio y aumentando la excreción renal de fosfato y bicarbonato con la consiguiente disminución del fosfato en el plasma.

La PTH, a nivel renal, ejerce varias acciones encaminadas a mantener la homeostasis del calcio: aumento de la reabsorción tubular del calcio, fosfaturia y aumento en la síntesis de  $1-25-(OH)_2 D$  a partir de  $25-OH D$ . El aumento en la reabsorción tubular de calcio tiene lugar a nivel del túbulo distal, mientras que la fosfaturia y la síntesis de vitamina D tienen lugar a nivel de la nefrona.

La fosfaturia se desencadena de manera inmediata (minutos), mientras que la reabsorción del calcio y la síntesis de vitamina D ocurren de manera más lenta (de varias horas a varios días).

La PTH provoca además la movilización del calcio de los huesos mediante la modificación de la actividad osteoblasto/osteoclasto.

La PTH estimula indirectamente los osteoclastos, aumentando su número y actividad, así como su vida media. De esta manera ejerce un efecto hipercalcemiante potente, que estimulará la reabsorción ósea.

La PTH puede además estimular directamente la inhibición de los osteoblastos.

En el estado hiperparatiroideo la función de la PTH está anormalmente elevada, ya sea produciendo una defectuosa homeostasis del calcio (hiperparatiroidismo primario) o como consecuencia de la misma (hiperparatiroidismo secundario).

La disfunción paratiroidea puede ser debida tanto a un aumento en el número de células, como a cambios cualitativos y/o cuantitativos en la producción de PTH y en su control por el calcio a nivel de la célula paratiroidea.

En el hiperparatiroidismo primario parece que hay una producción anormal de PTH a pesar de existir unos niveles de calcio circulante normales al principio, aunque posteriormente se desarrollará una hipercalcemia.

En el hiperparatiroidismo secundario, la hipersecreción de PTH es debida a una respuesta fisiológica a niveles bajos de calcio mantenidos de forma continuada por un cuadro de insuficiencia renal.

En principio, la hipersecreción de PTH en el hiperparatiroidismo secundario cesa cuando lo hace el estímulo hipocalcémico correspondiente (al menos en teoría), mientras que en el hiperparatiroidismo primario, la persistencia de una respuesta secretoria suficiente para

causar hipercalcemia implica cierto grado de regulación anómala de la secreción y/o proliferación celular paratiroidea independiente a los efectos, normalmente supresores, del calcio extracelular.

Así pues, una de las diferencias principales entre el hiperparatiroidismo primario y el hiperparatiroidismo secundario es el nivel del calcio extracelular a partir del cual tiene lugar la hiperfunción paratiroidea.

## 2.2.VITAMINA D

La vitamina D<sub>3</sub> es transformada en el hígado en 25-OH D que a su vez se hidroxila a nivel renal pasando a 1-25-(OH)<sub>2</sub> D<sup>(88)</sup>, que es el principal metabolito activo de la vitamina D, siendo necesaria para este paso la presencia de PTH y calcitonina<sup>(1)</sup>. La vitamina D aumenta la retención de calcio y fósforo y estimula la mineralización del hueso, teniendo un efecto global hipercalcemiante e hiperfosfatemiante.

La vitamina D también interviene induciendo la diferenciación de los precursores osteoclasticos, lo que supone un efecto sinérgico con la PTH, que puede durar varios días.

La vitamina D aumenta la absorción de calcio y fosfato a nivel intestinal, activando la síntesis de los mensajeros que determinan la producción de las proteínas transportadoras de dichos iones.

### 2.3.MAGNESIO

---

El magnesio es uno de los principales controladores de los niveles del calcio. Actúa principalmente regulando la secreción de PTH mediante un mecanismo similar al del calcio, pero también tiene efecto a nivel óseo y renal<sup>(70)</sup>.

### 2.4.CALCITONINA

---

La calcitonina es una hormona segregada por las células C o parafoliculares del tiroides. Se compone de 32 aminoácidos y requiere tener la molécula íntegra para mantener su actividad. Su secreción se estimula por la hipercalcemia, y también por el magnesio, vitamina D, la pentagastrina y el alcohol.

Actúa sobre los osteoclastos inhibiendo su función, a la vez que estimula los osteoblastos, lo que se traduce en el descenso de los niveles del calcio sérico.

También favorece la eliminación renal de calcio, mediante la inhibición de su reabsorción tubular.

Estimula de manera directa la síntesis a nivel renal de la 1,25(OH)<sub>2</sub> D.

Actúa disminuyendo los niveles elevados de calcio circulante por lo que, junto con la PTH, regula la calcemia<sup>(112)</sup>.

### 3. FISIOPATOLOGIA DEL HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO

En el hiperparatiroidismo primario existe una mal regulada secreción de PTH que se traduce en una hipercalcemia. En un principio se pensó que esto se debía a que el tejido paratiroideo, sobre todo en los casos de adenomas, funcionaba de una manera autónoma, independiente de la concentración de calcio extracelular.

Posteriores estudios han demostrado que la producción de PTH en la mayoría de casos de hiperparatiroidismo primario viene modulada por el calcio extracelular<sup>(132)</sup>. Esto sugiere que posiblemente el defecto de la glándula paratiroidea consista no sólo en una cierta autonomía, sino también en una alteración de la sensibilidad celular a los cambios en la concentración del calcio extracelular. Esto ha sido confirmado mediante estudios "in vitro"<sup>(27,28,79)</sup>.

Más recientemente<sup>(3)</sup> se ha descubierto un receptor específico para el calcio en la superficie de la célula paratiroidea, que sería el responsable de la regulación del calcio intracelular y de la producción de PTH. Este receptor, formado por una glicoproteína de elevado peso molecular, parece estar disminuido o alterado en los casos de hiperparatiroidismo primario. Es un receptor similar a los encontrados en las células trofoblásticas de la placenta humana y en el túbulo proximal del riñón.

La defectuosa regulación en la secreción de PTH a nivel de la célula paratiroidea aislada es el único defecto en el hiperparatiroidismo primario. Hay además en muchos casos un aumento en la masa total del tejido paratiroideo hiperfuncionante. Tanto la hiperplasia como la hipertrofia contribuyen a este incremento de la masa glandular.

En resumen, se puede decir que el hiperparatiroidismo primario consiste en una alteración en la que el tejido paratiroideo patológico "lee" mal la señal de la concentración del calcio extracelular y lo interpreta como más bajo del que en realidad es, y prolifera y segrega PTH de manera inadecuada en un intento de llevar la concentración del calcio extracelular a un nivel más alto.

La elevada tasa de PTH producida por el tejido paratiroideo patológico reduce el aclaramiento renal de calcio, aumenta la reabsorción ósea de calcio y su liberación al espacio extracelular. Como se puede apreciar, todo esto se traduce en un aumento del calcio extracelular por encima de las cifras normales.

La hipercalcemia así conseguida llegaría a frenar la producción de PTH incluso a nivel de las células patológicas, con lo que se estabilizaría la calcemia a un nivel patológico por encima del normal.



#### 4. FISIOPATOLOGIA DEL HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO

El hiperparatiroidismo secundario se caracteriza por un aumento en la secreción de PTH a nivel de una hiperplasia de las glándulas paratiroides<sup>(86)</sup>.

Generalmente se debe a una insuficiencia renal crónica en el curso de la cual se produce un marcado descenso en la concentración del calcio extracelular con lo que aumenta la producción de PTH en un intento compensador, y posteriormente se irá desarrollando una hiperplasia de las glándulas paratiroides.

Los factores que desarrollan hipocalcemia son: (1) hiperfosfatemia; (2) reducción en la síntesis de  $1-25-(OH)_2D$  con la consiguiente disminución en la absorción intestinal de calcio; (3) resistencia a nivel óseo a las acciones de la PTH; (4) alteración del mecanismo de feed-back entre la calcemia y la secreción de PTH y (5) disminución en la degradación de la PTH debida a la insuficiencia renal<sup>(36)</sup>.

1. En toda insuficiencia renal se produce hiperfosfatemia de manera transitoria<sup>(25)</sup>. Esta hiperfosfatemia reduce la concentración de calcio sérico que a su vez estimula la secreción de PTH; esta PTH reduce la reabsorción tubular de fosfato, con lo que se corrige el desequilibrio, pero dado que la insuficiencia renal va progresando, la hiperfosfatemia se va haciendo persistente.

2. La conversión del 25-(OH) D a su metabolito activo el 1-25-(OH)<sub>2</sub> D se lleva a cabo a nivel de la nefrona gracias a la 25(OH)D-1 hidroxilasa que se activa sólo a unos determinados niveles de fósforo. Si éstos son elevados se produce una inhibición en la síntesis de 1-25-(OH)<sub>2</sub> D, proceso que contribuye a la hipocalcemia, ya que está disminuida la absorción intestinal de calcio<sup>(123)</sup>. Cuando hay una insuficiencia renal, también hay una insuficiente síntesis de vitamina D.

3. La resistencia ósea al efecto movilizador del calcio por parte de la PTH es otro factor que interviene en el desarrollo de la hipocalcemia y del hiperparatiroidismo secundario en la insuficiencia renal crónica. Esta resistencia es de aparición precoz y parece ser debida a la deficiencia de metabolitos activos de la vitamina D y a la presencia en sangre circulante de toxinas urémicas<sup>(123)</sup>.

4. Parece ser que el control que ejerce el calcio sobre la secreción de PTH estaría alterado en la insuficiencia renal crónica, con lo que cifras de calcio normales no serían capaces de suprimir las glándulas paratiroides hiperplásicas, siendo necesario mantener cifras de calcio superiores a las normales para inhibir la liberación de PTH.

5. El riñón es el responsable de la eliminación de los fragmentos carboxi-terminales de la PTH que carecen de actividad biológica en relación con el metabolismo del calcio, pero sí son cuantificados en algunas técnicas analíticas, hecho este que se ha de tener en cuenta en la

## *Introducción*

interpretación de resultados, ya que en los pacientes con insuficiencia renal crónica hay acúmulo de estos fragmentos por una filtración glomerular deficitaria.

## 5. CLINICA

Las manifestaciones clínicas del hiperparatiroidismo primario suponen un cuadro mucho menos florido que el presentado hace unos años, ya que en la actualidad la mayoría de los pacientes son diagnosticados precozmente mediante la práctica rutinaria y sistemática de la determinación de la bioquímica sanguínea, tanto de manera ambulatoria como en pacientes hospitalizados<sup>(100,131)</sup>.

Se puede dividir la sintomatología en dos grupos principales: 1). Síntomas debidos a la hipercalcemia en sí y a la elevación de la PTH, y 2). Síntomas debidos a los estados patológicos que se asocian a esta enfermedad.

En general, la sintomatología puede ser a) por afectación del SNC, b) por alteraciones musculoesqueléticas, c) renales, d) gastrointestinales o e) circulatorias.

a) Las alteraciones neurológicas se caracterizan por pérdida de la memoria reciente, astenia, pérdida de sensibilidad para el dolor, atrofia global y marcha atáxica en casos muy evolucionados. Con frecuencia se presentan alteraciones psiquiátricas<sup>(93)</sup>.

b) A nivel musculoesquelético es frecuente encontrar signos radiológicos de reabsorción subperióstica, sobre todo en los huesos largos, teniendo un asiento preferente en las falanges distales. Los signos de osteitis fibrosa quística y los tumores pardos son excepcionales hoy día<sup>(113)</sup>.

c) Las alteraciones renales más frecuentes se deben a los depósitos masivos de sales de calcio en las regiones glomerular y tubular, produciendo nefrolitiasis y nefrocalcinosis, lo que se traduce clínicamente en cólicos renales, polidipsia, poliuria y en ocasiones hematuria<sup>(96)</sup>.

d) Los síntomas gastrointestinales se deben a la asociación frecuente de úlcera péptica (sobre todo en MEN I), pancreatitis de repetición y colelitiasis.

e) Es frecuente encontrar hipertensión arterial (30-50%) que remite después de la cirugía sólo en un pequeño número de pacientes<sup>(47)</sup>, así como hiperuricemia asociada o no a gota.

El estado hipercalcémico de estos pacientes conlleva el depósito de calcio a nivel de los tejidos blandos produciendo condrocalcinosis, tendinitis, artritis, conjuntivitis, queratopatía en banda, etc.

Es muy raro que se palpe el tumor paratiroideo a nivel cervical, aunque en algunas ocasiones esto es posible.

## 6. ANATOMIA QUIRURGICA

Para realizar un correcto tratamiento quirúrgico de las enfermedades de las glándulas paratiroides es imprescindible un buen conocimiento de la anatomía de la región cervical así como del desarrollo embrionario de las mismas, pues como veremos más adelante, las alteraciones de este desarrollo pueden ser la causa de importantes variaciones anatómicas que nos lleven al fracaso del tratamiento quirúrgico.

### 6.1. EMBRIOLOGIA

Las glándulas paratiroides, el tiroides y el timo derivan de los arcos branquiales que se encuentran en el intestino cefálico del embrión de cuatro milímetros<sup>(154)</sup>. En el embrión humano existen cinco bolsas faríngeas, que se forman a partir de las paredes laterales de la faringe. La primera bolsa faríngea formará la trompa de Eustaquio y las restantes acabarán aislándose de la faringe para formar las glándulas endocrinas<sup>(134,137)</sup>.

El timo y las paratiroides derivan de la tercera y cuarta bolsas faríngeas, existiendo ya en el embrión de 8 milímetros cuatro esbozos tímicos y otros cuatro paratiroides<sup>(18)</sup>. A partir de este momento los esbozos

tímicos crecerán mucho más rápidamente que los paratiroides, pero sin perder el contacto unos con otros.

Las paratiroides que se originan en la porción dorso-lateral de la tercera bolsa faríngea (paratiroides III), quedan pegadas a la parte dorsal del timo y se desplazarán con él en su trayecto hacia el mediastino<sup>(18,91,134,186)</sup>. Serán las paratiroides inferiores.

El descenso del timo se realiza habitualmente por delante del tronco venoso braquiocefálico, aunque a veces esto ocurre por detrás o incluso una parte del timo puede ser pre y otra retrovascular.

Cualquier causa que pueda alterar o detener el descenso de la paratiroides o del timo, puede ser la causa de que la paratiroides quede abandonada en cualquier punto del recorrido, y si lo que ocurre es que la paratiroides no se individualiza del timo, puede quedar englobada por éste en el mediastino anterior o incluso ser empujada hasta el pericardio.

Así se explica que en determinadas ocasiones las paratiroides se encuentren muy desplazadas de su teórico punto de localización, llegando incluso al pericardio. Además, a lo largo de ese camino pueden perder grupos celulares que posteriormente darán lugar a las glándulas accesorias o supernumerarias.

Las paratiroides que se encuentren a nivel del polo superior del timo o en el tracto tireotímico suelen conservar la vascularización normal dependiente de la arteria tiroidea

inferior, pero aquellas que descienden aún más suelen tener un pedículo arterial dependiente de la arteria mamaria interna<sup>(19,49,99,162)</sup>.

Las paratiroides que se desarrollan a partir de la cuarta bolsa faríngea (paratiroides IV), no se desplazan apenas en dirección caudal, posiblemente debido a que la porción de timo que acompañan se atrofia. Entran en contacto con el cuerpo último branquial, que al descender el lóbulo tiroideo, quedará incluido en parte en él, arrastrando a las paratiroides que acompañan a los lóbulos laterales del tiroides en su descenso, quedando de esta manera adheridas a la cápsula tiroidea e, incluso en algunos casos, incluidos en ella. Constituirán las paratiroides superiores<sup>(103,154)</sup>.

De este modo, aquellas glándulas que en el embrión tienen localización superior son las que más van a descender, llegando a ser inferiores en el adulto normal<sup>(91,86)</sup>.

Tanto las paratiroides superiores como las inferiores mantienen un contacto íntimo con el tiroides en todo este proceso de desarrollo.

Esto hace pensar que las paratiroides superiores son más constantes que las inferiores en cuanto al número y a la localización.



## 6.2.VARIACIONES NUMERICAS

Habitualmente en el hombre hay cuatro glándulas paratiroides, dos superiores y otras dos inferiores, en contacto con la cara posterolateral del tiroides y por fuera de la cápsula del mismo.

Hay varias series en la literatura que refieren importantes variaciones en cuanto al número de glándulas encontradas en estudios realizados mediante autopsias.

Gilmour<sup>(65)</sup> encuentra cuatro glándulas en el 87% de los cadáveres, tres en el 6,1%, dos en el 0,2% y un 0,6% que tenían cinco o seis glándulas.

Alveryd<sup>(7)</sup> encuentra un 90,6% de cadáveres adultos con cuatro glándulas, un 5,1% con tres, un 3,7% con cinco y un 0,6% con sólo dos.

Akerstrom<sup>(2)</sup> encontró en material de 503 autopsias que en el 84% (421 casos) había cuatro glándulas, tres en el 3% y en el 13% restante había glándulas supernumerarias que eran rudimentarias o bien divididas. Las rudimentarias (11 casos) eran muy pequeñas y siempre estaban junto a una glándula normal excepto en dos casos que estaban localizadas en el timo. Las que aparecieron divididas (32 casos) eran grupos de porciones minúsculas de glándula muy próximas entre sí y habitualmente incluidas en un grumo de tejido graso.

Hay descripciones clásicas como la de Zuckerkandl que encontró ocho glándulas en un adulto y la de Erdheim que refiere doce glándulas en un niño.

Todos los autores parecen coincidir en que el número normal de glándulas es de cuatro, y que cuando no encontraron más que tres se debe a que no encontraron una cuarta glándula de localización anómala. Cuando encuentran un número superior a cuatro, presumiblemente se deba a la fragmentación de una o varias de las glándulas.

### 6.3.SITUACION Y RELACIONES

En condiciones normales, las paratiroides se encuentran situadas de manera simétrica, siendo dos superiores y dos inferiores<sup>(2,44,176)</sup>.

Con respecto al tiroides, las paratiroides se sitúan posteriores y laterales, a nivel del surco que se forma entre el tiroides y el esófago, quedando las superiores a nivel del tercio medio del tiroides y las inferiores en un área que se extiende dos centímetros cranealmente, caudalmente o lateralmente al polo inferior del mismo<sup>(149)</sup>.

Quedan próximas o incluidas en el interior de la vaina tiroidea, pero son fáciles de individualizar de la glándula tiroidea sin romperlas ni afectar a su vascularización. Es muy raro encontrarlas intratiroides, y cuando así ocurre, suele ser en el seno de un bocio multinodular y con un buen plano de clivaje entre tiroides y paratiroides<sup>(2,197)</sup>.

Gilmour<sup>(65)</sup> encuentra el 90% en la cara dorsolateral del tiroides, el 1,6% entre tiroides y esófago y el 1,5% detrás de la faringe o del esófago.

La mejor forma de encontrar un punto de referencia de las glándulas paratiroides es con respecto a la arteria tiroidea inferior y a su cruce con el nervio recurrente laríngeo, ya que este último es el que suele ser más constante en cuanto a su localización<sup>(91,142)</sup>.

Las paratiroides superiores son habitualmente craneales a la arteria tiroidea inferior y dorsales al plano sagital donde se encuentra el nervio laríngeo recurrente. Son más dorsales cuanto más caudales se encuentren. En ocasiones se colocan por encima del polo superior del tiroides, o bien van a alojarse en el surco traqueo tiroideo o incluso se hacen laterales, pero siempre en un área de dos centímetros de diámetro y cuyo centro está un centímetro por encima de la intersección de arteria y nervio.

Las paratiroides inferiores quedan ventrales al cruce de arteria y nervio y caudales a la arteria tiroidea inferior.

#### 6.4. ASPECTO MACROSCOPICO

Las glándulas paratiroides son de menor consistencia que el tiroides y se pueden aplastar fácilmente quedando convertidas en una pulpa amarillo parduzca.

Su forma más habitual es ovoidea o fusiforme, de eje mayor vertical, aunque a veces sean redondeadas o esféricas. Su superficie es lisa y se observa una abundante red vascular<sup>(16,35,41,65)</sup>, y están envueltas por una fina cápsula que parece contenerlas, ya que si la abrimos, la glándula parece saltar hacia el exterior de la misma. Pueden tener una pequeña depresión a nivel de la entrada del pedículo vascular.

El color varía con la edad, siendo en el recién nacido grisáceas y semitransparentes, oscureciéndose progresivamente con la edad. En el adulto su color varía del amarillo oscuro al marrón rojizo, en función de la vascularización y de la cantidad de grasa que contengan<sup>(183)</sup>.

#### 6.5.VASCULARIZACION

La vascularización de las glándulas paratiroides es independiente de la del tiroides, siendo lo habitual que provenga directamente de la arteria tiroidea inferior. El pedículo vascular entra a través del hilio, que se encuentra en la cara posterior. La vascularización es muy abundante, lo que hace que sangren con facilidad y de manera muy profusa al corte, sirviendo esto de ayuda a su identificación, ya que ni timo, ni tiroides, ni ganglios linfáticos lo hacen de esa manera<sup>(2,7,41,91)</sup>.

En ocasiones (20%), las paratiroides superiores pueden recibir su vascularización de la arteria tiroidea superior o de la comunicante anastomótica longitudinal posterior o incluso de una arteria esofágica<sup>(7)</sup>.

El drenaje venoso se lleva a cabo siempre mediante las venas tiroideas inferiores<sup>(195)</sup>.

## 7. TRATAMIENTO

### 7.1. INDICACIONES

Es fundamental antes de afirmar que nos hallamos ante un hiperparatiroidismo primario, descartar **otras causas de hipercalcemia:**

- \* Tumores malignos con metástasis óseas.
- \* Otros tumores malignos que producen hipercalcemia sin la existencia de metástasis óseas (carcinoma epidermoide de pulmón, hipernefomas).
- \* Enfermedades hematológicas que cursan con afectación ósea (mielomas, linfomas, leucemias).
- \* Enfermedades granulomatosas (sarcoidosis, tuberculosis).
- \* Enfermedades endocrinas (tireotoxicosis, hipotiroidismo, insuficiencia suprarrenal aguda).
- \* Ingesta excesiva de calcio o de vitaminas A y D.
- \* Síndrome de la leche y alcalinos.
- \* Ingesta de diuréticos tiazídicos.
- \* Pacientes sometidos a inmobilizaciones prolongadas o portadores de la enfermedad de Paget.
- \* Hipercalcemia hipocalciúrica familiar.
- \* Obesidad mórbida<sup>(8)</sup>.

Una vez llegados al diagnóstico de hiperparatiroidismo, el tratamiento de elección es la exploración quirúrgica del cuello, con vistas a extirpar las glándulas patológicas.

En términos generales, para establecer la indicación quirúrgica en pacientes afectos de **hiperparatiroidismo primario**, se siguen los criterios establecidos por Purnell en 1971<sup>(36,66,115,130,141,149,161)</sup>:

- \* Calcio sérico por encima de 11 mg./100 ml.
- \* Enfermedad ósea demostrable radiológicamente.
- \* Insuficiencia o disminución de la función renal.
- \* Litiasis renal sintomática.
- \* Complicaciones gastrointestinales (ulcus péptico, pancreatitis).
- \* Complicaciones psiquiátricas.
- \* Imposibilidad de seguimiento del paciente.
- \* Crisis de hiperparatiroidismo agudo.

En los casos de **hiperparatiroidismo secundario**, la indicación quirúrgica se hará por<sup>(36,104,107)</sup>:

- \* Prurito intolerable.
- \* Alteraciones esqueléticas severas.
- \* Calcificaciones a nivel de tejidos blandos.
- \* Ineficacia o contraindicación del tratamiento médico.

7.2.CONTRAINDICACIONES

Las contraindicaciones para la cirugía paratiroidea son las generales para cualquier cirugía que se realice bajo anestesia general: graves problemas cardíacos, neurológicos o metabólicos; insuficiencia renal terminal, hipertensión arterial nefrógica grave, etc.



### 7.3.TECNICA ANESTESICA

Los principales problemas anestésicos que pueden plantear los pacientes hiperparatiroideos derivan de las alteraciones iónicas que presentan, y del grado de afectación de su función renal.

Aunque por lo general antes de someterse a la intervención quirúrgica las anomalías de los iones Ca, P y Mg intentan ser controladas, es necesario asegurarse mediante una determinación preoperatoria de que estos iones se hallan en valores normales o lo más cercanos posible a la normalidad, puesto que desviaciones acusadas, tanto por exceso como por defecto, pueden dar lugar a respuestas anómalas a agentes anestésicos tales como benzodiazepinas, barbitúricos y relajantes musculares, así como ocasionar alteraciones electrocardiográficas<sup>(169)</sup>.

La función renal puede estar afectada en el Hiperparatiroidismo Primario como consecuencia de la litiasis renal y nefrocalcinosis que ocasionalmente lo acompaña y está severamente alterada en el Hiperparatiroidismo Secundario, del que es la causa más frecuente; en este caso se trata de pacientes incluidos en un programa de hemodiálisis o bien a los que se les ha realizado un trasplante renal. Dado el riesgo vital que representa la hiperkaliemia, se procederá a realizar una sesión de diálisis la víspera de la intervención quirúrgica<sup>(163)</sup>.

Durante la hospitalización se adoptará una protección sistemática del brazo portador de la fístula para evitar una trombosis de la misma, y se continuará con la inmunosupresión en el caso de los enfermos trasplantados.

Para poder realizar en todo momento un manejo anestésico correcto, se tendrán en cuenta los trastornos que suelen acompañar los estadios avanzados de la insuficiencia renal, entre los que destacan la presencia de anemia, las alteraciones de la coagulación, de la función cardiovascular y de la volemia, trastornos electrolíticos y metabólicos, y posibilidad de complicaciones infecciosas<sup>(144)</sup>.

Se evitará en lo posible el uso de anestésicos nefrotóxicos como el Metoxiflurano, incluso el Enflurano, cuya nefrotoxicidad es dudosa y en todo caso menor, y el empleo de fármacos que precisan de la integridad del sistema excretor renal para su eliminación, como es el caso de ciertos relajantes musculares (Bromuro de Pancuronio, Vecuronio). La Succinilcolina puede ocasionar una hiperkaliemia de consecuencias fatales<sup>(128)</sup>.

La hipertensión arterial se asocia con frecuencia al Hiperparatiroidismo, en especial al Secundario; debe ser controlada farmacológicamente, no interrumpiéndose la medicación antihipertensiva durante el ingreso preoperatorio para disminuir en lo posible el riesgo de insuficiencia cardíaca e isquemia miocárdica a las que son proclives estos pacientes.

En cualquier caso es imprescindible realizar una valoración preanestésica exhaustiva que incluya exploración física, determinaciones analíticas recientes, estado de la función renal, cardiovascular y existencia de otro tipo de patología asociada.

Aunque se puede realizar la anestesia regional (bloqueo epidural cervical) en la paratiroidectomía, la técnica no está exenta de riesgos y no aporta ventajas significativas, por lo que su uso será excepcional. Uno de nuestros pacientes fué anestesiado mediante una perfusión epidural cervical continua a causa de una enfermedad ósea, tan avanzada que tenía reducida su capacidad vital respiratoria al mínimo.

La técnica anestésica óptima es la que además de carecer de efectos adversos proporcione un nivel anestésico profundo y estable para limitar la actividad neurovegetativa, evitando cualquier hemorragia que dificulte la visión del campo operatorio y aquella que sea fácil y rápidamente reversible a fin de permitir desde el final de la intervención un control de la movilización de las cuerdas vocales en fonación<sup>(163)</sup>.

Por todo ello es recomendable realizar una anestesia general balanceada, utilizando con precaución Thiopental sódico o preferiblemente Etomidato como inductor anestésico, benzodiazepinas, fentanilo, atracurio como relajante muscular de elección y una mezcla de N<sub>2</sub>O/O<sub>2</sub> para el mantenimiento, que puede suplementarse con isoflurano en caso necesario.

Es fundamental asegurar la vía aérea mediante la intubación orotraqueal con tubo reforzado para evitar acodamientos del mismo y obstrucción de la vía aérea, que es inaccesible durante la intervención.

La colocación de los pacientes en la mesa quirúrgica debe ser cuidadosa por la posibilidad de producir fracturas patológicas cuando existe afectación ósea. Puesto que la cabeza y el cuello están generalmente elevados durante la cirugía paratiroidea, no hay que olvidar el peligro de embolismo aéreo. Aunque poco frecuentes, también existe el riesgo de neumotórax, alteraciones hemodinámicas durante la manipulación del seno carotídeo, lesión de los nervios frénicos y recurrentes y del conducto torácico<sup>(144)</sup>.

La monitorización intraoperatoria es de gran importancia; es preceptiva la canalización de una vía venosa central para el control del aporte hídrico peroperatorio y un registro electrocardiográfico continuo que ponga de manifiesto los posibles trastornos derivados de las alteraciones electrolíticas y de la sobrecarga ventricular izquierda. Se efectuarán mediciones frecuentes de la tensión arterial. Si la cirugía se prolonga, proporciona una seguridad adicional la determinación de gasometrías arteriales y de los electrolitos séricos.

Asímismo es de gran utilidad monitorizar la función neuromuscular con un estimulador de nervio periférico y la fracción espirada de CO<sub>2</sub> mediante capnógrafo, para la detección precoz del embolismo aéreo.

## *Introducción*

Al finalizar la intervención los pacientes deben ser trasladados a una Unidad de Reanimación donde prosigue la monitorización de sus constantes vitales, se realizan las determinaciones analíticas oportunas y se procede a una estrecha observación en prevención de que puedan ocurrir complicaciones precoces. Estos cuidados se prolongan hasta la completa recuperación anestésica y total estabilización hemodinámica, y en lo posible, electrolítica.

En la actualidad, la mortalidad de la cirugía paratiroidea es muy reducida y su morbilidad conocida y controlable en manos de un equipo experto.

#### 7.4. TECNICA QUIRURGICA

---

Es muy importante que la primera intervención quirúrgica tenga éxito, ya que las probabilidades de fracaso y el índice de complicaciones (lesión recurrencial, hipocalcemia permanente, hematoma sofocante, etc.) aumentan considerablemente en las reintervenciones. Para ello es de vital importancia que la cirugía sea realizada por un equipo de cirujanos expertos en este problema, con un buen conocimiento del desarrollo embrionario y anatomía quirúrgica del cuello, y con capacidad de distinguir "de visu" el tejido paratiroideo sano del patológico<sup>(34,73,146,161)</sup>.

Una vez anestesiado el paciente y colocado en decúbito supino, se coloca una almohada debajo de los hombros de manera que éstos queden elevados, y el cuello en hiperextensión.

Se hace una incisión transversa, curva, de concavidad superior, siguiendo los pliegues cutáneos y a un través de dedo por encima del yugulum esternal.

El primer plano incluye la piel y el músculo cutáneo del cuello, y se constituyen dos colgajos, llegando el superior hasta el cartílago tiroides y el inferior hasta el manubrio esternal. De este modo quedan al descubierto los músculos pretiroideos, y lateralmente a ellos, los músculos esternocleidomastoideos de cada lado.

En este plano nos encontramos con las venas yugulares anteriores, que en ocasiones sangran y deben ser electrocoaguladas o mejor ligadas, en prevención de hematomas subcutáneos postoperatorios.

A continuación procedemos a la apertura a nivel de la línea media y en sentido longitudinal, de la fascia de los músculos pretiroideos. Dichos músculos se separan en su cara dorsal de los lóbulos tiroideos, llegando en sentido lateral hasta los músculos esternocleidomastoideos. Se separa el borde lateral de los músculos pretiroideos de los músculos esternocleidomastoideos, y a continuación se pasan dos pinzas rectas en la parte alta de los músculos pretiroideos para seccionarlos con el bisturí eléctrico entre ambas. Es importante que el corte sea lo más alto posible para preservar la inervación muscular.

Los músculos así seccionados constituyen sendos colgajos que se irán a unir a los colgajos cutáneos antes descritos, lo que da un buen campo quirúrgico.

A continuación procedemos a movilizar ambos lóbulos tiroideos mediante la disección roma de todo el tejido areolar que circunda a la glándula tiroidea, y ligando y seccionando las venas tiroideas medias.

Seguidamente se identifican y disecan la arteria tiroidea inferior y el nervio laríngeo recurrente, lo que es fundamental para evitar lesionar a este último.

Llegados a este punto nos encontramos en disposición de emprender la búsqueda de las glándulas paratiroides, tanto normales como patológicas.

Para ello empezamos por el lado derecho, levantando el lóbulo tiroideo hacia delante y hacia la línea media. Adyacente al polo inferior del tiroides o en el tracto tireotímico encontraremos la paratiroides inferior derecha. La superior tiene una localización más constante y suele situarse próxima al nervio recurrente laríngeo en su entrada a la laringe, o junto a la arteria tiroidea inferior cuando entra en el parénquima tiroideo.

Ambas paratiroides están rodeadas de tejido graso y a menudo envueltas en una fascia que las contiene, de manera que al abrir ésta con las tijeras, la glándula sale como si la empujara alguna presión interna.

Hay que tener en cuenta que el nervio laríngeo derecho puede no ser recurrente, sino que desciende directamente del nervio vago cervical. Esta peculiaridad se asocia con un origen de la arteria subclavia derecha directamente de la aorta descendente.

Una vez localizadas las paratiroides derechas, sean patológicas o no, pasaremos al lado izquierdo levantando el lóbulo tiroideo de la misma manera. En este lado no hay diferencias notables, salvo que aquí el nervio recurrente siempre recurre.

Si llegados a este momento no hemos encontrado alguna de las glándulas, pasaremos en primer lugar a examinar



detenidamente el tiroides y a palparlo en busca de alguna glándula intratiroidea<sup>(197)</sup>.

A continuación pasamos a la disección y exploración del espacio junto a tráquea, esófago y área prevertebral.

Si la glándula sigue sin aparecer, se abre la vaina carotídea y se explora detenidamente su interior.

Si todo lo anterior resulta infructuoso, se procede a traccionar del timo desde el cuello y se reseca el mismo, en busca de alguna glándula en su espesor.

Si seguimos sin encontrar alguna de las glándulas, se procederá a la exéresis de una o más según la indicación que veremos más adelante, y si se trata de una primera intervención, debemos darla por finalizada y esperar al resultado del análisis anatomopatológico y a las cifras de calcemia postoperatoria.

Si la primera intervención fracasa hay que recurrir a una segunda exploración del cuello.

Nunca debemos darnos por satisfechos y presumir que la primera exploración fué completa, y debemos seguir los mismos pasos que en la primera. Si el paciente fué intervenido la primera vez por otro cirujano, razón de más para empezar desde cero.

Una vez seguidos todos los pasos anteriores, y si no hemos encontrado la glándula patológica, debemos pasar a la exploración del mediastino. Para ello se hace una incisión longitudinal en la línea media que se extiende desde la cervicotomía por arriba hasta el tercer espacio intercostal

en sentido caudal. Se procede a la apertura del esternón longitudinalmente y a la exploración del tejido tímico residual que haya podido quedar de la primera cirugía. Si el resultado es negativo, hay que seguir con el examen del mediastino posterior. Por último llegaremos al examen del pericardio.

#### **7.4.1.ADENOMAS**

En el momento que encontremos el adenoma paratiroideo debemos extirpar esa glándula por completo y enviarla para estudio intraoperatorio junto con un fragmento de la glándula sana homolateral, y proseguir la exploración cervical<sup>(165)</sup>.

Tanto a nivel del adenoma extirpado como a nivel de las glándulas sanas se dejan sendos clips metálicos con cuidado de no lesionar los pedículos vasculares, para su identificación en una posible reintervención.

Dada la posibilidad de que exista más de un adenoma, se deben buscar las cuatro glándulas y no podemos conformarnos con explorar únicamente el lado en que aparece el adenoma<sup>(2,24,183)</sup>.

Si aparece un segundo adenoma, se extirpará y marcará de la misma manera que el primero, pero debemos reforzar nuestra atención por si nos encontramos ante un caso de hiperplasia en que dos de las glándulas aparecen aumentadas de tamaño y las otras dos aparentan la normalidad.

Hay autores que excepcionalmente recomiendan la exéresis y autotrasplante de los adenomas<sup>(31)</sup>.

#### 7.4.2.HIPERPLASIA

En el caso de encontrar afectación de todas las glándulas por hiperplasia, hay que distinguir entre un caso de hiperparatiroidismo primario en pacientes afectados de un síndrome MEN I o si se trata de un hiperparatiroidismo primario no familiar.

La mayoría de los autores<sup>(22,40,108,109,121,133,136,148,192)</sup> recomiendan la **paratiroidectomía total y autotrasplante** en el antebrazo para los casos de hiperparatiroidismo primario de tipo familiar, dada su elevada tendencia a la recurrencia, y la **paratiroidectomía subtotal** (exéresis de 3 y 1/2 glándulas) para aquellos casos en que la presentación del hiperparatiroidismo primario no sea de tipo familiar<sup>(43,45,184)</sup>.

Para el hiperparatiroidismo secundario, las opiniones están divididas entre la **paratiroidectomía subtotal**<sup>(4,46,54,55,199)</sup> y la **paratiroidectomía total y autotrasplante**<sup>(5,6,12,17,29,30,48,63,115,117,124,130,149,170,171,196,198)</sup>; más raro es encontrar autores que recomiendan la paratiroidectomía total y postponer el autotrasplante varias semanas, o prescindir del mismo<sup>(15,135)</sup>.

Recientemente la tendencia es a realizar paratiroidectomía total, más resección del timo, más

autotrasplante, más criopreservación de tejido paratiroideo<sup>(118,152)</sup>.

En el caso de practicar la paratiroidectomía subtotal, la glándula paratiroides cuyo fragmento se va a dejar sin extirpar debe ser biopsiada de manera intraoperatoria y debemos constatar que el fragmento que queda goza de buena vascularización, siendo muy tranquilizador el hecho de observar que la superficie de sección de la glándula sangra de manera espontánea. Además, este fragmento debe quedar lo más alejado posible del nervio recurrente y se debe marcar o bien con un clip metálico, o bien con un punto de sutura irreabsorbible, teniendo cuidado de no producir isquemia con este procedimiento. A continuación se extirpan las otras tres glándulas, dejando clips metálicos en sus respectivos pedículos.

#### **7.4.3.TECNICA DE LA PARATIROIDECTOMIA TOTAL Y AUTOTRASPLANTE**

Una vez que se han identificado las cuatro glándulas, se toma una porción de cada una de ellas y se envía para el examen anatomopatológico intraoperatorio<sup>(165)</sup>.

A continuación se extirpa todo el tejido paratiroideo y se coloca en suero fisiológico en una cápsula metálica que a su vez está sobre un lecho de hielo, de modo que el suero se mantenga a 4 grados centígrados.

Mientras una parte de los cirujanos proceden al cierre de la cervicotomía, otros van preparando el antebrazo para el

autotrasplante (a ser posible, se debe utilizar aquel que no tenga fístula arterio-venosa para hemodiálisis).

El tejido paratiroideo va aumentando su consistencia con el frío, lo que hace más fácil su sección en pequeñas porciones de aproximadamente 1 mm. cúbico. Para el autotrasplante se debe fragmentar aquella glándula que tenga el menor tamaño y que macroscópicamente se parezca más a una glándula normal. Las porciones obtenidas se vuelven a sumergir en el suero frío.

Se prepara un área de 5x5 cm. en la parte proximal del musculo braquioradialis, se incide la piel longitudinalmente y se llega a la aponeurosis, tras realizar una disección del tejido celular subcutáneo. Se abren unos pequeños huecos entre las fibras musculares a modo de nichos, en cada uno de los cuales se colocará uno de los fragmentos de glándula preparados, hasta un número de entre 10 y 20, y los orificios se cierran mediante puntos de sutura de nylon 4/0 o cualquier otro material irreabsorbible, que nos servirá de marca por si fuera necesario en algún momento reintervenir para retirarlos. Es muy importante que no se formen hematomas en el lecho del trasplante, ya que de ser así, se produciría la isquemia y necrosis del mismo.

La intervención finaliza con el cierre por planos de la incisión del antebrazo y con la reanimación postanestésica del paciente.

#### 7.4.4. EVOLUCION POSTOPERATORIA

Si la intervención ha tenido éxito, se observa un descenso inmediato de la calcemia, que con frecuencia llega a convertirse en hipocalcemia, debido a la desviación de importantes cantidades de calcio destinadas a la remineralización ósea (hambre ósea de calcio)<sup>(62,107)</sup>, suele acompañarse de síntomas de hipocalcemia como parestesias, calambres, espasmo carpopedal, convulsiones, ansiedad, etc., que a menudo requieren la reposición inmediata postoperatoria de calcio. La hipocalcemia se diagnostica mediante las pruebas de Chvostek y Trousseau y con la determinación del calcio y proteínas séricos.

Se administra calcio en forma de Gluconato Cálcico I.V. al 20%, 1 ampolla de 20 ml. en infusión lenta y además se prepara un frasco de 500 cc. de suero salino fisiológico en el que se diluyen otras 5 ampollas de gluconato cálcico y se administra en perfusión más o menos lenta, adaptando el ritmo de perfusión a la sintomatología del paciente y al resultado del análisis urgente realizado. En casos excepcionales de hipocalcemia severa o de persistencia de la sintomatología a pesar del calcio repuesto, puede ser necesario asociar la administración de 1,25,OH Colecalciferol (Rocaltrol®)<sup>(48)</sup>.

En los días siguientes a la intervención se va produciendo la normalización de la calcemia y el paciente queda asintomático, pudiendo ser dado de alta cumplida la primera semana.

En los casos en que se ha realizado la paratiroidectomía total y el autotrasplante, existe un período de tiempo que dura alrededor de tres semanas (aunque algunos autores consideran que este período es de 12-18 semanas<sup>(114)</sup>) en que el paciente se encuentra aparatiroideo, ya que le han sido extirpadas todas sus glándulas y el injerto aún no ha empezado a funcionar, por lo que se hace obligatoria la administración de manera pautada de calcio y 1,25 OH Colecalciferol. Pasado este tiempo, el injerto reinicia el control de la calcemia y se puede ir disminuyendo de manera progresiva la medicación hasta su total supresión. Para asegurarnos de que el injerto es funcionante realizamos determinaciones de los niveles de hormona paratiroidea extrayendo las muestras de sangre de una vena periférica y de un vena del antebrazo portador del injerto, justo a un nivel que recoja la sangre venosa procedente del mismo, y las comparamos, apreciando una cifra de hormonemia superior en la sangre procedente del miembro portador del injerto.

Si el remanente paratiroideo que dejamos en la exéresis de las 3 y 1/2 glándulas es insuficiente o si el injerto no consigue llegar a ser funcionante, nos encontramos ante un caso de hipoparatiroidismo persistente o crónico<sup>(118,119)</sup>, que puede llegar a tener graves consecuencias si no se trata adecuadamente, como son el riesgo permanente de tetania, irritabilidad muscular, alopecia, cataratas, vértigo, etc. La actitud a seguir será la de administrar de manera permanente por vía oral carbonato cálcico y Rocaltrol®. Este riesgo

puede ser cubierto en el caso de la paratiroidectomía total y autotrasplante mediante el procedimiento de crioconservación de tejido paratiroideo y su posterior descongelación y reinjerto, como expondremos más adelante.

En el otro lado tenemos el hiperparatiroidismo persistente, que una vez excluido un diagnóstico e indicación quirúrgica equivocados, suele ser debido o bien a una exploración inadecuada del paciente por un cirujano inexperto y poco habituado a esta cirugía<sup>(174)</sup>; o bien a una localización anormal de una de las glándulas; o a que se trate de un paciente con más de cuatro glándulas o a una hiperplasia del tejido trasplantado en el antebrazo<sup>(107)</sup>.

El tratamiento será la reintervención para proceder a reexplorar al paciente. En el caso de la hiperplasia del injerto, se tratará con la exéresis parcial del tejido trasplantado bajo anestesia local<sup>(73)</sup>.



## 8. REINTERVENCIONES EN CIRUGIA PARATIROIDEA

Antes de acometer una reintervención hay que analizar las causas del fracaso de la cirugía anterior.

Entendemos por **hiperparatiroidismo primario persistente** a la hipercalcemia que aparece de manera inmediata en el postoperatorio o en el transcurso de los seis primeros meses tras la cirugía paratiroidea<sup>(159)</sup>.

Llamamos **enfermedad recurrente** a la aparición de hipercalcemia tras al menos seis meses de cifras normales del calcio postoperatorio<sup>(159)</sup>.

Generalmente la persistencia se debe a una glándula no encontrada durante la primera cirugía.

La recurrencia suele significar enfermedad multiglandular o carcinoma paratiroideo.

1). La persistencia es la principal indicación para acometer la reintervención, siendo su causa más frecuente la presencia de un adenoma oculto.

Si el paciente presentaba una hiperplasia antes de la primera intervención, lo más probable es que si se pretendió realizar una paratiroidectomía subtotal, lo que se hizo fué que no se extirparon tres glándulas y media, o bien que el cirujano pensara que se trataba de un adenoma y no se preocupara de identificar las tres glándulas restantes.

También puede deberse a una quinta glándula hiperplásica o en la que asiente un segundo adenoma, y la localización de cuatro glándulas en la primera cirugía fuera correcta.

2). La recurrencia puede deberse además de a la aparición de carcinoma, a la hiperplasia del tejido injertado en el antebrazo.

Antes de reintervenir se debe de volver a dar todos los pasos encaminados al diagnóstico del hiperparatiroidismo y al diagnóstico diferencial con aquellos otros procesos ya descritos que pudieran inducirnos a error, teniendo especial cuidado con los hiperparatiroidismos de tipo familiar.

Se debe recuperar y revisar exhaustivamente toda la documentación existente acerca de las intervenciones anteriores, haciendo hincapié en la técnica quirúrgica empleada<sup>(50)</sup>.

### 8.1.METODOS DE LOCALIZACION

Los problemas en la localización de las glándulas paratiroides anormales o patológicas están en relación con varios factores, como el pequeño tamaño de las glándulas adenomatosas o hiperplásicas en comparación con otras neoplasias; la variabilidad en cuanto a la localización de las paratiroides<sup>(2)</sup>; la dificultad de diferenciar tanto pre como intraoperatoriamente a un adenoma solitario de los adenomas múltiples así como de la hiperplasia de las cuatro glándulas y la posibilidad de que existan glándulas supernumerarias<sup>(58,76)</sup>.

La necesidad de ir a la segunda cirugía habiendo tomado el máximo de precauciones en cuanto a la localización preoperatoria se justifica por el elevado índice de complicaciones que presentan las reintervenciones, y por las elevadas probabilidades de fracaso que tenemos.

Así como en la primera cirugía la mayoría de los autores coinciden en la no necesidad de emplear medios de localización previos a la misma<sup>(141,144)</sup>, en las reintervencions todos vuelven a estar de acuerdo en aprovecharlos al máximo<sup>(50,57,64,74,76,94,98,127,135)</sup>.

Las complicaciones se deben a lo difícil que es identificar los planos para realizar la disección cervical y lo difícil de localizar los nervios recurrentes y los

pedículos vasculares, con el consiguiente riesgo de lesionarlos.

Los medios de localización deben ser lo suficientemente precisos para evitar los falsos positivos, que en esta cirugía nos pueden inducir a errores irreparables.

1). Los medios no invasivos de que disponemos para la localización preoperatoria son la ecografía, la gammagrafía por sustracción con talio-tecnecio, la tomografía axial computarizada y la resonancia nuclear magnética.

2). Los medios invasivos consisten fundamentalmente en el cateterismo venoso selectivo y la arteriografía convencional y digital.

Hay que destacar que en el empleo de estos métodos de localización ocurre como con el cirujano que va a realizar la intervención, es decir, que es muy importante la motivación, la dedicación y el interés por este tipo de patología.

## 8.2.METODOS MINIMAMENTE O NO INVASIVOS

### **8.2.1.ECOGRAFIA**

Para realizar una ecografía en busca de glándulas paratiroides se deben emplear transductores de alta resolución, a ser posible de 7,5 o 10 MHz., y el registro se debe realizar tanto en el plano transversal como en el sagital.

Los transductores de 10 Mhz. tienen una penetración de 4 cm. y una resolución de 1 a 2 mm., y son más eficaces a nivel del cuello y la región tiroidea; mientras que los de 7,5 MHz. llegan a los 7 cm. de profundidad y su resolución es de 2 a 3 mm., por lo que son preferibles para explorar regiones más profundas<sup>(58)</sup>.

Al realizar la ecografía, el tejido tiroideo aparece como un área homogénea hiperecogénica, mientras que las glándulas paratiroides patológicas se muestran hipoecogénicas. Las paratiroides normales casi nunca se ven.

Los problemas empiezan cuando el tiroides tiene lesiones quísticas o nódulos próximos a su cápsula posterior. También los ganglios linfáticos pueden ser confundidos con paratiroides patológicas. Desde el punto de vista ecográfico no se puede distinguir entre adenomas e hiperplasia.

La ecografía es de poca utilidad en regiones profundas del cuello, ya que la tráquea y el esófago actúan como

barrera debido al aire que contienen, y tampoco nos será muy útil en el mediastino<sup>(32)</sup>.

La fiabilidad varía según los autores entre el 60 y el 80% para aquellos pacientes que aún no han sido intervenidos<sup>(32,53,72,83,145)</sup>, siendo el máximo rendimiento de la ecografía cuando las lesiones se encuentran en su lugar habitual, mientras que desciende al 40% en pacientes ya operados.

Los aspectos más favorables de la ecografía son su bajo costo, su falta de morbilidad y la fácil disponibilidad de esta exploración, incluso de manera intraoperatoria.

#### **8.2.2.GAMMAGRAFIA POR SUBSTRACCION CON TALIO-TECNECIO**

Se basa en la diferente captación por parte de tiroides y paratiroides que sufren estos dos isótopos: el Talio<sub>201</sub> se acumula en aquellos tejidos con un alto flujo sanguíneo, como son el tiroides y las paratiroides normales, así como los nódulos tiroideos y los adenomas paratiroides. El Tecnecio<sub>99m</sub> es captado únicamente por el tejido tiroideo.

Se realiza una gammagrafía con cada uno de los isótopos y a continuación la gammagrafía con tecnecio es substraida de la realizada con talio, quedando una imagen en la que sólo aparece el talio depositado en el tejido paratiroideo. Esto que parece tan sencillo es muy difícil de realizar, ya que se debe tener gran precisión en la colocación de los colimadores

que se emplean en la gammagrafías, y se requiere una prolongada inmovilidad total, que en muchas ocasiones el paciente no puede soportar.

El poder de resolución es de 5 mm. y es capaz de detectar glándulas que estén aumentadas por encima de 7-8 mm. Este poder de resolución también disminuye a medida que aumenta la profundidad en la que se encuentran las glándulas<sup>(58)</sup>.

En pacientes que no han sido operados, la sensibilidad se aproxima al 75% (62-82%), y está en relación directa con el tamaño del tumor<sup>(33,69,125)</sup>. Desciende al 27-49% en pacientes operados, con un índice de falsos positivos del 18-27%. Presenta dificultades cuando existe un bocio multinodular<sup>(32,37,38,68,87,106,127,144)</sup>.

Por todo ello y aunque esta técnica puede ser considerada como de "segunda fila", tiene poca morbilidad, aventaja a la ecografía cuando se trata de lesiones mediastínicas y es de relativamente fácil accesibilidad<sup>(139,200)</sup>.

### 8.2.3. TOMOGRAFIA AXIAL COMPUTARIZADA (TAC)

Los scanners que se emplean hoy día tienen un poder de resolución de 0,75 mm. en tejidos blandos debiendo realizarse cortes de 5 mm. en el cuello y de 10 mm. en el mediastino.

Dado que tanto tiroides como paratiroides están muy vascularizadas, nos podemos ayudar de la infusión intravenosa de contraste, preferiblemente en forma de bolo.

Los nódulos tiroideos se distinguen del tejido paratiroideo sólo por su localización, por lo que no podremos detectar paratiroides intratiroideas por este método.

Las glándulas paratiroides normales son prácticamente imposibles de identificar, y sólo detectaremos aquellos tumores paratiroideos mayores de 5 mm. Además es imposible distinguir entre adenoma, hiperplasia y carcinoma. Existe una zona de sombra para esta técnica entre el borde inferior del tiroides y el mediastino superior<sup>(32)</sup>.

La sensibilidad de la TAC para paratiroides patológicas en pacientes que no han sido operados es del 78%, descendiendo esta cifra al 44% en los ya operados, produciéndose un 2-12% de falsos positivos<sup>(32,58,106,127,145)</sup>.

Hay que tener en cuenta que esta técnica se acompaña de la inyección de un medio de contraste, que se deberá procurar que sea no iónico, y que se produce una radiación de 4 rads. Además es una exploración de alto coste.



Puede servir para dirigir agujas finas para realizar punciones y análisis por el patólogo.

#### **8.2.4. RESONANCIA NUCLEAR MAGNETICA**

Es un método mucho menos difundido que los anteriores y por lo tanto hay menos experiencia en su empleo. Se deben utilizar sistemas especialmente diseñados para su utilización en el cuello y tórax.

La resolución de este método es de 1,5 mm. y se deben realizar cortes de 8-10 mm. de espesor y con una separación entre ellos de 1-3 mm.<sup>(58)</sup>.

Las imágenes de los tejidos blandos que se obtienen como grasa, músculo, vasos y ganglios linfáticos se pueden diferenciar con facilidad, pero es difícil distinguir los nódulos tiroideos de las paratiroides patológicas, dada su isointensidad, salvo que se encuentren en una localización favorable. Se pueden llegar a localizar tumores de incluso 5 mm. de diámetro<sup>(168)</sup>.

La sensibilidad en pacientes que no han sido operados es del 74-81%<sup>(85,97)</sup>. Si el sujeto ya ha sido operado, esta cifra desciende al 50-73%, con un índice de falsos positivos del 18%<sup>(11,106,126,127)</sup>.

Tiene la ventaja frente a la TAC de no necesitar la inyección de contraste, pero tiene un coste elevado y

requiere bastante tiempo para su realización, presentando en un elevado número de pacientes sensación de claustrofobia.

No sirve para guiar agujas de punción.

#### **8.2.5. ANGIOGRAFIA INTRAVENOSA CON SUBSTRACCION DIGITAL**

Consiste en la combinación de una angiografía convencional con un ordenador que produce la substracción a la imagen angiográfica de la imagen de los tejidos antes de administrar el contraste, con lo que sólo queda lo marcado por el contraste. En teoría es un buen método, pero se ve fácilmente artefactado por la respiración, deglución, etc.

Es un procedimiento mínimamente invasivo y requiere la colocación de un catéter venoso central por el que se administran repetidos bolos de 35-50 ml. de contraste.

Se trata de un método muy complejo y es dudoso que pueda ser de utilidad en el momento actual.

### 8.3.METODOS INVASIVOS

Los procedimientos más específicos para la localización de las paratiroides siguen siendo los invasivos. Consisten en la arteriografía selectiva y el muestreo venoso selectivo para la determinación de PTH. Juntos aportan una sensibilidad del 91-95%, la más baja incidencia de falsos positivos y facilitan al cirujano la información no sólo acerca de su localización, sino también de la vascularización de las mismas<sup>(57,58,127)</sup>.

#### 8.3.1.ARTERIOGRAFIA SELECTIVA

Consiste en la realización de una arteriografía cervical tras la inyección de contraste de manera selectiva en las arterias tiroideas superior e inferior, e incluso en las arterias mamarias. Aprovecha el hecho de que las glándulas paratiroides patológicas, como cualquier otro tumor endocrino, son hipervasculares. El músculo y los ganglios linfáticos son relativamente hipovasculares y en ellos no queda retenido durante un cierto tiempo el contraste, como pasa con las paratiroides, que aparecen como "teñidas".

Los adenomas que se encuentran en el seno del tiroides no pueden ser identificados, y los restos tiroideos de una cirugía previa también pueden darnos problemas, por lo que

nos deberemos ayudar de una gammagrafía tiroidea previa a la arteriografía.

La arteriografía es capaz de identificar hasta el 85% de los casos de tejido paratiroideo patológico.

Entre las complicaciones más frecuentes de esta técnica debemos citar la toxicidad por el medio de contraste y las lesiones neurológicas producidas por embolización (lesiones nerviosas, cuadriplejia, etc.). Estas complicaciones cada vez son menores y menos graves, sobre todo desde la aparición de la tecnología digital y las substracciones, que permiten el empleo de contrastes muy diluidos<sup>(58)</sup>.

### **8.3.2. CATETERIZACION VENOSA SELECTIVA Y MUESTREO DE PTH**

Todos los métodos de localización descritos hasta aquí se basan en la demostración de la existencia de una o varias glándulas aumentadas de tamaño, pero no siempre hay una clara relación entre el tamaño glandular y la actividad funcional<sup>(120)</sup>.

La cateterización venosa selectiva para la determinación de PTH es el único método que aporta un aspecto funcional a los métodos de localización.

Si se realiza un muestreo de un grueso tronco venoso como una vena yugular, es de poca utilidad y quizás sea válido para algunos casos de adenoma, pero nunca para la hiperplasia.

El acceso para el muestreo de los finos troncos venosos tributarios de las paratiroides es técnicamente imposible de realizar. Se debe hacer un muestreo de los plexos venosos tiroideos en los que drenan las paratiroides, así como de las venas del timo.

Los adenomas producen hipersecreción focal o unilateral, mientras que la hiperplasia produce una elevación bilateral de la secreción. Si aparece una elevación en las muestras recogidas de las venas tiroideas superiores, casi con seguridad se puede afirmar que la lesión se encuentra a nivel cervical y se puede saber a qué lado corresponde.

Las venas tiroideas inferiores pueden recoger sangre de las paratiroides superiores, de las paratiroides inferiores y del timo. De la misma manera, hay glándulas inferiores que pueden drenar a través del timo.

Para acabar de complicar las cosas, si se ha realizado cirugía previamente, el mapa venoso puede estar muy distorsionado por las ligaduras vasculares realizadas durante la cirugía, por lo que esta técnica debe de ir precedida de una arteriografía que nos "dibuje" el mapa venoso cervical.

La cateterización venosa sirve para regionalizar la actividad paratiroidea patológica y para distinguir entre enfermedad uni y pluriglandular. Es de baja morbilidad pero es engorrosa debido a la dificultad en la cateterización venosa y a la multitud de muestras que se deben recoger y procesar<sup>(58)</sup>.

#### 8.4. REINTERVENCION

Una vez que hemos indicado la reintervención y hemos empleado todos los medios de localización a nuestro alcance, procederemos a operar al paciente. La colocación y la anestesia no difieren de los de la primera intervención.

Actualmente hay dos tendencias en cuanto a empezar de nuevo por el cuello o a empezar por el mediastino si alguno de los medios de localización nos ha orientado en ese sentido.

Creemos que la reintervención, y sobre todo si la primera cirugía fue realizada por otro grupo de cirujanos, debe de comenzar otra vez por el cuello, y si esta fuera negativa seguiríamos por el mediastino. Para seguir esta táctica nos basamos en que el 97% de glándulas paratiroides patológicas se pueden extirpar mediante una cervicotomía<sup>(172)</sup>, y en que la localización más frecuente de tejido paratiroideo anormal está en el cuello y no en el mediastino<sup>(182)</sup>.

La vía de abordaje es la cervicotomía transversa, pero realizamos un abordaje de la celda tiroidea, sobre el borde interno del músculo esternocleidomastoideo, cuyo borde medial disecamos hasta identificar y rechazar lateralmente la arteria carótida y la vena yugular, como ya describiera Saxe en 1981<sup>(158)</sup>. Así seguimos con disección roma hasta llegar a la columna vertebral y el esófago por un plano que hasta ese

momento se había mantenido "virgen" a toda cirugía, con lo que la visibilidad es inmejorable.

Se comienza explorando el área retroesofágica y el surco traqueoesofágico, para seguir con la cara posterior y el polo inferior del tiroides, disecando el tejido que rodea al nervio recurrente laríngeo, todo ello en busca de una glándula inferior, que suelen ser las más inconstantes en cuanto a su localización. Se sigue con la disección y apertura de la vaina carotídea lo más cranealmente posible buscando una paratiroides paratímica no descendida.

Si no aparece ninguna glándula, debemos repetir todos los pasos en el otro lado del cuello.

Si la exploración cervical resulta infructuosa, seguiremos con la exploración del mediastino. Se procede a la esternotomía media, siendo suficiente con llegar al tercer espacio intercostal, aunque frecuentemente se hace completa. Se separan y se rechazan en sentido lateral los fondos de saco pleurales. De esta manera el campo operatorio es amplio y podemos llegar a palpar el timo; tanto si encontramos glándula en su espesor como si no, debemos proceder a la exéresis de todo el tejido tímico, llegando muy altos en la disección, prácticamente hasta los polos inferiores del tiroides. A continuación se examina la grasa que queda delante del pericardio.

Si seguimos sin éxito, debemos buscar un adenoma extratímico. Se debe ir a buscar lateralmente, por la derecha

en la cara anterior de la vena cava superior y por la izquierda en la cara anterior de la aorta.

Por último intentaremos la exploración del mediastino posterior, gesto de elevado riesgo y dudosa efectividad por esta vía de abordaje<sup>(51)</sup>.

En el momento que encontremos la glándula patológica procederemos a su exéresis completa y a marcar su pedículo con un clip metálico o bien con un punto de sutura irreabsorbible, dando por finalizada la intervención.



**9. AUTOTRASPLANTE DE TEJIDO PARATIROIDEO FRESCO Y CRIOCONSERVADO**

La primera noticia que tenemos acerca del autotrasplante de tejido paratiroideo humano data de 1926, cuando LAHEY publicó su trabajo referente a "transplante de paratiroides en tiroidectomía parcial". Halsted ya había descrito la técnica en perros en 1908<sup>(84)</sup>.

En 1975 Wells<sup>(191)</sup> establece la forma de realizar el autotrasplante de paratiroides en fresco, y dos años después<sup>(193)</sup> publica su primera casuística con éxito de autotrasplante de tejido paratiroideo crioconservado, que se realiza a nivel del antebrazo.

Posteriormente aparecen otras publicaciones<sup>(71,92)</sup> en que el autotrasplante se realiza a nivel del músculo esternocleido mastoideo y tejido subcutáneo de la pared abdominal respectivamente.

## 9.1. INDICACIONES PARA EL AUTOTRASPLANTE DE TEJIDO FRESCO

### 9.1.1. HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO POR HIPERPLASIA

Aunque la causa más frecuente de hiperparatiroidismo primario es el adenoma, el 20% de los casos es debido a hiperplasia difusa de todas las glándulas<sup>(43,133)</sup>.

En esta circunstancia, el tratamiento de elección es la paratiroidectomía subtotal, aunque hay autores que preconizan la paratiroidectomía total con autotrasplante inmediato<sup>(194)</sup>. Quizás este último procedimiento debería reservarse para aquellos casos de enfermedad familiar, ya que tienden a presentar recurrencias, que serían mucho más fáciles de extirpar en el antebrazo con anestesia local que con una nueva cervicotomía.

### 9.1.2. HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO

Actualmente se admite que tanto la paratiroidectomía subtotal como la paratiroidectomía total y autotrasplante de tejido fresco son métodos válidos para tratarlo, aunque quizás a medida que se va confiando más en el autotrasplante, la mayoría de los autores se inclinan por este último método<sup>(22,40,108,109,121,133,148,192)</sup>.

### 9.1.3. REINTERVENCIONES

Una de las complicaciones más frecuentes (20-50%) de las reintervenciones en cirugía paratiroidea es el hipoparatiroidismo<sup>(20,150,182)</sup>, ya que se procede a la exéresis de todas las glándulas que el cirujano encuentra, desconociendo en muchas ocasiones el número de glándulas extirpadas en la cirugía previa. El autotrasplante nos evita este lamentable suceso.

Pero si ocurriera que después del autotrasplante tuviéramos hiperparatiroidismo persistente o recurrente, no sabríamos con seguridad si se debe a hiperplasia del injerto o a alguna glándula hiperplásica "olvidada" en el cuello<sup>(159)</sup>.

Por lo tanto debemos reservar el autotrasplante con tejido fresco para aquellos casos en que tengamos la seguridad de que al menos 4 glándulas han sido extirpadas a lo largo de las sucesivas cirugías.

En casos de duda, siempre se hará paratiroidectomía total y más tarde autotrasplante con tejido crioconservado si la evolución del paciente así lo aconsejara.

9.2.INDICACIONES PARA EL AUTOTRASPLANTE DE TEJIDO CRIOCONSERVADO

**9.2.1.HIPOPARIROIIDISMO DESPUES DE PARATIROIIDECTOMIA SUBTOTAL O PARATIROIIDECTOMIA TOTAL CON AUTOTRASPLANTE**

Los pacientes que son intervenidos por hiperparatiroidismo primario debido a hiperplasia mediante paratiroidectomía subtotal o paratiroidectomía total y autotrasplante, pueden presentar hipocalcemia transitoria, que se trata con terapia sustitutiva; pero esta hipocalcemia puede hacerse permanente si el fragmento de glándula que dejamos en la paratiroidectomía subtotal, o el autotrasplante de tejido fresco, no funcionan adecuadamente. En este momento se debe reimplantar el tejido paratiroideo criopreservado.

Los pacientes afectados de hiperparatiroidismo secundario que son intervenidos pueden presentar hipocalcemia permanente tras un período mucho más largo de hipocalcemia debido a que generalmente padecen "hambre ósea" de calcio. Puede ser necesario esperar incluso 1 año antes de decidirnos al autotrasplante de tejido congelado.

### **9.2.2.HIPOPARIROIDISMO DESPUES DE REINTERVENCIONES**

Como ya se describió en las indicaciones del autotrasplante con tejido fresco, si aparece un hipoparatiroidismo permanente después de una reintervención, el tejido extirpado y crioconservado debe de reinjertarse no sin haber dado antes un plazo mínimo de 6 meses para confirmar el diagnóstico.

## 10. CRIOCONSERVACION DE TEJIDOS

El objetivo de la conservación por congelación de células procedentes de tejidos vivos es su almacenamiento estable por un tiempo indefinido hasta su utilización. Por este motivo, las células, una vez finalizado el período de congelación, deben ser viables en elevado número.

Para conseguir una conservación celular adecuada es necesario que las células no estén sometidas al riesgo de alteraciones genéticas durante el tiempo que ésta dure y, una vez recuperadas, su morfología, metabolismo y capacidad de división deben ser lo más parecidos, por no decir iguales, a los que tenían antes de la conservación<sup>(75,167)</sup>.

El método de conservación ideal será aquel que garantice que todos los procesos físicos y químicos que puedan dañar a la célula queden inhibidos o paralizados.

Un método simple y de bajo costo es la liofilización, que reúne estas condiciones si se trata de conservar microorganismos, pero que, por lo general, proporciona bajos índices de supervivencia y el material conservado de esta manera puede presentar fenómenos de mutación. En definitiva podemos decir que sólo sirve para seres unicelulares<sup>(75)</sup>.

La **crioconservación** consiste en mantener las células en un medio estable a  $-196^{\circ}$  C producido por el Nitrógeno líquido y por su fase gaseosa, que se encuentra justo encima del mismo.

A esta temperatura quedan paralizadas las reacciones químicas de una manera casi total debido a que la energía cinética es lo suficientemente baja como para que aquellas no se puedan dar ni, por supuesto, se produzca el menor movimiento celular.

En estas condiciones térmicas, el agua de los líquidos intra y extracelular se encuentra en forma de cristales de hielo, con lo que su viscosidad es muy alta y no se producen los fenómenos de difusión.

De todas formas, las células no se encuentran totalmente protegidas, ya que se pueden formar radicales libres y además son susceptibles de ser lesionadas por las radiaciones ionizantes, lo que llevaría a alteraciones en los ácidos nucleicos. Estas alteraciones son mínimas y se requeriría un largo período de almacenamiento para que cobraran importancia, ya que tienen un efecto acumulativo al estar bloqueados los sistemas enzimáticos encargados de repararlas<sup>(75)</sup>.

Ya hemos visto que la estabilidad que se consigue a -196° C es suficiente para conservar las células con éxito, pero el proceso de enfriamiento que nos lleve a tan baja temperatura y el posterior proceso de descongelación para recuperar las células, implican una serie de fenómenos que atentan directamente contra la viabilidad celular.

Durante la congelación, el mayor riesgo de lesión celular se debe a:

a): Exposición a bajas temperaturas.

b): Alteración de las propiedades físicas de las soluciones extracelulares y, de igual manera, de las soluciones intracelulares.

c): Los cristales de hielo tienen efectos lesivos mecánicos y físicos.

a. **Exposición a bajas temperaturas:** La reducción de temperatura "per se", sin congelación, puede dañar la estructura y funcionalismo celulares. Este hecho está en relación directa con lo baja que sea la temperatura a la que lleguemos y con la velocidad a la que se alcance dicha temperatura<sup>(129)</sup>.

Se producen cambios en la estructura de la membrana celular que afectan a su permeabilidad y se produce citocontracción y agregación de elementos citoesqueléticos<sup>(75)</sup>.

Las alteraciones bioquímicas y fisiológicas consisten en una inadecuada respiración celular y fallos en las vías del metabolismo de los hidratos de carbono.

Los agentes crioprotectores más comúnmente usados como glicerol, EDTA, sacarosa, etc. parecen tener un efecto positivo para minimizar estos daños, mientras que paradójicamente, el dimetilsulfóxido (DMSO) hace más sensibles a las células frente a estas alteraciones<sup>(167)</sup>.

b: **Alteración de las propiedades físicas de las soluciones intra y extracelulares:** Si en un sistema que consiste básicamente en células llenas de líquido, que a su vez están rodeadas de más líquido, procedemos a bajar la



temperatura lentamente, el espacio extracelular se congelará, mientras que las células quedarán sin congelar pero sobreenfriadas (quedan a una temperatura por debajo de su punto de congelación pero sin formarse hielo)<sup>(75)</sup>.

La congelación del líquido extracelular produce la separación de los solutos de parte del solvente, lo que va a dar lugar a la formación de cristales de hielo y su acúmulo en la fracción líquida extracelular restante, que es de escasa cantidad y que rápidamente se hace hiperosmolar con respecto al interior de la célula.

El siguiente paso es que la célula responde perdiendo agua y reduciendo su volumen con lo que la membrana celular es más sensible a los factores mecánicos. Posteriormente, cuando la célula recupere su volumen en la descongelación, se producirán fenómenos de lisis.

El citoplasma, a su vez, se concentra y ejerce el mismo efecto hiperosmolar frente a los orgánulos celulares, incluido el núcleo.

**c. Efecto lesivo de los cristales de hielo:** Las células atrapadas entre los cristales de hielo y rodeadas de un medio hipertónico están sometidas a esfuerzos mecánicos y eléctricos.

Se generan campos eléctricos que pueden alterar aún más el equilibrio de la membrana celular y se forman burbujas de gas que lesionan las células al entrar en contacto con ellas<sup>(9)</sup>.

Finalmente se produce la congelación intracelular como resultado del equilibrio termodinámico y suele ser un suceso letal para la célula, salvo en aquellos casos en que se producen cristales de muy pequeño tamaño.

Parece ser que los cristales cúbicos no lesionan la célula ya que son de pequeño tamaño. Si se produce el paso de la forma cúbica a la hexagonal, los cristales aumentan mucho de tamaño y lesionan la célula.

Si la velocidad de congelación es alta, la pérdida del agua intracelular es baja con respecto al medio extracelular hipertónico, lo que es beneficioso; pero, a cambio, se facilita la formación de cristales de hielo de gran tamaño en el espacio intracelular.

Es decir, las bajas velocidades de congelación son nocivas por el efecto osmolar que producen; sin embargo, si la congelación es muy rápida, la lesión se produce por el gran tamaño de los cristales de hielo intracelulares producidos.

Debemos encontrar el punto óptimo de equilibrio entre congelación rápida y lenta para causar el menor daño celular posible. Esto muchas veces sólo se consigue de manera empírica, tras sucesivas pruebas y con el empleo de diferentes medios crioprotectores.

Los agentes crioprotectores deben minimizar la agresión celular producida por la hiperosmolaridad y el hielo extracelular y deben prevenir la formación de hielo intracelular nocivo<sup>(75)</sup>.

Antes de la congelación, debemos probar los medios crioprotectores incubando las células en dichos medios a la mayor concentración posible sin que las lesionen, y posteriormente bajar la temperatura progresivamente.

Es necesario que posean cierto grado de penetrabilidad (moléculas de pequeño tamaño) para que su poder protector llegue al espacio intracelular, junto con un poder específico de protección de las estructuras celulares y de sus moléculas en un citoplasma "hiperconcentrado".

La mayoría de ellos (DMSO, glicerol, metanol, sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, 1-2 propanodiol, prolina) son de bajo peso molecular, lo que no ocurre con el dextrano y la polivinilpirrolidona (PVP), con menor poder de penetración<sup>(75)</sup>.

Su éxito como protectores respecto a la viabilidad, al contrario que la preservación de la ultraestructura, es limitado, y posiblemente, se relaciona con el rápido aumento de viscosidad a concentraciones crecientes y temperaturas progresivamente decrecientes, que reducirían la tasa de difusión de agua fuera de las células. En cambio, esto disminuiría el nivel de enfriamiento requerido para conseguir la deshidratación necesaria para asegurar la supervivencia a temperaturas "ultrabajas"<sup>(75)</sup>.

Una alternativa al enfriamiento lento, y su inconveniente de formación de cristales de hielo, es la transición del agua al estado amorfo o vítreo a través de la vitrificación.

La vitrificación es la solidificación de un líquido conseguida no por cristalización, sino por una elevación extrema de la viscosidad durante el enfriamiento.

Para vitrificar el agua pura se necesita llevarla a la temperatura de transición vítrea en unas condiciones determinadas, y ello implica una velocidad de congelación ultrarrápida. Conseguir la completa vitrificación del agua es muy difícil, si no imposible; lo que se suele producir es una cierta cantidad de hielo cristalino en el seno de una matriz vítrea.

Las soluciones acuosas como el líquido intra y extracelular, en células en suspensión, vitrifican más fácilmente que el agua pura y a velocidades progresivamente más lentas a medida que aumenta la concentración del soluto.

Si las células se deshidratan lo suficiente como para aumentar la concentración efectiva del citoplasma, se puede llegar a una situación en que la vitrificación se produce a una temperatura relativamente alta, y con los niveles de enfriamiento que se pueden conseguir con la simple inmersión de la célula en nitrógeno líquido.

Esto se explica en el diagrama que indica que la vitrificación es posible en el punto en que la curva que representa el punto de fusión se cruza con la que representa la temperatura de transición vítrea (ó al estado cristalino)<sup>(61)</sup> (Gráfico 1).

Si se consigue la severa deshidratación necesaria sin producir daño letal a las células, la vitrificación puede ser

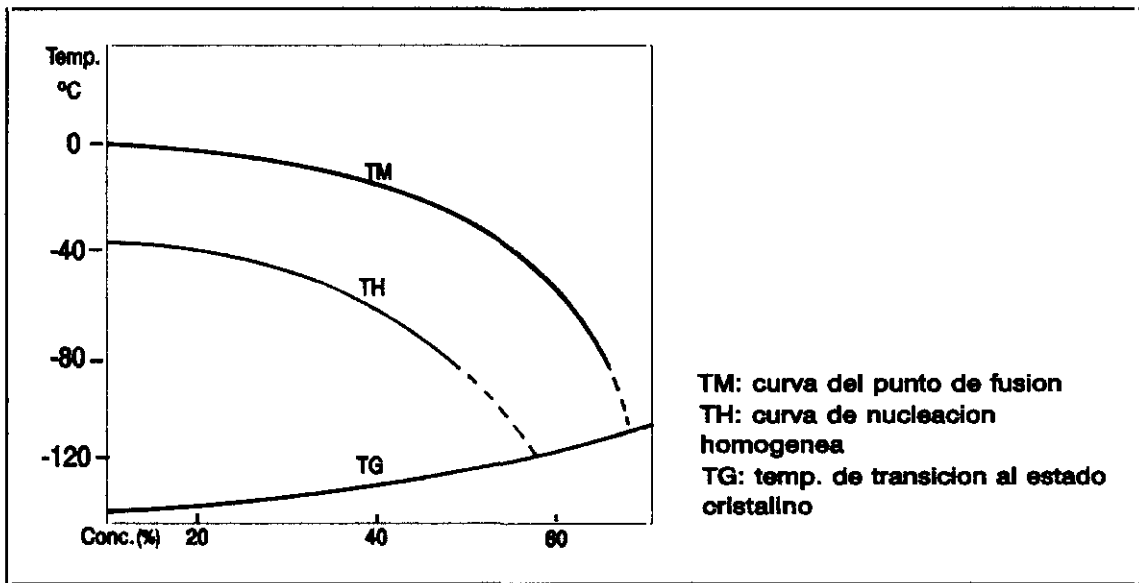


Gráfico 1

considerada como una vía alternativa para conseguir una crioconservación satisfactoria.

### 10.1. CRIOCONSERVACION DE LAS GLANDULAS PARATIROIDES

Como ya hemos descrito anteriormente, para una correcta crioconservación de las glándulas paratiroides, debemos tener en cuenta:

- El medio de conservación.
- El agente crioprotector.
- La velocidad de congelación.
- La temperatura de almacenamiento.
- La manera de llevar a cabo la descongelación.

A todo ello podemos añadir el tiempo que van a permanecer las glándulas paratiroides en crioconservación.

Sonoda, en 1968, emplea un medio para conservar glándulas paratiroides en perros consistente en 77% de Solución de Hank, 10% de suero autólogo y 13% de DMSO. El experimento compara la conservación durante 24 horas a +4° C de temperatura, con un período de 7 días a -20° C. Tras reimplantar las glándulas en los animales llega a la conclusión de que la temperatura de -20° C junto con el empleo del DMSO son los que ofrecen las mejores condiciones de conservación, no encontrando diferencias en cuanto al tiempo que dura ésta. No tiene en cuenta la velocidad a la que baja la temperatura hasta llegar a los -20° C <sup>(167)</sup>.

En 1974, Wells emplea en ratas un medio compuesto por 80% de Medio de Waymouth, 10% de DMSO y 10% de suero autólogo<sup>(190)</sup>. Las glándulas son colocadas en unos crioviales

de 3 ml. de capacidad a los que se añade 1,5 ml. de la solución antes descrita.

Los viales se introducen en un congelador programado para bajar la temperatura a una velocidad de  $-1^{\circ}$  C por minuto hasta llegar a  $-80^{\circ}$  C, y a partir de este punto los enfría rápidamente hasta llegar a  $-200^{\circ}$  C. A continuación son depositados en un contenedor especial de N líquido que mantiene una temperatura constante de  $-196^{\circ}$  C. Los períodos de conservación son de 3, 6, 9 y 12 meses.

La descongelación se lleva a cabo sumergiendo los viales directamente en un baño de agua a  $+37^{\circ}$  C con agitación constante hasta que desaparecen los cristales de hielo del interior de los mismos. El contenido se lava tres veces con una solución de Medio de Waymouth puro a  $+4^{\circ}$ C, para evitar el efecto tóxico del DMSO a temperatura ambiente.

A continuación se reimplantan las glándulas, siendo el resultado completamente satisfactorio en los tres primeros grupos, encontrando disminución de la viabilidad en las glándulas que han permanecido 12 meses en crioconservación.

Wells apunta que, dado el pequeño tamaño de las glándulas paratiroides de la rata, la penetración del frío y del DMSO son rápidas y eficaces, y recomienda que si se quieren conservar glándulas de mayor tamaño como las del perro y las humanas, deben ser divididas en fragmentos de menor tamaño<sup>(190)</sup>.

El primer autotrasplante de tejido paratiroideo humano criopreservado lo realiza Wells, en 1977, en un paciente

aquejado de insuficiencia renal al que se le extirpan 5 glándulas paratiroides hiperplásicas y una de ellas se conserva siguiendo el método descrito tres años antes.

La implantación se lleva a cabo con anestesia local seis semanas después de la primera intervención, constituyendo un éxito, aunque 2 años después, el tejido trasplantado presentó hiperplasia posiblemente a consecuencia del estímulo prolongado producido por la insuficiencia renal mantenida del paciente<sup>(193)</sup>.

Es en 1978 cuando Leight propone el empleo del Medio RPMI 1640, manteniendo las proporciones de DMSO y suero autólogo, obteniendo resultados satisfactorios en perros<sup>(105)</sup>.

Brennan en 1978 modifica la técnica de Wells, empleando 80% de RPMI 1640, 10% de DMSO y 10% de suero autólogo, añadiendo una pequeña cantidad de penicilina y estreptomina al medio. La velocidad de congelación es de -1 a -2° C por minuto en congelador programable. La descongelación se realiza en un baño a +42° C y el contenido de los viales se lava con RPMI 1640. Los resultados obtenidos son igualmente satisfactorios<sup>(21)</sup>.

Saxe en 1982 emplea las mismas proporciones de RPMI 1640, DMSO y suero autólogo y la congelación la realiza empleando alcohol etílico enfriado a -60° C durante una noche, y a la mañana siguiente introduce los viales en N líquido a -196° C. La descongelación y el lavado son como en el método descrito por Brennan<sup>(159,160)</sup>.



Basile en 1980<sup>(13,14)</sup> propone un método simplificado de congelación para evitar el elevado coste que supone el empleo del congelador programable. La solución consiste en 80% de Medio de Waymouth, con un 10% de DMSO y de suero autólogo respectivamente. La congelación se realiza introduciendo los crioviales que contienen los fragmentos de glándulas paratiroides en un congelador a  $-80^{\circ}$  C durante 16 horas, y a continuación los pasa al N líquido directamente. La descongelación no varía con respecto al método de Wells, y demuestra su efectividad tanto en ratas como con tejido humano<sup>(14)</sup>.

Henry, en 1984, propone un nuevo método de congelación y emplea Medio de Waymouth (80%), con 10% de suero autólogo y 10% de DMSO. Congela los viales a  $-1^{\circ}$  C por minuto hasta llegar a  $-60^{\circ}$  C y luego sigue a una velocidad de  $-6^{\circ}$  C por minuto hasta llegar a  $-120^{\circ}$  C. De aquí pasa al N líquido. Los resultados que obtiene son satisfactorios<sup>(89)</sup>.

Wagner, en 1986<sup>(180)</sup>, describe una modificación del método de Wells. Las glándulas paratiroides se fragmentan en porciones de  $1\text{mm}^3$ . y se introducen en grupos de 10 fragmentos en crioviales que contienen 80% de RPMI 1640, 10% de suero AB y 10% de DMSO. Los viales se introducen en un congelador programable y se enfrían a una velocidad de  $-1^{\circ}$  C por minuto hasta llegar a  $-80^{\circ}$  C y a continuación a  $-20^{\circ}$  C por minuto hasta llegar a  $-196^{\circ}$  C, para pasar a almacenarlos en N líquido.

## *Introducción*

La descongelación se lleva a cabo sumergiendo los viales en un baño a  $+37^{\circ}$  C en agitación continua hasta la desaparición del hielo de su interior, y los fragmentos glandulares se lavan 5 veces con RPMI 1640 al 80% y suero AB al 20%, todo ello a una temperatura de  $+37^{\circ}$  C.

Para determinar cuál es la velocidad de congelación que menos daña a las células, hace pruebas simultáneas variando la velocidad de congelación entre  $-0,5$  y  $-2^{\circ}$  C por minuto. Con el tejido descongelado se realizan estudios morfológicos de la integridad celular, y se preparan suspensiones celulares que se someten a diferentes concentraciones de Calcio y Magnesio, evaluando la respuesta celular en cuanto a la frenación en la síntesis de paratohormona.

Los mejores resultados se consiguen enfriando a razón de  $-1^{\circ}$  C por minuto, sin influir el tiempo que puedan permanecer las glándulas en crioconservación.

Al realizar estudios morfológicos en las células descongeladas, observa que se produce una necrosis parcial del tejido paratiroideo, pero las células que sobreviven conservan sus mecanismos de regulación y su capacidad de producir hormona paratiroidea. En consecuencia se debe trasplantar mayor cantidad de tejido crioconservado del que trasplantaríamos si se tratara de tejido fresco, y justo en la proporción que determine el porcentaje de tejido necrosado.

Wagner, también en 1986<sup>(181)</sup>, propone un método de congelación alternativo que nos evite el elevado coste que supone el congelador programable:

El medio de conservación y la fragmentación de las glándulas paratiroides son iguales que en el método que emplea el congelador programable. Se colocan los crioviales en una gradilla que a su vez se pone en una cubeta de plástico que contiene metanol a temperatura ambiente. Se va añadiendo nieve carbónica al metanol para que la temperatura descienda a una velocidad de  $-1^{\circ}$  C/min. hasta llegar a  $-25^{\circ}$  C. El descenso de la temperatura se controla mediante un cronómetro y un termómetro introducido en uno de los crioviales que contiene 1ml. del mismo medio de conservación. A continuación se baja la temperatura a una velocidad de  $-1^{\circ}$  C/min. hasta alcanzar los  $-70^{\circ}$  C, añadiendo más nieve carbónica a la cubeta. Para finalizar, los viales se almacenan en N líquido a  $-196^{\circ}$  C.

## 11. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DEL TEJIDO CRIOCONSERVADO

El método ideal para comprobar la viabilidad del tejido crioconservado sería el reimplante en el sujeto al que previamente se haya sometido a la paratiroidectomía total.

Evidentemente esto no se puede realizar en el hombre por razones éticas obvias, y este sistema sólo nos servirá para animales de experimentación<sup>(13,14,105,167,188)</sup>.

Pero los estudios en animales de experimentación no son totalmente extrapolables al ser humano, pues como ya hemos visto anteriormente, la simple diferencia de tamaño entre las glándulas paratiroides humanas y de las ratas influye de una manera decisiva en el resultado de la crioconservación.

Se han diseñado dos tipos de métodos para comprobar la viabilidad del tejido paratiroideo humano tras la crioconservación: estudios funcionales in vitro y estudios morfológicos.

Los estudios morfológicos consisten en el estudio del tejido crioconservado mediante microscopía óptica y electrónica para determinar el grado de necrosis celular<sup>(180)</sup>.

Los estudios funcionales in vitro consisten en preparar dispersiones de células paratiroides a las que se somete a elevadas concentraciones de Calcio y/o Magnesio, y se estudia la disminución en la producción de hormona paratiroidea como respuesta a estos estímulos<sup>(179)</sup>.

El estudio se realiza con el tejido recién extirpado del paciente (en fresco), y nos servirá de referencia para comparar con lo que ocurra con el tejido crioconservado.

Si la disminución en la síntesis de paratohormona al aumentar la concentración de Ca o Mg es significativa, se puede considerar que el tejido ha sobrevivido a la crioconservación y mantiene su capacidad funcional.

Las dispersiones celulares se preparan sometiendo al tejido paratiroideo a enzimas que digieren el tejido conectivo (colagenasa, tripsina, lisozima, DNAasa, etc.); a continuación se filtran y cultivan en un medio adecuado a +37° C durante dos horas. Al final se centrifuga el medio y se determina la paratohormona mediante RIA<sup>(21,26,27,180,181)</sup>.

**OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO  
DEL TRABAJO**

## 12. OBJETIVOS

Se pretende demostrar que se puede llevar a cabo con éxito un programa de crioconservación y autotrasplante de tejido paratiroideo empleando los medios ya existentes en un hospital, y con un coste reducido.

Para su consecución, los objetivos a cubrir son:

1.- Desarrollo de un método de crioconservación de tejido paratiroideo utilizando la tecnología habitual de un Hospital General.

2.- Aplicación de un sistema de control de la viabilidad funcional del tejido paratiroideo "in vitro".

3.- Comprobación de la viabilidad del tejido paratiroideo crioconservado, comparando su función con la del tejido en fresco.

## 13. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Para la realización de esta experiencia, el trabajo se ha planteado de la siguiente manera:

Elección del medio de congelación.

Aprendizaje del empleo de material de laboratorio y de muestras en condiciones estériles, en campana de flujo laminar.

Elección del tipo de crioviales más adecuado al tejido a emplear.

## *Objetivos y planteamiento*

Elección del método para la fragmentación del tejido.

Acondicionamiento de congeladores a -20 y -80°C en el hospital.

Aprendizaje en la preparación y manejo de suspensiones celulares, así como de la tinción y recuento celulares.

Comprobación de la función del tejido crioconservado, mediante la variación en las concentraciones de calcio y magnesio de los medios de suspensión celular.

Análisis estadístico de los resultados.



## **MATERIAL Y METODOS**

**14. MATERIAL**

**-TEJIDO PARATIROIDEO**

Se obtiene de las piezas de paratiroidectomía de 15 pacientes intervenidos en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo "A" del Hospital 12 de Octubre, entre el 3 de Febrero de 1989 y el 20 de Noviembre de 1991.

**-MEDIO DE CONGELACION**

Se compone de 80% de RPMI 1640, 10% de suero del paciente, 10% de DMSO y una pequeña cantidad de antibiótico (600.000 U.I. de Penicilina G sódica y 3 mg. de Gentamicina por cada 20 ml. de medio de congelación).

El medio RPMI 1640 es suministrado por Laboratorios FLOW. Cultek S.L. Madrid. Su composición es la siguiente:

L-Arginina	200	mg/l.
L-Asparaguina	56,82	mg/l.
L-Acido aspartico	20	mg/l.
L-Cisteina	59,15	mg/l.
L-Acido glutamico	20	mg/l.
L-Glutamina	300	mg/l.
Glutation	1	mg/l.
Glicina	10	mg/l.
L-Histidina	15	mg/l.
L-Hidroxiprolina	20	mg/l.
L-Isoleucina	50	mg/l.

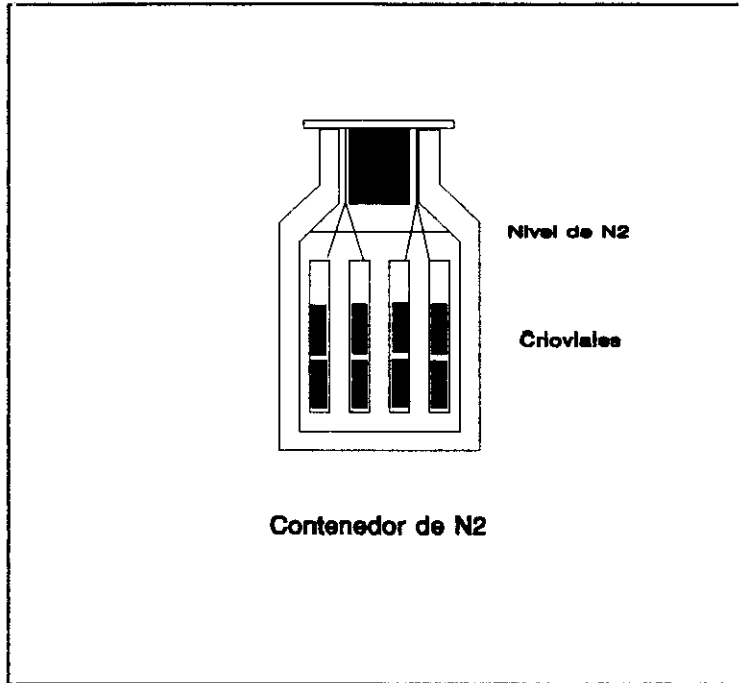
*Material y métodos*

L-Leucina	50	mg/l.
L-Lisina	40	mg/l.
L-Metionina	15	mg/l.
L-Fenil alanina	15	mg/l.
L-Prolina	20	mg/l.
L-Serina	30	mg/l.
L-Treonina	20	mg/l.
L-Triptofano	5	mg/l.
L-Tirosina	24,86	mg/l.
L-Valina	20	mg/l.
Biotina	0,20	mg/l.
Pantotenato calcico	0,25	mg/l.
Acido folico	1	mg/l.
Inositol	35	mg/l.
Nicotinamida	1	mg/l.
Acido aminobenzoico	1	mg/l.
Piridoxina	1	mg/l.
Riboflavina	0,20	mg/l.
Tiamina	1	mg/l.
Vitamina B <sub>12</sub>	0,005	mg/l.
(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca	69,49	mg/l.
ClK	400	mg/l.
SO <sub>4</sub> Mg 7H <sub>2</sub> O	100	mg/l.
ClNa	6.000	mg/l.
CO <sub>3</sub> HNa	2.000	mg/l.
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>	800,7	mg/l.
D-Glucosa	2.000	mg/l.



**-CONTENEDOR DE NITROGENO**

Consiste en un recipiente de acero de boca ancha y con las paredes aisladas térmicamente. En su interior se encuentran 8 celdillas cilíndricas sin tapa y con el fondo de rejilla, que sirven para mantener los tejidos sumergidos



en el nitrógeno líquido. Es importante que los viales no puedan flotar en el nitrógeno, pues luego sería prácticamente imposible recuperarlos. Para ello nos servimos de los recipientes donde se recogen las muestras de orina, que son de plástico, cilíndricos y con la tapa de rosca, y les practicamos múltiples perforaciones para que entre en ellos el nitrógeno y no floten. El contenedor de N líquido requiere una atención con una periodicidad semanal para vigilar el nivel del nitrógeno. Se encuentra situado en el Departamento de Anatomía Patológica. (Fabricado por L'Air Liquide y distribuido en España por la S.E.O. Madrid).

**-MEDIO DE DIGESTION**

Se compone de 30 ml. de HMEM con 20 mMol/L. de buffer Hepes, más 2 ml. de Tripsina al 0,03% y 1 ml. de Colagenasa al 0,05%.

El medio HMEM (Minimum Essential Medium Eagle with Hank's Salts) es suministrado por los Laboratorios FLOW. Cultek S.L. Madrid. Su composición es la siguiente:

L-Arginina	126,40	mg/l.
L-Cisteina	28,42	mg/l.
L-Glutamina	292,30	mg/l.
L-Histidina	41,90	mg/l.
L-Isoleucina	52,50	mg/l.
L-Leucina	52,50	mg/l.
L-Lisina	73,06	mg/l.
L-Metionina	14,90	mg/l.
L-Fenil alanina	33,02	mg/l.
L-Treonina	47,64	mg/l.
L-Triptofano	10,20	mg/l.
L-Tirosina	45,02	mg/l.
L-Valina	46,90	mg/l.
Pantotenato calcico	1	mg/l.
Acido folico	1	mg/l.
Inositol	2	mg/l.
Nicotinamida	1	mg/l.
Piridoxal	1	mg/l.
Riboflavina	0,1	mg/l.
Tiamina	1	mg/l.

*Material y métodos*

Cl <sub>2</sub> Ca 2H <sub>2</sub> O	185,50	mg/l.
ClK	400	mg/l.
PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub>	60	mg/l.
SO <sub>4</sub> Mg 7H <sub>2</sub> O	200	mg/l.
ClNa	8000	mg/l.

La Tripsina y la Colagenasa la suministran los Laboratorios SIGMA CHEMICAL COMPANY. St. Louis, MO 63178 USA.

**-INCUBADOR-AGITADOR** orbital de aire modelo 25, New Brunswick Scientific CO., Inc. (Edison, New Jersey, USA)

**-MICROSCOPIO**

Microscopio invertido Olympus IM, con cámara Nikon FX-35 y dispositivo automático de exposición Nikon AFX (Tokio, Japón).

**-HEMOCITOMETRO**

Cámara de recuento de células tipo Neubauer (Brand, Alemania).

**-MEDIOS DE CULTIVO**

El medio "Basal" contiene medio HMEM con 20mMol/l. de buffer Hepes, 0,2% de Seroalbúmina y 0,3% de Glutamina. Tiene una concentración de 1,26 mMol./l. de Calcio y 0,81 mMol./l. de Magnesio (Laboratorios SIGMA).

## *Material y métodos*

El medio denominado "Calcio" contiene la misma cantidad del medio de cultivo descrito en el párrafo anterior, y se le añade  $\text{Cl}_2$  Ca hasta que el Calcio llegue a una concentración de 3,76 mMol./l.

El medio denominado "Magnesio" contiene el mismo medio y se añade  $\text{SO}_4$  Mg hasta conseguir una concentración de Mg de 3,31 mMol./l.

### **-BAÑO A 37°C**

Baño ajustable de agua PRECISTERM S-385, marca P-SELECTA (España).

### **-SOLUCION DE LAVADO**

Se compone de 80% de RPMI 1640 y 20% de suero humano AB.

### **-CONTADOR $\gamma$**

Se emplea un contador Behring Gamma Counter 1612.

### **-KIT PARA CUANTIFICAR LA HORMONA PARATIROIDEA**

Kit ALLEGRO® intact PTH. (Nichols Institute Diagnostics. San Juan Capistrano, Ca. 92675. U.S.A.)

### **-SOFTWARE INFORMATICO**

Se ha empleado el programa para análisis estadístico SIGMA, de Horus Hardware S.L., Madrid.



Para el tratamiento de textos se ha empleado el programa **WORD PERFECT 5.1** versión en castellano, distribuido por Word Perfect Ibérica S.A.

Los gráficos se realizaron con el programa **HARVARD GRAPHICS 3.0**.

**-ORDENADOR PERSONAL**

Se ha empleado un ordenador personal **ALLIED 386/33** para el tratamiento de textos y análisis estadístico.

**-IMPRESORA**

La impresión se realizó con una impresora **HEWLETT PACKARD mod. DESKJET 500**.

## **15. METODOLOGIA**

El método seguido para la congelación y crioconservación es semejante al descrito por Wells<sup>(190)</sup> en cuanto a la forma de fragmentar las glándulas paratiroides, los medios de cultivo celular empleados y la forma de almacenar el tejido a baja temperatura.

Difiere en cuanto a la manera de realizar la congelación, ya que Wells emplea un congelador programable para descender progresivamente la temperatura, y nuestro método sigue un sistema de enfriamiento "en etapas".

El método consiste en mantener el tejido fragmentado a +4°C durante 1 hora; a continuación se pasa el tejido a un congelador a -20°C donde permanecerá durante 2 horas más; transcurrido ese tiempo se pasan los fragmentos glandulares a otro congelador a -80°C y allí permanecerán 3 horas más; finalmente se pasan al contenedor de N líquido a -196°C.

### **15.1. PREPARACION DEL MEDIO DE CONGELACION**

El día anterior a la intervención quirúrgica, se extraen 10 cc. de sangre del paciente en condiciones de esterilidad y se colocan en un tubo de vidrio estéril para centrifugadora (tubo de pico). La mañana de la intervención se centrifuga la sangre para separar el suero.

A partir de este momento, todas las manipulaciones se realizan en la campana de flujo laminar.

Se toman 2 cc. de suero del paciente y se colocan en un frasco estéril que nos servirá para realizar la mezcla de los componentes. Se añaden 16 cc. del medio de cultivo RPMI 1640, una pequeña cantidad de antibiótico (600.000 u.i. de Penicilina G sódica y 3mg. de Gentamicina por cada 20 cc. de medio), y al final, 2 cc. de DMSO.

Así tenemos 20cc. de un medio que contiene 80% de RPMI 1640, 10% de suero autólogo y 10% de DMSO.

#### 15.2.CRIOVIALES

Se toman 10 crioviales estériles y se escribe en ellos el nombre del paciente y la fecha de la intervención.

Se abren los crioviales y se introduce 1,5 cc. del medio en cada uno de ellos, quedando otros 5 cc. que se colocan en un tubo de cristal estéril que nos servirá como medio de transporte del tejido para las determinaciones en fresco.

Tanto los viales como el tubo de cristal se colocan en el interior de un recipiente cúbico de poliuretano expandido que está lleno de hielo picado, con lo que el medio queda a +4° C.

Los viales son trasladados al quirófano donde ya se ha comenzado la intervención quirúrgica y se colocan en hielo o en el frigorífico, para que permanezcan a +4°C.

15.3. PREPARACION DEL TEJIDO PARA CRIOCONSERVACION

Una vez identificadas las 4 glándulas paratiroides, se extirpan y se pesan, dejando marcados sus pedículos con clips metálicos.

Se toma un fragmento de cada una de ellas y se envían para su estudio anatomopatológico, tanto intraoperatorio como diferido, y el resto de las glándulas se coloca en una cápsula de acero inoxidable que contiene suero fisiológico frío a +4° C y que a su vez está sobre otra cápsula de mayor tamaño y llena de suero fisiológico helado y picado.

A partir de este momento se toma nota de la hora, ya que la primera etapa de la criopreservación supone mantener las células durante 1 hora a +4° C.

Se seleccionan las glándulas que macroscópicamente tienen mejor aspecto y, con instrumental fino, se despojan de la grasa y el tejido conectivo que las rodea, y se fragmentan en porciones de 1 mm<sup>3</sup> ., en un número no inferior a 150.

Se introducen en cada vial 10 fragmentos y se cierran éstos herméticamente, volviendo a colocarlos en el hielo. Se introducen 30 fragmentos en el tubo de cristal que transportará el tejido para las determinaciones en fresco.

El resto de los fragmentos se deja en el suero fisiológico para que el cirujano emplee los que crea más convenientes para realizar el autotrasplante en el antebrazo del paciente.

15.4. CONGELACION DEL TEJIDO

Al cabo de una hora de permanecer en el hielo, los crioviales no utilizados en el autotrasplante inmediato, son introducidos en un congelador a  $-20^{\circ}$  C, donde permanecerán durante 2 horas.

A continuación se pasan a un congelador a  $-80^{\circ}$  C donde permanecerán durante 3 horas más, para luego pasarlos definitivamente al contenedor de N líquido a  $-196^{\circ}$  C

Es importante anotar la celda o cestilla en que colocamos los viales, y en qué orden se encuentran en el contenedor, para facilitar su búsqueda posterior.

### 15.5. ESTUDIO EN FRESCO

De manera simultánea con el transporte y congelación del tejido, se procesa el tejido en fresco.

En primer lugar, se lava el tejido 3 veces seguidas con RPMI 1640 para eliminar todo resto del DMSO, que sería letal para las células a temperatura ambiente.

Seguidamente se prepara el medio de digestión, consistente en 30 ml. de HMEM con 20 nMol/l. de buffer HEPES, más 2 ml. de Tripsina al 0,03% y 1 ml. de Colagenasa al 0,05%.

A este medio se añaden los fragmentos de glándula paratiroides y se coloca en un agitador a +37° C durante 45 minutos, para que se lleve a cabo la digestión del tejido conectivo y se separen las células paratiroides.

Una vez transcurrido este tiempo, la suspensión así producida se filtra con una malla de nylon fina, desechando los detritus retenidos por la misma.

El filtrado se centrifuga a 200 g. durante 10 minutos, con lo que las células paratiroides quedan en el fondo del tubo.

Mientras se lleva a cabo la digestión y centrifugación, se preparan tres medios diferentes para la incubación de la suspensión celular, y los llamamos "BASAL", "CALCIO" y "MAGNESIO". El medio "Basal" contiene medio HMEM con 20mMol/l. de buffer Hepes, 0,2% de Seroalbúmina y 0,3% de

## *Material y métodos*

Glutamina. Tiene una concentración de 1,26 mMol./l. de Calcio y 0,81 mMol./l. de Magnesio. El medio denominado "Calcio" contiene la misma cantidad del medio de cultivo descrito en el párrafo anterior, y se le añade  $Cl_2$  Ca hasta que la concentración del Calcio llegue a 3,76 mMol./l. El medio denominado "Magnesio" contiene el mismo medio y se añade  $SO_4$  Mg hasta conseguir una concentración de Mg de 3,31 mMol./l.

El centrifugado se resuspende en medio HMEM con un 20% de albúmina bovina y se determina la viabilidad celular mediante tinción con azul tripano y empleando un hemocitómetro. Debemos tener un 95% de células viables. El hemocitómetro nos servirá para llevar a cabo el recuento celular por  $mm^3$  .

Seguidamente se colocan  $1 \times 10^5$  cel viables/ml. en cada uno de los tres medios antes descritos y se cultivan durante 2 horas a  $+37^\circ C$  en el mismo agitador que empleamos durante el proceso de digestión.

Finalizada la incubación, se centrifugan los tres medios a 400 g. durante 10 minutos y se toman 0,5ml. del sobrenadante de cada uno de los medios, que debidamente marcado, se conserva a  $-20^\circ C$  hasta que el Laboratorio de Hormonas cuantifique la paratohormona.

15.6.DESCONGELACION Y ESTUDIO DEL TEJIDO CRIOCONSERVADO

Es importante que la descongelación se lleve a cabo rápidamente y a continuación se deberá lavar el tejido paratiroideo para eliminar cualquier resto de DMSO.

El día anterior a la descongelación, el Servicio de Hematología (retipaje) nos suministra un tubo conteniendo 10 cc. de sangre AB, que posteriormente centrifugaremos para extraer el suero.

Se prepara un medio que se compone de 80% de RPMI 1640 y 20% de suero humano AB, y que constituirá la solución de lavado.

Los crioviales se sacan del contenedor y se introducen en un baño a +37° C con agitación continua hasta la casi total desaparición de los cristales de hielo del interior de los mismos. En ese momento se vacía su contenido en un tubo estéril y se lava tres veces con la solución de lavado antes preparada.

A partir de este momento, el estudio funcional es idéntico al realizado con el tejido fresco<sup>(180)</sup>.





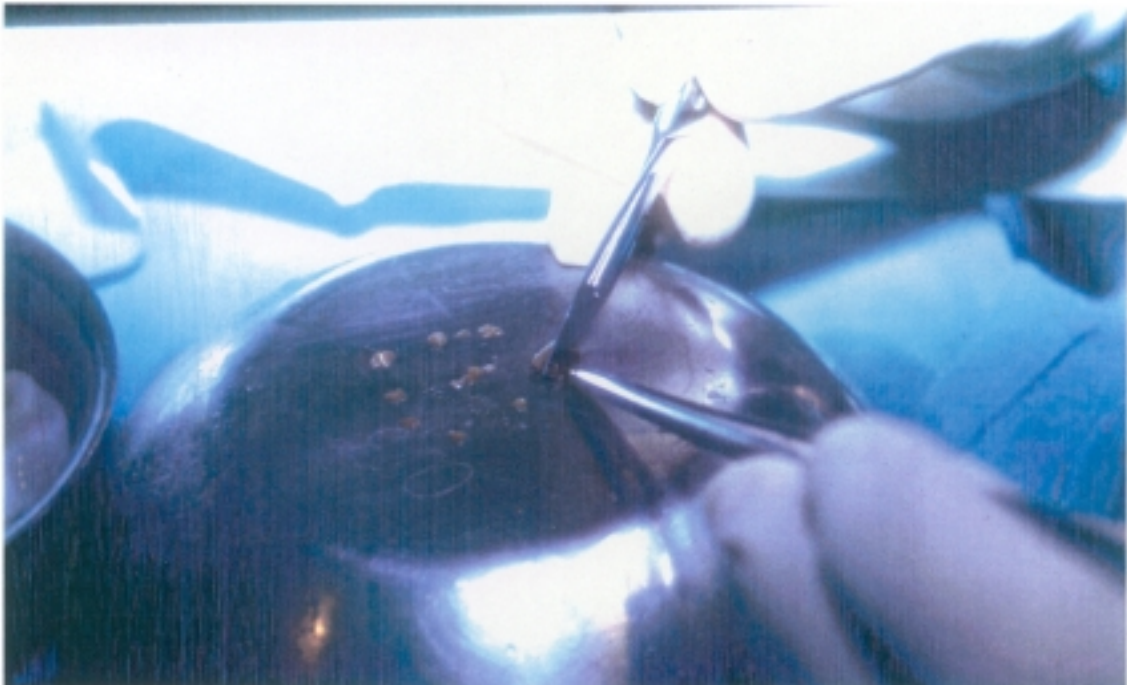
*Foto 1*

*Campana de flujo laminar*



*Foto 2*

*Crioviales preparados para recibir el tejido*



*Foto 3*

*Limpieza y fragmentación del tejido*



Foto 4

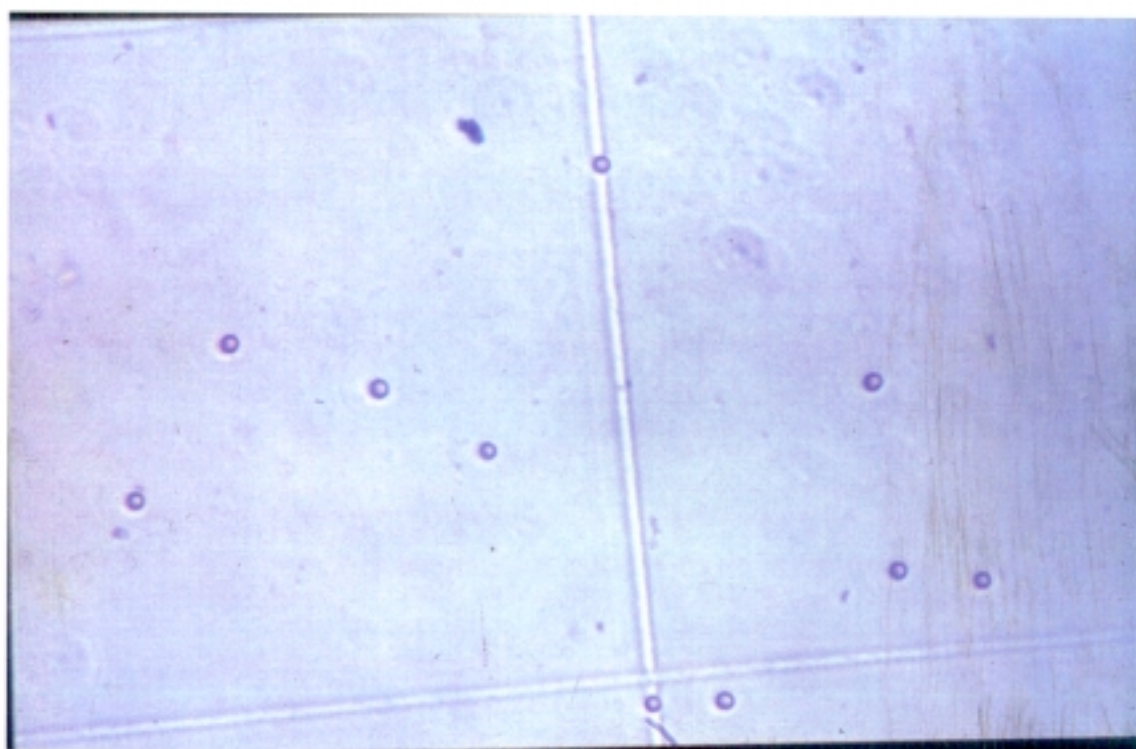
Crioviales conteniendo el tejido, en hielo a  $+4^{\circ}\text{C}$



**Foto 5**

**Baño a +37°C para descongelar el tejido**





*Foto 6*

*Estudio morfológico y contaje de células viables*

### 15.7. DETERMINACION DE LA HORMONA PARATIROIDEA

La cuantificación de la molécula intacta de PTH se lleva a cabo utilizando una técnica IRMA de formación de un complejo "sandwich" por la posibilidad de disponer de dos anticuerpos, dirigidos a distintos epitopos moleculares, uno de los cuales está marcado con  $I^{125}$ .

El primer anticuerpo, policlonal obtenido en cabra, reconoce la secuencia carboxi-terminal entre los aminoácidos 39-84.

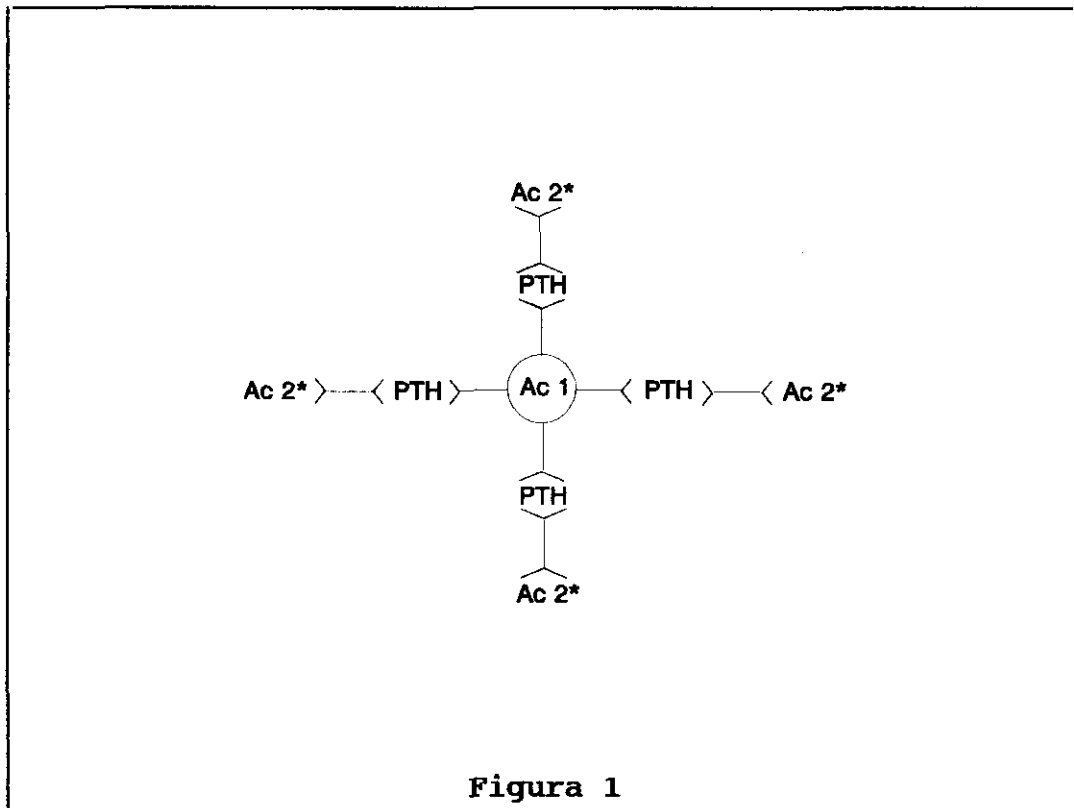
A fin de aumentar la sensibilidad de la metódica, dicho anticuerpo, tras su purificación por cromatografía de afinidad, se fija a pequeñas esferas de polietileno, aumentando de esta forma la superficie de contacto, que determina mayor posibilidad de unión entre las moléculas reaccionantes.

A continuación se añade el segundo anticuerpo, también policlonal obtenido en cabra, marcado con  $I^{125}$ , y que reconoce la secuencia 1-34.

Tras un período de incubación de 22 horas a temperatura ambiente para que la reacción alcance el equilibrio, se lavan las pequeñas esferas con un *buffer* de pH=7,4 a fin de eliminar las sustancias contaminantes y disminuir de este modo hasta un mínimo, la ligazón inespecífica del anticuerpo marcado a proteínas séricas de secuencias análogas a las de la PTH.

La afinidad del primer anticuerpo inmovilizado es tal que evita la posible pérdida del complejo formado, no habiendo por otra parte, posibilidad de unión de fragmentos moleculares procedentes de la escisión de la PTH.

La reacción se ajusta al esquema de la figura 1.



Tras el último lavado se procede al contaje de la radiactividad de cada tubo en un contador  $\gamma$ .

Paralelamente a las muestras desconocidas, se procesan una serie de sueros de concentración conocida que constituyen la llamada curva estándar, y una serie de controles de distintos niveles de concentración.

La tasa de PTH de cada suero se determina por interpolación en la curva construida utilizando las c.p.m.



(cuentas por minuto) obtenidas de las soluciones estándar frente a sus propias concentraciones.

El protocolo de trabajo puede resumirse según el esquema siguiente:

	<u>ESTANDAR</u>	<u>CONTROLES</u>	<u>MUESTRAS</u>
ESTANDAR	200 $\mu$ l.	X	X
CONTROLES	X	200 $\mu$ l.	X
MUESTRAS	X	X	200 $\mu$ l.

Añadir a cada tubo: 200 $\mu$ l. de Ac\* y una esferita.

Incubar 22 horas a temperatura ambiente.

Lavar 2 veces con 2ml. de buffer.

Decantar.

Leer.

Previamente el método ha sido validado determinándose exactitud, especificidad y precisión, estando los valores obtenidos dentro de los recomendados por la Comisión Europea de Control de Calidad de la S.E.B.Q.

El intervalo analítico utilizado es de 0,375-1500 pg/ml.

El intervalo de referencia es de 10-60 pg/ml.

*Material y métodos*

La metódica es específica para la molécula de PTH intacta.

15.8.METODO ESTADISTICO

En primer lugar se realiza la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar que la muestra se ajusta a la normal.

A continuación se procede a la comparación de medias en muestras pareadas.

Dado que la muestra es inferior a 30 individuos existe mayor dispersión, por lo que se debe aplicar el coeficiente corrector " t de Student ".

La estimación de la media tendrá el siguiente

$$\text{margen de confianza} = m \pm t \cdot s_e$$

siendo "m" la media hallada en el experimento; "s<sub>e</sub>" es el error estándar de la media y "t" es el valor de Student obtenido de la tabla correspondiente.

## **16. PACIENTES**

Desde el 3 de Febrero de 1989 hasta el 20 de Noviembre de 1991 se han intervenido 15 pacientes para ser incluidos en este estudio.

La distribución por sexos es muy similar, siendo 8 (53,3%) pacientes varones y 7 (46,6%) hembras.

La media de edad se sitúa en  $44,4 \pm 16,03$  años, teniendo el paciente más joven 17 años y 73 el de mayor edad.

Dos de los pacientes fueron diagnosticados de Hiperparatiroidismo Primario por adenoma único en glándula inferior izquierda (PACIENTE 1) y superior derecha (PACIENTE 2) respectivamente.

Doce pacientes más padecían Hiperparatiroidismo (con hiperplasia de las 4 glándulas) Secundario a insuficiencia renal (PACIENTES 3 al 14), siendo portadores de trasplante renal funcionando en el momento de la cirugía paratiroidea 3 de ellos (PACIENTES 12, 13 y 14).

El paciente restante (PACIENTE 15) fué diagnosticado de Hiperparatiroidismo por Hiperplasia de las 4 glándulas paratiroideas en el seno de un Síndrome MEN I.

A los dos pacientes portadores de adenoma único se les practicó la exéresis del adenoma y biopsia de un fragmento de otra glándula aparentemente sana, confirmándose el

diagnóstico. A continuación se procedió a crioconservar una porción del tejido adenomatoso.

A los 13 pacientes restantes se les realizó una paratiroidectomía total con autotrasplante en el antebrazo en el transcurso del mismo acto operatorio, y simultáneamente se procedió a la crioconservación de tejido paratiroideo.

La evolución postoperatoria de todos los pacientes fué satisfactoria, normalizándose las cifras de Calcio y de Hormona Paratiroidea circulante ya durante el postoperatorio inmediato en aquellos pacientes portadores de adenomas. Los pacientes aquejados de Hiperparatiroidismo Secundario presentaron normalización de la PTH circulante de manera inmediata, e hipocalcemia transitoria debida al "hambre ósea de calcio", que requirió de aportes de Calcio (Carbonato Cálcico) y Vitamina D (Rocaltrol®) durante el postoperatorio, según sus requerimientos.

El promedio del tiempo que el tejido paratiroideo permaneció congelado fué de  $9,33 \pm 8,06$  meses; el tiempo mínimo de congelación fué de 4 meses, y el máximo de 28 meses.

## **RESULTADOS**

**RESULTADOS**

Después del proceso de digestión y posterior tinción con azul tripano, el análisis al microscopio óptico de las células mostró una integridad celular superior al 95% en todos los casos. Tras la incubación en los tres diferentes medios (Basal, Calcio y Magnesio), con una concentración celular ajustada a  $10^5$  cél./ml., los valores absolutos de hormona paratiroidea cuantificados en el sobrenadante del centrifugado son los siguientes (pg./ml.):

**PACIENTE 1**

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	3312,8	2673,4	2383,6
T.CRIOCONSERVADO	2290,2	1923,9	1947,0

**PACIENTE 2**

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	422,0	321,0	304,0
T.CRIOCONSERVADO	1276,0	1048,1	1009,0

**PACIENTE 3**

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	1872,0	1350,0	1134,0
T.CRIOCONSERVADO	1160,6	906,3	898,1

Resultados

PACIENTE 4

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	22,4	14,1	12,2
T.CRIOCONSERVADO	760,0	194,0	178,0

PACIENTE 5

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	686,7	553,0	503,5
T.CRIOCONSERVADO	580,0	452,9	372,7

PACIENTE 6

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	2550,0	2089,0	2107,0
T.CRIOCONSERVADO	410,8	304,5	319,1

PACIENTE 7

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	54,1	44,7	37,8
T.CRIOCONSERVADO	86,2	70,7	61,7

PACIENTE 8

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	754,0	545,0	533,0
T.CRIOCONSERVADO	897,0	677,0	681,0



Resultados

PACIENTE 9

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	1123,0	879,0	850,0
T.CRIOCONSERVADO	537,0	403,0	399,0

PACIENTE 10

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	310,9	219,1	271,3
T.CRIOCONSERVADO	2734,0	2073,0	2111,0

PACIENTE 11

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	172,4	134,1	122,0
T.CRIOCONSERVADO	776,0	587,0	595,0

PACIENTE 12

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	468,0	378,0	399,0
T.CRIOCONSERVADO	1302,0	1122,3	1128,8

PACIENTE 13

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	1127,0	950,0	990,0
T.CRIOCONSERVADO	1603,7	1086,5	1272,0

PACIENTE 14

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	68,3	57,9	43,5
T.CRIOCONSERVADO	1511,1	1315,3	1112,3

PACIENTE 15

	<u>BASAL</u>	<u>CALCIO</u>	<u>MAGNESIO</u>
TEJIDO FRESCO	5780,0	3420,0	2820,0
T.CRIOCONSERVADO	484,3	386,4	378,1

La frenación en la secreción de la hormona paratiroidea en los medios a los que se añade Calcio y Magnesio respectivamente, queda reflejada en la tabla siguiente, donde se expresan los porcentajes de producción de hormona paratiroidea con respecto a la producida en el medio basal, que se considera es del 100%:

<u>PACIENTE</u>	<u>DIAGN.</u>	<u>MEDIO RICO EN Ca</u>		<u>MEDIO RICO EN Mg</u>	
		<u>FRESCO</u>	<u>CRIOCONS.</u>	<u>FRESCO</u>	<u>CRIOCONS.</u>
1	HPT 1º	80,7%	84,0%	71,9%	85,0%
2	HPT 1º	76,0%	82,2%	72,0%	79,2%
3	HPT 2º	72,1%	78,0%	60,5%	77,4%
4	HPT 2º	62,9%	25,5%	54,4%	23,4%
5	HPT 2º	80,5%	78,1%	73,3%	64,2%
6	HPT 2º	81,9%	74,1%	82,6%	77,6%
7	HPT 2º	82,6%	82,0%	69,8%	71,5%
8	HPT 2º	72,2%	75,4%	70,6%	75,9%
9	HPT 2º	78,2%	75,0%	75,6%	74,3%
10	HPT 2º	70,4%	75,8%	87,2%	77,2%
11	HPT 2º	77,7%	75,6%	70,7%	76,6%
12	HPT 3º	80,7%	86,2%	85,2%	86,7%
13	HPT 3º	84,2%	67,7%	87,8%	79,3%
14	HPT 3º	84,7%	87,0%	63,6%	73,6%
15	MEN I	59,1%	79,7%	48,7%	78,0%

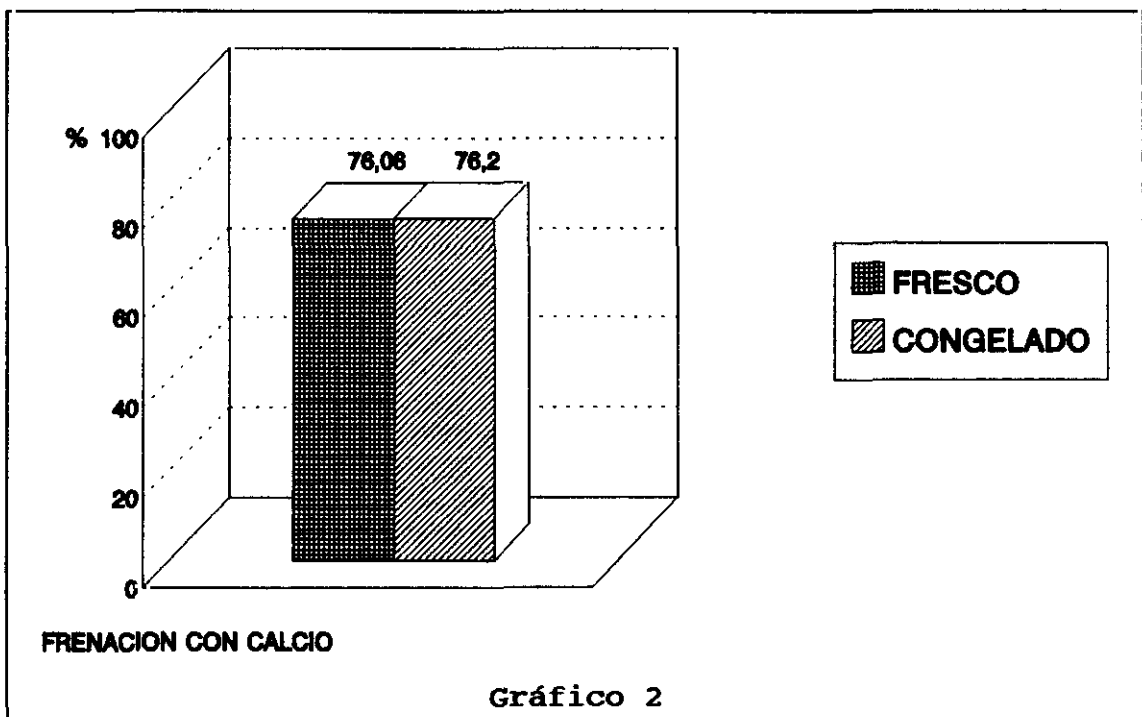
Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (de ajuste a la normal), no encontrando diferencias significativas para una  $p < 0,05$ .

La producción de hormona paratiroidea por el tejido fresco en el medio rico en Calcio presentó una media del  $76,06\% \pm 7,40\%$  de la hormona producida en el medio basal, con un valor mínimo de 59,1% y un valor máximo de 84,2%.

## Resultados

La producción de hormona paratiroidea por el tejido crioconservado en el medio rico en Calcio presentó una media del  $76,20\% \pm 15,17\%$  de la hormona producida en el medio basal, con un valor mínimo del  $25,5\%$  y un valor máximo del  $90,8\%$ .

En ambos casos se procedió a la comparación de medias para muestras pareadas con respecto a la basal del  $100\%$ , encontrando que tanto el tejido fresco como el crioconservado respondían al medio rico en Calcio mediante la frenación en la producción de hormona paratiroidea, y los niveles de frenación tenían significación estadística ( $p < 0,001$ ). (Gráfico 2).

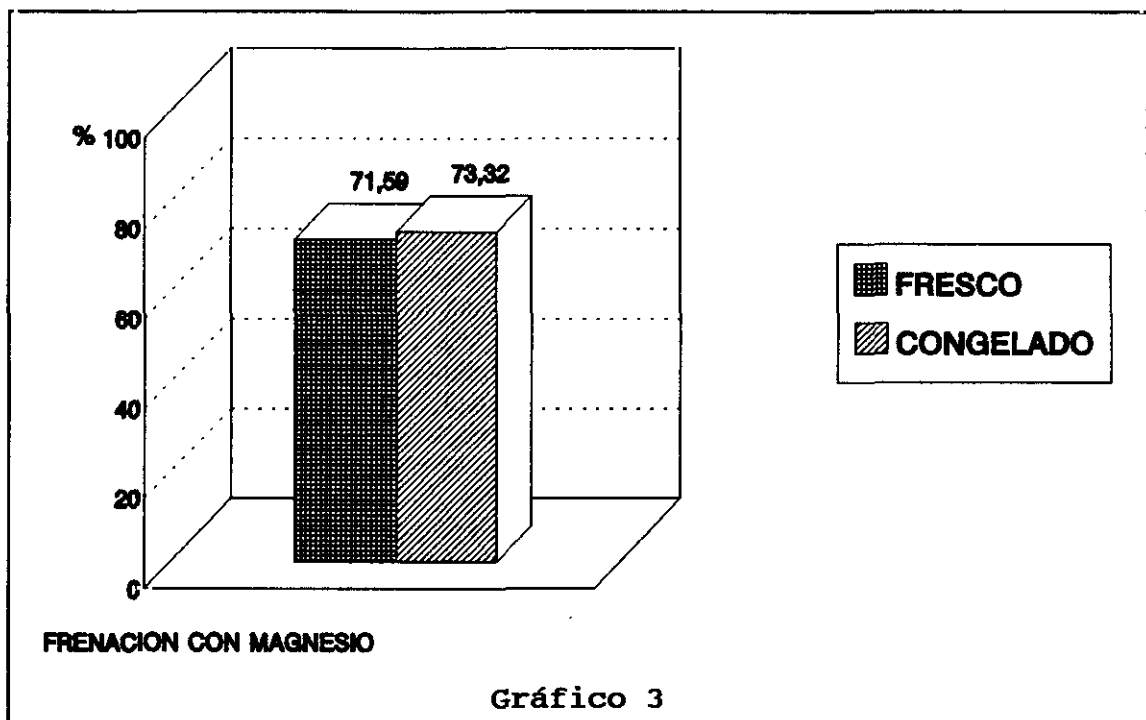


El tejido fresco incubado en un medio rico en Magnesio presentó una producción de hormona paratiroidea con una media

del  $71,59\% \pm 11,47\%$  con respecto al medio basal, situándose sus valores extremos en  $48,7\%$  y  $87,8\%$  respectivamente.

El tejido crioconservado incubado en un medio rico en Magnesio presentó una producción de hormona con una media de un  $73,32\% \pm 14,77\%$  con respecto al medio basal, siendo  $23,4\%$  el mínimo y  $86,7\%$  el máximo.

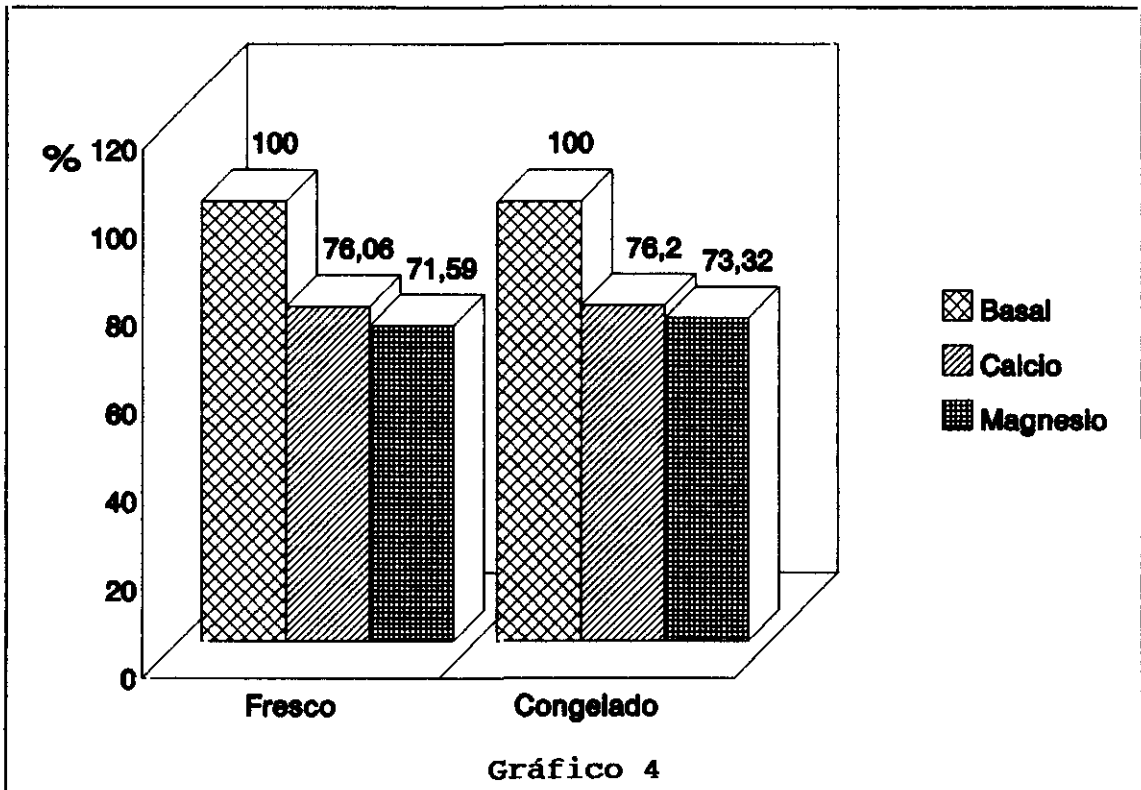
Nuevamente procedimos a la comparación de medias para muestras pareadas, encontrando que los niveles de frenación en la producción de hormona paratiroidea por parte del Magnesio tanto en el tejido fresco como en el crioconservado eran estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ). (Gráfico 3).



La comparación entre las medias de los porcentajes de frenación inducida por el medio rico en Calcio entre el tejido fresco y el criopreservado tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas.

## Resultados

Del mismo modo tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos el efecto frenador del Magnesio en el tejido fresco y en el tejido criopreservado. (Gráfico 4).



## **DISCUSSION**

DEL MEDIO DE CONGELACION

Todos los medios de congelación empleados habitualmente se componen en su mayor parte de un medio de cultivo celular, al que se añaden una pequeña cantidad de suero y un agente crioprotector.

Los medios más empleados en la literatura revisada son el RPMI 1640<sup>(21,105,159,160,180,181)</sup> (80%), al que se añade un 10% de suero, y un 10% de DMSO, y el Medio de Waymouth<sup>(13,14,89,190)</sup>, con similares proporciones de suero y DMSO. El medio de Waymouth tiene una composición cualitativa similar al RPMI 1640, pero cuantitativamente es un medio mucho más concentrado; ninguno de los artículos revisados explica la razón de elegir uno u otro medio. Descartamos el Medio de Waymouth por su elevada concentración en calcio(120 mg/l  $Cl_2Ca2H_2O$ ) y magnesio(491 mg/l  $SO_4Mg 7H_2O$ ), que podrían estar frenando de manera permanente a la célula paratiroidea, impidiendo que reaccionara a nuestros estudios funcionales; y, además, porque nos era más fácil en nuestro hospital obtener el RPMI en los laboratorios de Microbiología o Inmunología.

Añadimos 600.000 U.I. de Penicilina G sódica y 3 mg. de Gentamicina por cada 20 cc. de solución, en prevención de posibles contaminaciones. En la literatura revisada sólo encontramos la referencia de Brennan y cols.<sup>(21)</sup> a esta cuestión.



La proporción de DMSO puede variar, pero la mayoría de los autores coinciden en que la proporción idónea es el 10%<sup>(13,14,21,89,159,160,180,181,190)</sup>. Es el agente crioprotector más utilizado y parece tener un cierto efecto protector frente a las radiaciones acumuladas<sup>(75)</sup>.

En cuanto al suero, empleamos el del propio paciente, que es fácil de obtener coincidiendo con cualquier extracción para determinaciones analíticas durante el ingreso preoperatorio. Creemos que es la forma más económica de conseguirlo, a la vez que la más adecuada, ya que evitamos hipotéticos problemas de incompatibilidad o de transmisión de enfermedades.

La manipulación se lleva a cabo siempre en campana de flujo laminar, para reducir al máximo el riesgo de contaminación.

Los crioviales son los de uso habitual en cualquier laboratorio que se dedique a la crioconservación. Son de manejo cómodo, tienen un volumen adecuado para los 10 fragmentos de tejido que van a contener, se adaptan perfectamente al contenedor de Nitrógeno y aseguran un marcado indeleble.

Decidimos preparar 10 viales con 10 fragmentos de 1mm<sup>3</sup>. cada uno, para tener una cantidad de células suficiente para realizar autotrasplante diferido con tejido crioconservado si el trasplante con tejido fresco no fuera funcionando, y para poder repetir el estudio del tejido una vez descongelado si fuera necesario.

DE LA PREPARACION DEL TEJIDO

Las glándulas extirpadas, una vez se ha enviado un fragmento de cada una de ellas para su examen anatomopatológico, se colocan en un recipiente con RPMI 1640 o, en su defecto suero salino a +4°C.

A los pocos minutos de estar en el medio frío, la consistencia de las glándulas aumenta, con lo que se facilita enormemente la limpieza del tejido adiposo adyacente y la posterior fragmentación.

Elegimos para el autotrasplante inmediato y la criopreservación las glándulas que tienen mejor aspecto macroscópico: menor tamaño, color similar al de la glándula sana, ausencia de infiltrado sanguíneo, superficie lisa,...

Los fragmentos son de 1 mm<sup>3</sup> por dos razones fundamentales; la primera, para favorecer al máximo la neovascularización del injerto; y en segundo lugar para facilitar la penetración del frío y del DMSO<sup>(190)</sup>.

Reservamos los 20 mejores fragmentos para el autotrasplante inmediato; otros 30 se emplean para el estudio experimental en fresco; 50 más serán criopreservados y reservados por si los necesitáramos para un autotrasplante diferido en caso de fallo o insuficiencia del autotrasplante en fresco; 50 fragmentos más quedan criopreservados para el estudio experimental.

DEL METODO DE CONGELACION

Queríamos encontrar un sistema de conservación de las glándulas paratiroides que reuniera las características de economía, sencillez de manejo y accesibilidad a personas poco habituadas al manejo de células.

Todos los métodos revisados tenían como punto final el contenedor de Nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , pero el problema radicaba en la forma de alcanzar esta temperatura.

Casi todos los sistemas descritos en la literatura<sup>(21,180,190)</sup> se basan en la utilización de congeladores programables, descendiendo la temperatura entre 1 y  $1,5^{\circ}\text{C}$  por minuto, con costosos sensores de temperatura e importante apoyo informático.

En otro artículo, Wagner<sup>(181)</sup> describía un sistema que empleaba nieve carbónica a la que se añadía alcohol metílico en mayor o menor cantidad en función de la velocidad del descenso de la temperatura. Nos pareció muy complicado para nuestro medio de trabajo y de manejo delicado, requiriendo personal con especial dedicación, del que carecíamos.

Otros artículos hacían referencia a descensos bruscos de temperatura<sup>(13,14)</sup>, manteniendo las células 16 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y pasándolas a continuación al Nitrógeno, pero nos parecía que esto podría ser muy lesivo para las células.

Nosotros mismos probamos un método que mantenía el tejido durante 6 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; otras 17 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y a continuación (que coincidía con la mañana siguiente) se

pasaban al contenedor de Nitrógeno líquido. El resultado fué que todas las células aparecieron muertas al teñirlas con azul tripano. No obstante procedimos a la incubación en los tres medios descritos, encontrando que la hormona paratiroidea no sólo no se frenaba en su producción, sino que aparecía en cantidades superiores del 280% (medio rico en calcio) y 350% (medio rico en magnesio) con respecto al medio basal.

Así las cosas dirigimos nuestros pasos hacia el método que se emplea en los laboratorios que trabajan con líneas celulares, y que consistía en descender la temperatura en 3 fases antes de llegar al nitrógeno líquido: 1 hora a +4°C; 2 horas más a -20°C y otras 3 horas a -80°C. Si las líneas celulares sobrevivían a este proceso, era muy probable que las células paratiroideas también lo hicieran.

Este sistema era además el ideal en cuanto a economía, pues aprovechaba los congeladores ya existentes en el Hospital, y era de manejo extraordinariamente sencillo, pues sólo había que medir el tiempo y cambiar de congelador la gradilla que portaba los tubos.

#### DEL METODO DE DESCONGELACION

Todos los autores<sup>(89,105)</sup> coinciden en que la descongelación debe ser rápida mediante inmersión de los crioviales en un baño a +37°C y seguidamente lavar el tejido

con abundante cantidad de medio de cultivo puro, para arrastrar lo más rápidamente posible el DMSO, que es muy tóxico para las células a temperatura ambiente.

No hemos estudiado la influencia que pudiera ejercer el tiempo durante el que permanecen las células congeladas sobre la viabilidad, en primer lugar porque no disponíamos de la suficiente cantidad de tejido congelado y, principalmente, porque no parece tener influencia al respecto<sup>(181)</sup>.

#### DEL ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DEL TEJIDO

Para comprobar que el tejido había resistido al traumatismo que supone la congelación, debíamos comprobar que las células paratiroides conservaban su funcionalidad.

La primera intención era la de descongelar el tejido y cuantificar la hormona paratiroidea presente en el mismo. Pero esto podía inducirnos a error, ya que buena parte de esa hormona podía haber sido sintetizada antes de la congelación y posteriormente haber salido al exterior de la célula al morir ésta. (Ciertamente, ya nos había ocurrido en el caso referido anteriormente).

Debíamos asegurarnos de que las células seguían vivas, lo que se podría conseguir mediante el estudio morfológico al microscopio<sup>(30,89,180)</sup>. La tinción de las células con azul tripano para proceder a su recuento, y su posterior estudio al microscopio óptico mostró una integridad celular superior al 95% en todos los casos. Pero podría ocurrir que esas

células que aparentemente habían sobrevivido a la congelación tuvieran anulada su capacidad funcional, no sólo de secretar hormona paratiroidea, sino de hacerlo en mayor o menor cuantía en función del estímulo o supresión que recibieran. Esta fue la razón por la que descartamos los estudios morfológicos como única prueba fiable de la supervivencia celular.

La manera de comprobar que conservaban su capacidad funcional era observar su comportamiento frente a diferentes concentraciones de calcio y magnesio, y comparar ese comportamiento con el del tejido fresco sometido a idénticos estímulos.

Para comprobar la funcionalidad celular procedimos a preparar suspensiones celulares según el método de Wagner<sup>(180)</sup>. En primer lugar se coloca el tejido a estudiar en un medio de digestión compuesto por medio HMEM (con una concentración de Ca y Mg conocidas de 1,28 y 0,81 mMol/l. respectivamente), y tripsina y colagenasa, que son las enzimas encargadas de digerir el tejido conectivo que mantiene unidas las células.

Empleamos HMEM en lugar del medio RPMI 1640 porque es el que emplea Wagner<sup>(180)</sup>, cuya experiencia queremos reproducir.

Tras separar los detritus y restos de tejido conectivo mediante filtrado con una malla y posterior centrifugación, teñimos las células con azul tripano con una doble intención: en primer lugar, para constatar la integridad de las mismas y, en segundo lugar, para proceder a su recuento.

A continuación se procede a la incubación de las células en medio basal, en medio rico en calcio y en medio rico en magnesio, respectivamente, durante 2 horas. Esto se realiza a temperatura de 37°C y en agitación continua. Con esto no se pretende obtener un cultivo celular, sino conseguir, de manera transitoria, un medio que reúna las condiciones óptimas para el funcionalismo celular. Es muy importante, para poder comparar los resultados entre sí, calcular la dilución necesaria para que la concentración celular se ajuste a  $10^5$  células viables por mililitro en cada uno de los medios.

Empleamos calcio y magnesio como estímulos para comprobar la viabilidad celular, por su demostrado efecto fisiológico frenador en la secreción hormonal a nivel de las glándulas paratiroides<sup>(27,70,78)</sup>. Son dos elementos de fácil dosificación y bajo coste; se utilizan en forma de  $\text{Cl}_2\text{Ca}2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{SO}_4\text{Mg } 7\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente. Únicamente debemos tener la precaución, cuando se trata de añadir calcio, de obtener el producto de un frasco que haya permanecido bien cerrado y que no sea muy antiguo, pues es una sustancia con elevado poder higroscópico, por lo que podríamos cometer el error de utilizar menores concentraciones de calcio que las indicadas.

#### DE LA DETERMINACION DE LA HORMONA PARATIROIDEA

Decidimos emplear un método de cuantificación de hormona paratiroidea que reconociera únicamente la molécula intacta.

Dado que la hormona paratiroidea intacta tiene una vida media muy corta y se fragmenta rápidamente, si el método que empleáramos para cuantificarla, fuera capaz de reconocer alguno de los fragmentos de la misma, podríamos incurrir en errores en cuanto a valorar la capacidad funcional del tejido crioconservado, puesto que estaríamos cuantificando cantidades de hormona sintetizada con anterioridad a la congelación.



DE LOS PACIENTES

Incluimos en el estudio a dos pacientes afectados de hiperparatiroidismo primario por adenoma único.

Aunque hay autores que han encontrado diferencias en el comportamiento frente al calcio y el magnesio entre el tejido adenomatoso y el hiperplásico<sup>(21,27)</sup>, otros no la encuentran<sup>(28,160)</sup>, por lo que los hemos incluido en el estudio. Además, al analizar los resultados, observamos que en términos absolutos se comportaban de igual manera que los hiperplásicos, y el análisis estadístico de la muestra una vez excluidos estos dos pacientes mostró resultados similares. No se encuentran diferencias de comportamiento entre el tejido hiperplásico del hiperparatiroidismo secundario y el tejido procedente de pacientes portadores de síndrome MEN I<sup>(27)</sup>, por lo que el paciente número 15, que padecía un síndrome MEN I también fue incluido en el estudio tras realizarle el mismo tratamiento que a aquellos que padecían hiperparatiroidismo secundario.

DE LOS RESULTADOS

La tinción con azul tripano muestra una proporción de células íntegras superior al 95% en los 15 casos estudiados.

La producción de hormona paratiroidea, en valores absolutos, muestra una gran variabilidad, desde 22,4 pg/ml. hasta más de 5700 pg/ml.

Estas diferencias se observan en la literatura consultada<sup>(180)</sup> y hacen preferible la utilización de porcentajes respecto a un valor referencial para realizar el estudio de la viabilidad.

Para comprobar que las células conservan su capacidad funcional consideramos que la cifra de producción de hormona en el medio basal es el 100% y calculamos el porcentaje en la producción de hormona que corresponde a los medios ricos en calcio y magnesio.

Las células de los tres medios proceden del mismo tejido, tomado del paciente al mismo tiempo y sometidas al mismo proceso de manipulación; además hemos calculado la dilución necesaria para que estén a una concentración idéntica en los tres medios ( $10^5$  cel./ml.). De esta manera hemos reducido al máximo las posibilidades de error que se produciría al trabajar con muestras diferentes.

El test de normalidad nos asegura que trabajamos con una muestra homogénea y las pruebas estadísticas tienen un nivel de significación adecuado.

El tejido fresco experimenta un descenso en la producción de hormona al aumentar la concentración de calcio en el medio en cuantía suficiente para que no se pueda considerar que es un hecho debido al azar.

El tejido fresco también experimenta un descenso en la producción de hormona al aumentar la concentración de magnesio en el medio en cuantía suficiente para que no se pueda considerar que es un hecho debido al azar.

Por lo tanto debemos pensar que las respectivas elevaciones en la concentración del calcio y el magnesio en los medios de cultivo ejercen un efecto frenador en la producción de hormona paratiroidea, que es su respuesta fisiológica.

El tejido crioconservado muestra un descenso en la producción de hormona al aumentar la concentración de calcio muy similar a la del tejido fresco, y tampoco puede explicarse por el azar.

El tejido crioconservado muestra un descenso en la producción de hormona al aumentar la concentración de magnesio muy similar a la del tejido fresco, y tampoco puede explicarse por el azar.

Los resultados obtenidos nos inducen a pensar que el tejido crioconservado se comporta de manera similar al tejido fresco, y demuestran que la crioconservación no ha ejercido un efecto perjudicial en cuanto a la funcionalidad del tejido paratiroideo.

Hemos conseguido desarrollar un método de crioconservación de tejido paratiroideo utilizando la tecnología habitual de nuestro hospital, pues sólo hemos necesitado adquirir el contenedor de nitrógeno líquido; la técnica es sencilla y de manejo accesible a personas poco experimentadas en el manejo de células.

Hemos aplicado la preparación de suspensiones celulares, y su respuesta a los diferentes medios, como sistema de control de la viabilidad funcional del tejido paratiroideo "in vitro".

Hemos comprobado que el método propuesto de crioconservación de tejido paratiroideo, no afecta a la viabilidad celular, y las células así conservadas mantienen un capacidad funcional similar a la del tejido fresco.

El método descrito en este trabajo está en la actualidad incorporado a la Clínica, apoyando al Programa de Cirugía Paratiroidea del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo A del Hospital 12 de Octubre. La comprobación final de su funcionamiento, que sería el autotrasplante diferido, no se ha llevado a cabo porque los autotrasplantes en fresco, realizados a los 15 pacientes, están funcionando en la actualidad.

**RESUMEN**

El tratamiento quirúrgico de la enfermedad paratiroidea hace necesaria, en un buen número de casos, la crioconservación del tejido paratiroideo, para su autotrasplante diferido, en caso de hipoparatiroidismo postoperatorio.

La crioconservación a  $-196^{\circ}\text{C}$  constituye el método ideal para la conservación del tejido, pero, a su vez, supone un procedimiento que puede atentar contra la supervivencia y capacidad funcional del tejido así tratado.

Los métodos de crioconservación empleados hasta la fecha, empleando congeladores programables, suponen un importante gasto en infraestructura que pocos hospitales pueden afrontar.

Planteamos un método de crioconservación, con un descenso secuencial de la temperatura, que aprovecha los congeladores convencionales a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , ya existentes en nuestro hospital para otros fines.

Describimos la técnica de preparación del tejido a conservar, así como del Medio de congelación y los crioviales que los contendrán.

Las fases de la congelación suponen mantener el tejido durante 1 h. a  $+4^{\circ}\text{C}$ ; 2 h. a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; 3 h. más a  $-80^{\circ}\text{C}$  y finalmente, su paso a la fase líquida del Nitrógeno líquido.

Para comprobar la viabilidad del tejido así conservado, en primer lugar, lo teñimos con azul tripano y recontamos el

número de células aparentemente viables, que en ningún caso, ha sido inferior al 95%.

Seguidamente, preparamos suspensiones celulares, tanto con el tejido fresco, como con el crioconservado, y las sometemos a un estudio funcional, que consiste en variar las proporciones de calcio y de magnesio del medio de suspensión celular, y verificar si las células responden a estos estímulos frenando la secreción de hormona paratiroidea.

Los medios de suspensión celular son tres, idénticos para el tejido fresco y el crioconservado:

-Medio basal, con unas concentraciones basales de calcio (1,26 mMol/l) y magnesio (0,81 mMol/l).

-Medio rico en calcio, al que se añade  $Cl_2Ca$  hasta alcanzar una concentración de 3,76 mMol/l de calcio.

-Medio rico en magnesio, al que se añade  $SO_4Mg$  hasta alcanzar un concentración de 3,31 mMol/l de magnesio.

Al cabo de 2 h., se cuantifica la hormona paratioridea de cada medio y se comparan los resultados.

El tejido fresco, en el medio rico en calcio produce únicamente el  $76,06\% \pm 7,40\%$  de hormona paratioridea que en el medio basal.

El tejido fresco, en el medio rico en magnesio también experimenta una frenación en la producción de hormona, quedando en el  $71,59\% \pm 11,47\%$ .

El tejido congelado, en presencia de mayor concentración de calcio, frena la producción de hormona, quedando en el  $76,20\% \pm 15,17\%$  de la producida en el medio basal.

El tejido congelado, en presencia de una mayor concentración de magnesio, también frena la producción de hormona, quedando en el  $73,32\% \pm 14,77\%$  de la basal.

En todos los casos, el efecto frenador en la producción de hormona paratiroidea corresponde al efecto fisiológico frenador de estos iones sobre la célula paratiroidea. El análisis estadístico de los resultados muestra significación estadística en todos los casos ( $p < 0,001$ ), y las frenaciones experimentadas por el tejido congelado y el fresco son similares, lo que indica que las células han conservado su capacidad funcional tras la congelación.



## **CONCLUSIONES**

CONCLUSIONES

1.- La preparación de suspensiones celulares de tejido paratiroideo constituye un medio adecuado para comprobar la funcionalidad del tejido paratiroideo, tanto en fresco como tras la crioconservación.

2.- La elevación en la concentración del calcio en el medio de cultivo de las suspensiones celulares de tejido paratiroideo ejerce un efecto frenador sobre la producción de hormona paratiroidea.

3.- La elevación en la concentración del magnesio en el medio de cultivo de las suspensiones celulares del tejido paratiroideo ejerce un efecto frenador sobre la producción de hormona paratiroidea, y lo hace en una proporción equivalente a la del calcio.

4.- El tiempo durante el cual permanece el tejido crioconservado, no influye en la supervivencia del mismo.

5.- El método propuesto para la congelación y crioconservación del tejido paratiroideo humano permite mantener la integridad celular del mismo no sólo desde el punto de vista morfológico sino también funcional.

6.- El método propuesto reúne las condiciones de fiabilidad, economía y sencillez de manejo necesarias para su aplicación por cualquier unidad dedicada al tratamiento quirúrgico de la enfermedad paratiroidea.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1.- ADAMS N.D.; GRAY R.W.; LEMANN J.Jr. The effect of oral CaCO<sub>3</sub> loading and dietary calcium deprivation on plasma 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocr Metab* 1978. 48:1008-1016
- 2.- AKERSTROM G.; MALMAEUS J.; BERGSTROM R. Surgical anatomy of human parathyroid glands. *Surgery* 1984. 95:14-21
- 3.- AKERSTROM G.; RASTAD J.; LJUNGHALL S.; JOHANSSON H. Clinical and experimental advances in sporadic primary hyperparathyroidism. *Acta Chir Scand* 1990. 156:23-28.
- 4.- ALBERTSON D.A.; POOLE G.V. Jr; MYERS R.T. Subtotal parathyroidectomy versus total parathyroidectomy with autotransplantation for secondary hyperparathyroidism. *Am. Surg.* 1985. 51(1): 16-20
- 5.- ALBERTUCCI M.; ZIELINSKI C.M.; ROTHBERG M.; STERPETTI A.; KLINGMAN R.; RONK J.F. Surgical treatment of the parathyroid gland in patients with end-stage renal disease. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1988. 167(1): 49-52
- 6.- ALEXANDER P.T.; SCHUMAN E.S.; VETTO R.M.; GROSS G.F.; HAYES J.F.; STANDAGE B.A. Repeat parathyroid operation associated with renal disease. *Am.J.Surg.* 1988. 155(5):686-9

- 7.- ALVERYD A. Parathyroid glands in thyroid surgery. Acta. Chir. Scand. 1968. 389:1-120
- 8.- ANDERSEN T.; McNAIR P.; HYLDSTRUP L.; FOGH-ANDERSEN N.; NIELSEN T.T.; ASTRUP A.; TRANSBOL I. Secondary hyperparathyroidism of morbid obesity regresses during weight reduction. Metabolism 1988. 37:425-428.
- 9.- ASHWOOD-SMITH M.J., MORRIS G.J., FOWLER R., APPLETON T., ASHORN R. 1988. Hum. Reprod. 3:795-802
- 10.- ASKANAZY, M.I. Uber ostitis deformans ohne ostoides Gewebe. Arb. Geb. path. anat. Ins. Tubingen. 1903. 4:398-422.
- 11.- AUFFERMANN W.; GOODING G.A.W.; OKERLUND M.D. Diagnosis of recurrent hyperparathyroidism: Comparison of MR imaging and other imaging techniques. A.J.R. 1988. 150:1027-1033
- 12.- BARNES A.D. The changing face of parathyroid surgery. Ann. R. Coll. Surg. Engl. 1984. 66(2): 77-80
- 13.- BASILE C.; LACOUR B.; DRUEKE T.; CHANARD J. Successful parathyroid gland autotransplantation in the rat using a simplified cryopreservation technique. Surgery 1980. 88:677-681.

14.- BASILE C; DRUEKE T; LACOUR B; ULMANN A; BOURDEAU A; UTZINGER B; DUBOST C. Total parathyroidectomy and delayed parathyroid autotransplantation using a simplified cryopreservation technique: human and animal studies. Am. J. Kidney. Dis. 1984. 3(5): 366-70

15.- BILLINGS PJ; MILROY E. Autotransplantation of human parathyroid glands. Ann.R.Coll.Surg.Engl. 1986. 68(1): 11-3

16.- BLACK B.M. Hyperparathyroidism. Charles C. Thomas Publisher. Springfield. Illinois. 1953.

17.- BLACKER J.E.; HOOVER L.A.; ZUCKERBRAUN L; BRICKMAN A.S. A systematic approach to parathyroid surgery. Clin. Otolaryngol. 1986. 11(6): 435-41

18.- BOYD J.D. Development of the thyroid and parathyroid glands and the thymus. Ann. R. Coll. Surg. 1950. 7:455

19.- BRADLEY E.L.; Mc. GARITY W.C. Surgical evaluation of parathyroid arteriography. Am. J. Surg. 1973. 126:67

20.- BRENNAN, MF; DOPPMAN, JL; MARX, SJ; SPIEGEL, AM; BROWN, EM; AURBACH, GD. Reoperative parathyroid surgery for persistent hyperparathyroidism. Surgery. 1978. 83(6): 669-76

*Bibliografia*

21.- BRENNAN M.F.; BROWN E.M.; SEARS H.F.; AURBACH G.D. Human parathyroid cryopreservation: in vitro testing of function by parathyroid hormone release. Ann.Surg. 1978. 187(1): 87-90

22.- BRENNAN M.F.; BROWN E.M.; SPIEGEL A.M.; MARX S.J.; DOPPMAN J.L.; JONES D.C.; AURBACH G.D. Autotransplantation of cryopreserved parathyroid tissue in man. Ann Surg. 1979. 189(2): 139-42

23.- BRENNAN MF; MARX SJ; DOPPMAN J; COSTA J; SAXE A; SPIEGEL A; KRUDY A; AURBACH G. Results of reoperation for persistent and recurrent hyperparathyroidism. Ann.Surg. 1984. 194: 671-676

24.- BRENNAN M.F.,NORTON J.A. Reoperation for persistent and recurrent hyperparathyroidism. ANN. SURG. 1985. 201:40-44

25.- BRICKER N.S.; SLATOPOLSKY E.; REISS E.; AVIOLI L.V. Calcium, phosphorus and bone in renal disease and transplantation. Archs Intern Med 1969. 123:543:553

26.- BROWN E.M.; HURWITZ S.; AURBACH G.D. Preparation of viable isolated bovine parathyroid cells. Endocrinology 1976. 99:1582-1588.

27.- BROWN E.M.; BRENNAN M.F.; HURWITZ S.; WINDECK R.; MARX S.J.; SPIEGEL A.M. Dispersed cells prepared from human



parathyroid glands: distinct calcium sensitivity of adenomas vs primary hyperplasia. *J Clin Endocr Metab* 1978. 46:267-278

28.- BROWN E.M.; GARDNER D.G.; BRENNAN M.F.; MARX S.J.; SPIEGEL A.M.; ATTIE M.F. Calcium-regulated parathyroid hormone release in primary hyperparathyroidism: studies in vitro with dispersed parathyroid cells. *Am J Med* 1979. 66:923-931

29.- BRUNT L.M.; WELLS S.A.Jr. Surgical treatment of secondary hyperparathyroidism. *Ann Chir Gynaecol.* 1983. 72(3): 139-45

30.- BURNETT H.F., THOMPSON B.W., BARBOUR G.L. Parathyroid autotransplantation. *ARCH.SURG.* 1977. 112:373-379

31.- CALANDRA D; PALOYAN E; OSLAPAS R; HOFMANN C; ERNST K; SHAH K.H.; LAWRENCE A.M. Successful autotransplantation of parathyroid adenomas in seven patients. *Am Surg.* 1983. 49(6): 324-8

32.- CHAPUIS Y. Pour l'imagerie pré-opératoire dans l'hyperparathyroïdie primaire avant une première cervicotomie. *Ann Chir* 1990. 44:368-370.

33.- CHATTERON B.E.; WYCHERLEY A.G.; MUECKE T.S. Thallium-201-technetium-99m subtraction scanning: Its value

*Bibliografía*

in 50 cases of hyperparathyroidism submitted surgery.  
Aust.N.Z.J.Surg. 1987. 57:289-294

34.- CHEUNG P.S.; BORGSTROM A.; THOMPSON N.W. Strategy in reoperative surgery for hyperparathyroidism. Arch. Surg. 1989. 124:676-80

35.- CLARK O.H. Thyroid and parathyroid in dunphy surgical diagnosis and treatment.Lange Medical Publication. Los Altos. California:254, 1975.

36.- CLARK O.H. Secondary and tertiary hiperparathyroidism. ENDOCRINE SURGERY. ED.J.S. NAJARIAN and J.P. DELANEY.1981. pag. 239-247.

37.- CLARK O.H.; OKERLUND M.D.; DUH Q.Y. Localization studies in patients with persistent or recurrent hyperparathyroidism. Surgery 1985. 98:1083-1094

38.- CLARK O.H.; STARK D.A.; DUH Q.Y. Value of high resolution real-time ultrasonography in secondary hyperparathyroidism. Am.J.Surg. 1985. 150:9-17

39.- COLLIP,J.B. Extraction of parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and regulates level of blood calcium. J. Biol. Chem. 1925. 63:395-438

*Bibliografia*

40.- COOPER L; WERTHEIMER J; LEVEY R; BROWN E; LEBOFF M; WILKINSON R; ANAST C.S. Severe primary hyperparathyroidism in a neonate with two hypercalcemic parents: management with parathyroidectomy and heterotopic autotransplantation. *Pediatrics*. 1986. 78(2): 263-8

41.- COPE O. Surgery of hyperparathyroidism: the occurrence of parathyroids in the anterior mediastinum and the division of the operation into two stages. *Ann Surg* 1941. 114:706-731

42.- COPE O; CULVER P.J; MIXTER C.J; NARDI G.L. Pancreatitis, diagnostic clue to hyperparathyroidism. *Ann. Surg.* 1957. 145:857-863.

43.- COPE O, KEYNES V.M, ROTH S.J, CASTLEMAN B. Primary chief-cell hyperplasia of the parathyroid glands: a new entity in the surgery of hyperparathyroidism. *ANN.SURG.* 1958. 148:375-388

44.- COPE O. Hyperparathyroidism: diagnosis and management. *Am J Surg* 1960. 99:394-403

45.- COPE O. The story of hyperparathyroidism at the Massachusetts General Hospital. *N.ENGL.J.MED.* 1966. 274:1174

46.- DELMONICO F.L.; WANG C.A.; RUBIN N.T.; FANG L.S.; HERRIN J.T.; COSIMI A.B. Parathyroid surgery in patients with renal failure. *Ann Surg.* 1984. 200(5): 644-7

47.- DIAMOND T.; BOTHA J.; WING J.; MEYERS A.; KALK J. Parathyroid hypertension. A reversible disorder. *Arch. Intern. Med.* 1986. 146:1709-2

48.- DIETHELM A.G.; ADAMS P.L.; MURAD T.M.; DANIEL W.W.; WHELCHER J.D.; RUTSKY E.A.; ROSTAND S.G. Treatment of secondary hyperparathyroidism in patients with chronic renal failure by total parathyroidectomy and parathyroid autograft. *ANN. SURG.* 1981. 193:777-790

49.- DOPPMAN J.L.; MARX S.L.; BRENNAN M.F. The blood supply of mediastinal parathyroid adenomas. *Ann Surg* 1972. 185:488-490

50.- DUBOST C.; KRATCH M.; ASSENS P.; SARFATI E.; ZINGRAFF J.; DRUEKE T. Reoperation for secondary hyperparathyroidism in hemodialysis patients. *World J. Surg.* 1986. 10:654-660.

51.- DUBOST C; BOUTELOUP P.Y. Explorations médiastinales par sternotomie dans la chirurgie de l'hyperparathyroïdie. 36 cas. *J.Chir.Paris.* 1988. 125(11):631-7

52.- DUBOST C.; ZINGRAFF J.; DRUEKE T.B. Total parathyroidectomy with autotransplantation in haemodialysis patients: should it be abandoned? *Nephrol.Dial.Transplant.* 1988. 3(3): 356

53.- DWARAKANATHAM A.A.; SACLARIDES T.J.; WITT T.R. The role of ultrasonography in the evaluation of primary hyperparathyroidism. *Surg.Gynecol.Obstet.* 1986. 163:504-8

54.- EDIS A.J.; VAN HEERDEN J.A.; SCHOLZ D.A. Results of subtotal parathyroidectomy for primary chief cell hyperplasia. *Surgery.* 1979. 86(3): 462-9

55.- EDIS A.J.; BEART R.W.Jr. Parathyroid autotransplantation: an innovative approach. *Hosp Pract.* 1979. 14(1): 78-84

56.- EDIS A.J.; PURNELL D.J.; VAN HEERDEN J.A. The undescended "parathyms": an occasional cause of failed neck exploration for hyperparathyroidism. *Ann Surg* 1979. 190:64-68

57.- EISENBERG H.; PALLOTA J.A.; SHERWOOD L.M. Selective arteriography, venography and venous hormone assay in diagnosis and localization of parathyroid lesions. *Am.Med.J.* 1974. 56:810-820

58.- EISENBERG H.; PALLOTA J.; SACKS B.;BRICKMAN A.S.  
Parathyroid localization, three-dimensional modeling, and  
percutaneous ablation techniques. Endocrinology and  
metabolism clinics of North America 1989. 18:659-699.

59.- ERDHEIM,J. Tetania parathyreopiva. Mitt. Grenzgeb. Med.  
Chir. 1906. 16:632-744

60.- ERDHEIM,J. Uber Epithelkorperbefunde bei Osteomalacie.  
Sitzungsb. Akad. Wiss. Math. Naturw. 1907. 116:311-370.

61.- FAHY G.M., MACFARLANE D.R., ANGELL C.A., MERYMAN H.T.  
Vitrification as an approach to cryopreservation. 1984.  
Cryobiology. 21:407-426

62.- FELSENFELD A.J.; GUTMAN R.A.; LLACH F; HARRELSON J.M.;  
WELLS S.A. Postparathyroidectomy hypocalcemia as an accurate  
indicator of preparathyroidectomy bone histology in the  
uremic patient. Miner Electrolyte Metab. 1984. 10(3): 166-72

63.- FREI U; FASSBINDER W; KLEMPA I; SCHOEPPE W; KOCH K.M.  
Total parathyroidectomy with autograft of parathyroid tissue  
in treatment of secondary hyperparathyroidism. Proc Eur Dial  
Transplant Assoc. 1978. 15: 540-6

*Bibliografía*

64.- FRIEDMAN M.; TORIUMI D.M.; GRYBAUSKAS V. Surgical treatment of hyperparathyroidism. Otolaryngol.Clin.North.Am. 1986. 19(4): 711-22

65.- GILMOUR J.R. The gross anatomy of the parathyroid glands. J Path Bact 1938. 46:133

66.- GIULIANI L; BELGRANO E; CARMIGNANI C; PUPPO P; REPETTO U; PITTALUGA P. Acute hyperparathyroidism successfully treated by total parathyroidectomy and parathyroid autotransplantation. Int Urol Nephrol. 1983; 15(2): 111-6

67.- GLEY,E. Sur les fonctions du corps thyroide. Seanc. Soc. Biol. 1891. 43:841-843.

68.- GODLEWSKI G.; ARTUS J.C.; GRANOLLERAS C.; BRANGER B.; OULES R.; DESCHODT G.; RAMPEREZ P.; AL SABADANI B. The anatomical value of technetium-thallium subtraction scanning in detection and location of parathyroid adenomas. Anat.Clin. 1984. 6(4): 281-5

69.- GOODING G.A.W.; OKERLUND M.D.; STARK D.D. Parathyroid imaging: Comparison of double-tracer (Tl-201, Tc-99m) scintigraphy and high resolution US. Radiology 1986. 161:57-64

*Bibliografía*

70.- GOUGH I.R.; BALDERSON G.A.; MARTIN LLOYD H.; GALLIGAN J.; WILLGOSS D.; FRYAR B.G. The effect of intravenous magnesium sulphate on parathyroid function in primary hyperparathyroidism. *World J. Surg.* 1988. 12:463-469.

71.- GOUILLAT C; BOUCHET A; SOUSTELLE J. Le risque parathyroïdien dans la chirurgie du corps thyroïde. *J Chir Paris.* 1979. 116(8-9): 505-12

72.- GRAIF M.; ITZCHAK Y.; STRAUSS S. Parathyroid sonography: Diagnostic accuracy related to shape, location and texture of the gland. *Br.J.Radiol.* 1987. 60:439-443

73.- GRANBERG P.O.; JOHANSSON G.; LINDVALL N. Reoperation for primary hyperparathyroidism. *Am. J. Surg.* 1982. 143:296-300

74.- GRANT C.S.; VAN HEERDEN J.A.; CHARBONEAU J.W.; JAMES E.M.; READING C.C. Clinical management of persistent and/or recurrent primary hyperparathyroidism. *WORLD J. SURG.* 1986. 10:555-65.

75.- GROUT B.W.W., MORRIS G.J., McLELLAN M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. 1990. *TIBTECH.* 8:293-297.

76.- GUNTHER R.; HESCH H.; REINWEIN D. Percutaneous ablation of parathyroid gland tumor by alcohol injection and contrast media infusion. *ROFO* 1984. 140:27-30



*Bibliografía*

77.- HAASE G.M.; LUCE J.M.; LOCK J.P.; HAMMOND W.S.; PENN I.  
Hyperparathyroidism following parathyroid  
autotransplantation. *Surgery*. 1979. 86(5): 694-7

78.- HABENER J.F.; POTTS J.T.Jr. Relative effectiveness of  
magnesium and calcium on the secretion and biosynthesis of  
parathyroid hormone in vitro. *Endocrinology* 1976. 98:197-202

79.- HABENER J.F. Responsiveness of neoplastic and  
hyperplastic parathyroid tissue to calcium in vitro. *J Clin  
Invest* 1978. 62:436-450

80.- HALSTED, W.S. Hypoparathyreosis, status parathyreoprivus,  
and transplantation of the thyroid glands. *Am.j.Med.Sci.*  
1907. 134:1-12

81.- HALSTED, W.S. Surgical tetany and the parathyroids.  
*Am.Med.Assoc.* 1907. 49:1243-1244

82.- HALSTED, W.S. Preservation of the parathyroids during  
thyroidectomy. *Trans.Am.Surg.Ass.Phil.* 1907. 25:60

83.- HALSTED, W.S; EVANS, R.M. The parathyroid glandules: their  
blood supply and preservation in operation upon the thyroid  
gland. *Ann.Surg.* 1907. 46:489-506

*Bibliografia*

84.- HALSTED, W.S. Auto and iso transplantation in dogs of the parathyroid glands. J.Exp.Med. 1908. 11:175-199

85.- HAMILTON R.; GREENBERG B.M.; GEFTER W. Successful localization of parathyroid adenomas by magnetic resonance imaging. Am.J.Surg. 1988. 155:370-373

86.- HANLEY D.A.; SHERWOOD L.M. Secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure. Pathophysiology and treatment. Med Clin North Am. 1978 . 62(6): 1319-39

87.- HARRIS J. Radionuclide localisation of parathyroid abnormality. RADIOGRAPHY 1986. 52:151

88.- HAUSSLER M.R.; BAYLINK D.J.; HUGUES M.R.; BRUMBAUGH P.F.; WERGEDAL J.E.; SHEN F.H. The assay of 1,25-dihydroxy-vitamin D3: physiologic and pathologic modulation of circulating hormone levels. Clin Endocrinol 1976. 5:151

89.- HENRY J.F., FRANCE G., AUDIFFRET J., HANS D., BORSARELLI J. Notre experience de l'autotransplantation et de la cryopreservation dans la chirurgie thyroparathyroïdienne. J.CHIR. 1984. 121:263-267

90.- HENRY J.F.; DENIZOT A.; AUDIFFRET J.; FRANCE G. Traitement chirurgical de l'hyperparathyroïdie secondaire

chez Insuffisant renal chronique hemodialyse. Resultats et choix dne technique. J.Chir.Paris. 1988. 125(6-7): 395-400

91.- HUNT P.S. Reappraisal of the surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. Br J Surg 1968. 55:63-66

92.- JANSSON S.; TISELL L.E. Autotransplantation of diseased parathyroid glands into subcutaneous abdominal adipose tissue. Surgery. 1987; 101(5): 549-56

93.- JOBORN CH.; HETTA J.; JOHANSSON H.; RASTAD J.; AGREN H.; AKERSTROM G.; LJUNGHALL S. Psychiatric morbidity in primary hyperparathyroidism. World J. Surg. 1988. 12:476-481.

94.- KARSTRUP S.; HOLM H.H.; TORP-PEDERSEN S. Ultrasonically guided percutaneous inactivation of parathyroid tumors. Br.J.Radiol. 1987. 60:667-670

95.- KEATING,F.R.Jr.; COOK,E.N. Recognition of primary hyperparathyroidism: analysis of 24 cases. J. Am. med. Ass. 1945. 129:994-1002.

96.- KEATING R.Jr. Diagnosis of primary hyperparathyroidism. JAMA 1961. 178:547-55

*Bibliografia*

97.- KNEELAND J.B.; KRUBSACK A.J.; LAWSON T.L. Enlarged parathyroid glands: High-resolution local coil MR imaging. Radiology 1987. 162:143-146

98.- KRUBSACK A.J.; WILSON S.D.; LAWSON T.L.; COLLIER B.D.; HELLMAN R.S.; ISITMAN A.T. Prospective comparison of radionuclide , computed tomographic and sonographic localization of parathyroid tumors. WORLD J. SURG. 1986. 10:579-85

99.- KURTAY M.; CRILE G. Jr. Aberrant parathyroid in relationship to the thymus. Am J Surg 1969. 117:705-708

100.-LAFFERTY F. Primary hyperparathyroidism. Changing clinical spectrum, prevalence of hypertension and discriminant analysis of laboratory tests. Arch. Intern. Med. 1981. 141:1761-6

101.-LAHEY F.H. The transplantation of parathyroids in partial thyroidectomy. SURG.GYNECOL.OBSTET. 1926. 62:508

102.-LANDO M.J.; HOOVER L.A.; ZUCKERBRAUN L.; GOODMAN D. Autotransplantation of parathyroid tissue into sternocleidomastoid muscle. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1988. 114(5): 557-60

*Bibliografía*

103.-LANGMAN J. Embriología médica. Desarrollo humano normal y anormal. 1969. Ed. Interamericana S.A. Segunda edición.

104.-LEAPMAN S.B; FILO R.S.; THOMALLA J.V.; KING D. Secondary hyperparathyroidism. The role of surgery. Am.Surg. 1989. 55(6):359-65

105.-LEIGHT G.S.; PARKER G.A.; SEARS H.F.; MARX S.J.; TERRILL R.E. Experimental cryopreservation and autotransplantation of parathyroid glands: technique and demonstration of function. Ann.Surg. 1978. 188(1): 16-21

106.-LEVIN K.E.; GOODING G.A.W.; OKERLUND M. Localizing studies in patients with persistent or recurrent hyperparathyroidism. Surgery, 1987.

107.-LEVITT M.D.; VIVIAN A.B.; SSKER B.M.. Parathyroidectomy in chronic renal failure. Aust.N.Z.J.Surg. 1986. 56(3):233-239

108.-LUNDSTROM B; ANDERBERG B; GILLQVIST J. Clinical experience of parathyroid autotransplantation. Acta Chir Scand. 1978; 144(7-8): 451-3

109.-LUTZ P; KANE O; PFERSDORFF A; SEILLER F; SAUVAGE P; LEVY J.M. Neonatal primary hyperparathyroidism: total

parathyroidectomy with autotransplantation of cryopreserved parathyroid tissue. Acta. Paediatr. Scand. 1986. 75(1):179-82

110.-MacCALLUM W.C.,VOEGTLIN C. On the relation of tetany to the parathyroid glands and to calcium metabolism. J.Exp.Med. 1909. 11:118

111.-MacCALLUM,W.G. On the pathogenesis of tetany.Medicine. 1924. 3:137-163

112.-MACINTYRE I. Calcitonin: an introductory review.Calcitonin Proceedings of the Symposium on Thyrocalcitonin and the C cells. Heinemann. London. 1968.

113.-MALLETTE L.; BILEZIKIAN J.; HEATH D.; AURBACH G. Primary hyperparathyroidism: clinical and biochemical features. Medicine 1974. 53:127-46

114.-MALLETTE L.E.,EISENBERG K., WILSON H., NOON G.P. Generalized primary parathyroid hyperplasia: studies of the evolution of autogenous parathyroid graft function. SURGERY. 1983. 93:254-259

115.-MALLETTE L.E.,EISENBERG K.L.,SCHWAITZBERG S.D.,SUKI W.N.,NOON G.P. Total parathyroidectomy and autogenous parathyroid graft. Placement for treatment of

hyperparathyroidism due to chronic renal failure. AM.J.SURG.  
1983. 146:727-733

116.-MALLETTE L.E.; EISENBERG K.L.; SCHWAITZBERG S.D.; NOON  
G.P. Factors that influence the assessment of parathyroid  
graft function. ANN. SURG. 1984. 199:192-196.

117.-MALMAEUS J; AKERSTROM G; JOHANSSON H; LJUNGHALL S;  
NILSSON P; SELKING O. Parathyroid surgery in chronic renal  
insufficiency. Subtotal parathyroidectomy versus total  
parathyroidectomy with autotransplantation to the forearm.  
Acta Chir Scand. 1982; 148(3): 229-38

118.-MALMAEUS J. Secondary hyperparathyroidism in chronic  
renal failure. Scand J Urol Nephrol Suppl. 1983; 70: 1-63

119.-MALMAEUS J; AKERSTROM G; JOHANSSON H; LJUNGHALL S;  
NILSSON P; WIDE L. Parathyroid autotransplantation. An  
investigation of parathyroid autograft function. Acta Chir  
Scand. 1983; 149(6): 545-54

120.-MALMAEUS J.; GRIMELIUS L.; JOHANSSON H.; AKERSTROM G.;  
LJUNGHALL S. Parathyroid pathology in  
hyperparathyroidism secondary to chronic renal failure.  
Scand.J.Urol.Nephrol. 1984. 18(2): 157-66

121.-MALMAEUS J.; BENSON L.; JOHANSSON H.; LJUNGHALL S.; RASTAD J.; AKERSTROM G.; OBERG K. Parathyroid surgery in the multiple endocrine neoplasia type I syndrome : choice of surgical procedure. WORLD J. SURG. 1986. 10:668-72

122.-MANDL,F. Therapeutischer Versuch bei Ostitis fibrosa generalisata mittels Extirpation eines Epithelkorperchentumors. Wien. klin. Wschr. 1925. 50:1343-1344

123.-MASSRY S.G. Action of parathyroid hormone in uraemia: a mechanism for the hypocalcemia and secondary hyperparathyroidism of chronic renal failure. Clin Endocrinol 1976. 5:317-325

124.-MAX M.H.; FLINT L.M.; RICHARDSON J.D.; FERRIS F.Z.; NAGAR D. Total parathyroidectomy and parathyroid autotransplantation in patients with chronic renal failure. Surg Gynecol Obstet. 1981. 153(2): 177-80

125.-McCALL A.; HENKIN R.; CALENDRA D. Routine use of the thallium-technetium scan prior to parathyroidectomy. Am.Surg. 1987. 7:380-384

126.-MILLER D.L.; DOPPMAN J.L.; CHANG R. Angiographic ablation of parathyroid adenomas: Lessons from a 10 year experience. Radiology 1987. 165:601-607



*Bibliografía*

127.-MILLER D.L.; DOPPMAN J.J.; SHAWKER T.H. Localization of parathyroid adenomas in patients who have undergone surgery. Part II. Invasive imaging methods. Radiology 1987. 162:133-137

128.-MILLER R.D. Anesthesia. 1988. Ediciones Doyma. Barcelona. Cap. 45:1523-1542.

129.-MORRIS G.J. The effects of low temperatures on biological systems. 1987. Grout B.W.W. and Morris G.J. editors. 120-146, Edward Arnold.

130.-MOZES M.F., SOPER W.D., JONASSON O., LANG G.R. Total parathyroidectomy and autotransplantation in secondary hyperparathyroidism. ARCH.SURG. 1980. 115:378-385

131.-MUNDY G.; COVE D.; FISHER R.; HEATH D. Primary hyperparathyroidism: changes in the pattern of clinical presentation. Lancet 1980. 1:1317-20

132.-MURRAY T.M.; PEACOCK M.; POWELL D.; MONCHIK J.; POTTS J.T.Jr. Non-autonomy of hormone secretion in primary hyperparathyroidism. Clin Endocrinol Metab. 1972. 1:235-246

133.-NIEDERLE B.,ROKA R.,BRENNAN M.F. The transplantation of parathyroid tissue in man:development, indications, technique and results. ENDOCRINE REV. 1982. 3:245-279

*Bibliografía*

134.-NORRIS E.H. The parathyroid glands and the lateral thyroid in man: their morphogenesis, topographic anatomy and prenatal growth. *Contrib Embriol.* 1937. 26:247

135.-NORTON J.A.; SHAWKER T.H.; JONES B.L.; SPIEGEL A.M.; MARX S.J.; FITZPATRICK L.; AURBACH G.D.; DOPPMAN J.L. Intraoperative ultrasound and reoperative parathyroid surgery: an initial evaluation. *WORLD J. SURG.* 1986. 10:631-9

136.-OGG C.S. Total parathyroidectomy in treatment of secondary (renal) hyperparathyroidism. *BR.MED.J.* 1967. 4:331-334

137.-ORTS LLORCA F. Anatomia humana. Ed. Cientifico Medica Tomo III, 1983.

138.-OWEN,R. On the anatomy of the Indian rhinoceros (*Rh. unicornis*, L). *Trans.Zool.Soc.Lond.iv.* 1862. 31-58.

139.-PICARD D.; D'AMOUR P.; CARRIER L.; CHARTRAND R.; POISSON R. Localization of abnormal parathyroid gland(s) using thallium-201/iodine-123 subtraction scintigraphy in patients with primary hyperparathyroidism. *CLIN. NUCL. MED.* 1987. 12:60-4

140.-PROYE C. Première cervicotomie pour hyperparathyroïdisme primaire. Plaidoyer contre l'imagerie pré-opératoire. ANN. CHIR. 1990. 44:371-375.

141.-PURNELL D.C.; SMITH L.H.; SCHOLZ D.A.; ELVEBACK L.R.; ARNAUD C.D. Primary hyperparathyroidism: a prospective clinical study. Am.J.Med. 1971. 50:670-678

142.-PYRTEK L.J.; PAINTER R.L. An anatomic study of the relationship of the parathyroid glands to the recurrent laryngeal nerve. Surg Gynecol Obstet. 1964. 119:509-512

143.-ROGERS H.M. Parathyroid adenoma and hypertrophy of parathyroid glands. J. Am. Med. Ass. 1946. 130:22-28.

144.-ROGERS M.C. Current practice in anesthesiology. 1990. B.C.Decker. Mosby-Year Book. 70-72.

145.-ROSES D.F.; SUDARSKY L.A.; SANGER J.; RAGHAVENDRA B.N.; REEDE D.L.; BLUM M. The use of preoperative localization of adenomas of the parathyroid glands by thallium-technetium subtraction scintigraphy, high-resolution ultrasonography and computed tomography. surg. gynecol. obstet. 1989. 168:99-106.

146.-ROSLYN J.J.; MULDER D.G.; GORDON H.E. Persistent and recurrent hyperparathyroidism. Am. J. Surg. 1981. 142:21-25

*Bibliografía*

147.-ROSLYN J.J.; GORDON H.E.; MULDRÉ D.G. Mediastinal parathyroid adenomas. A cause of persistent hyperparathyroidism. Am Surg. 1983; 49(10): 523-7

148.-ROSS A.J.; COOPER A; ATTIE M.F.; BISHOP H.C. Primary hyperparathyroidism in infancy. J.Pediatr.Surg. 1986. 21(6): 493-9

149.-ROTHMUND M., WAGNER P.K. Total parathyroidectomy and autotransplantation of parathyroid tissue for renal hyperparathyroidism. A one-to six-year follow up. ANN.SURG. 1983.197:7-16

150.-ROTHMUND M.; WAGNER P.K. Assessment of parathyroid graft function after autotransplantation of fresh and cryopreserved tissue. World.J.Surg. 1984. 8(4): 527-33

151.-ROTHMUND M. Current status of parathyroid gland transplantation. LANGENBECKS ARCH. CHIR. 1986. 367:223-5

152.-ROTHMUND M.; WAGNER P.K. Reoperations for persistent and recurrent secondary hyperparathyroidism. ANN. SURG. 1988. 207:310-314.

153.-SALANDER H.,TISELL L.E. Latent hypoparathyroidism in patients with autotransplated parathyroid glands. AM.J.SURG. 1980. 139:385-388

*Bibliografía*

154.-SAN ROMAN TERAN J.M. Cirugia del hiperparatiroidismo. Ed. Cientifico Medica, 1979.

155.-SANDSTROM, I.V. On a new gland in man and several mammals (glandulae parathyroidae). Upsala Lakforenings Forh. 1879. 15:441-471.

156.-SANDSTROM I. On en ny kortel nos menniska och artscolliga daggijur. (Citado por WELLS). UPSALA LAKAREFORENINGS FORHANDL. 1889.15:441

157.-SATAVA R.M.; BEHARS O.H.; SCHOLZ D.A. Success rate of cervical exploration for hyperparathyroidism. Arch. Surg. 1975. 110:625-28

158.-SAXE A.W.; BRENNAN M.F. Strategy and technique of reoperative parathyroid surgery. Surgery. 1981; 89(4):417-23

159.-SAXE, A., BRENNAN, M.F. Reoperative parathyroid surgery for primary hyperparathyroidism caused by multiple-gland disease: total parathyroidectomy and autotransplantation with cryopreserved tissue. SURGERY. 1982. 91:616-621

160.-SAXE A.W., SPIEGEL A.M., MARX St.J.; BRENNAN M.F. Deferred parathyroid autografts with cryopreserved tissue after reoperative parathyroid surgery. ARCH. SURG. 1982.117:538-543

*Bibliografía*

161.-SAXE AW; NOELL W Jr; SCHNEIDER S. Parathyroid autotransplantation. Indications and techniques. AORN J. 1986.44(3): 396-401

162.-SAXE A.W.; BROWN E.; HAMBURGER S.W. Thyroid and parathyroid surgery performed with patient under regional anesthesia. Surgery 1988. 103:415-420

163.-SCHERPEREEL P.H.; LEFEVRE J.; PROYE CH. Anestesia-Reanimacion y Endocrinología. 1991. Masson S.A. Barcelona. 43-58.

164.-SCHLAGENHAUFER,F. Zwei Falle von Parathyroideatumoren. Wien. Klin. Wschr. 1915. 28:1362.

165.-SEYFER A.E., SIGDESTAD J.B., HIRATA R.M. Surgical considerations in hyperparathyroidism: reappraisal of the need for multigland biopsy. AM.J.SURG. 1976. 132:338-340

166.-SICARD G.A.; WELLS S.A. Surgical treatment of secondary hyperparathyroidism. Surgery of the thyroid and parathyroid glands. 1983. Ed. E.L.Kaplan. 243-252. Churchill Livingstone. New York.

167.-SONODA T.; OHKAWA T.; TAKEUCHI M.; YACHIKU S. Successful parathyroid preservation: experimental study. SURGERY 1968. 64:791-796.

*Bibliografia*

- 168.-SPRITZER C.E.; GEFTER W.B.; HAMILTON R.; GREENBERG B.M.; AXEL L.; KRESSEL H.Y. Abnormal parathyroid glands : high-resolution M R imaging. RADIOLOGY 1987.162:487-91
- 169.-STOELLTING R.K.; DIERDORF S.F. Anesthesia and co-existing disease. 1983. Churchill Livingstone. New York. 452-455.
- 170.-TAKAGI H., TOMINAGA Y., UCHIDA K., YAMADA N., KAWAI M., KANO T., MARIMOTO T. Subtotal versus total parathyroidectomy with forearm autograft for secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure. ANN.SURG. 1984. 200:18-23
- 171.-TALWALKAR Y.B.; PURI H.C.; HAWKER C.C.; TSENG C; CAMPBELL J.R.; CAMPBELL R.A. Parathyroid autotransplantation in renal osteodystrophy. Am J Dis Child. 1979; 133(9): 901-5
- 172.-THOMPSON N.W.;ECKHAUSER F.E.; HARNESS J.K. The anatomy of primary hyperparathyroidism. SURGERY 1982. 92:814-821
- 173.-THOMPSON,N.W. The history of hyperparathyroidism. Acta Chir.Scand. 1990. 156:5-21.
- 174.-TISELL L.E. Results of surgical and medical treatment in primary hyperparathyroidism. Ann Chir Gynaecol. 1983; 72(3): 129-34

*Bibliografía*

175.-UDEN P.; ASPELIN P.; BERGLUND J.; LILJA B.; NYMAN U.; OLSSON L.E.; ZEDERFELDT B. Preoperative localization in unilateral parathyroid surgery. ACTA CHIR. SCAND. 1990. 156:29-35.

176.-VAIL A.D.; COLLER F.C. The number and location of parathyroid glands recovered from 202 routine autopsies. Mo Med. 1966. 63:347-350

177.-VASSALE G.,GENERALI P. Sur les effects de l'extirpation des glandes parathyroidiennes. Arch.Ital.Biol. 1896. 26:61

178.-VON RECKLINGHAUSEN,F.D. Die fibrose oder deformierende ostitis, die osteomalacie und die osteoplastische karzinose in ihren gegenseitigen Beziehungen. Festschrift fur Rudolph Virchow. Berlin, 1891. pp. 1-89.

179.-WAGNER P.K.; KNUTH A; KRAUSE U; GABBERT H; SCHARFE T; ROTHMUND M. An in vitro model for the study of human parathyroid gland tissue: single cell suspensions and monolayer cultures. Res Exp Med Berl. 1982; 181(2): 147-54

180.-WAGNER P.K.; RUMPELT H.J.; KRAUSE U.; ROTHMUND M. The effect of cryopreservation on hormone secretion in vitro and morphology of human parathyroid tissue. Surgery. 1986. 99(3):257-64



*Bibliografía*

181.-WAGNER P.K. Autotransplantation of cryopreserved human parathyroid tissue. PROG. SURG. 1986. 18:206-220

182.-WANG C.A. Parathyroid reexploration, a clinical and pathological study of 112 cases. Ann. Surg. 1977. 186:140-145

183.-WANG C.A.; MAHAFFEY J.E.; AXELROD L.; PERLMAN J.A. Hyperfunctioning supernumerary parathyroid glands. Surg Gynecol Obstet 1979. 148:711-714

184.-WANG C.A.; CASTLEMAN B; COPE O. Surgical management of hyperparathyroidism due to primary hyperplasia. Ann Surg. 1982. 195(4): 384-92

185.-WELK R.A.; ALIX D.R. A community hospital experience with total parathyroidectomy and autotransplantation for renal hyperparathyroidism. Am.Surg. 1987. 53(11):622-7

186.-WELLER G. Development of the thyroid, parathyroid and thymus glands in man. Contributions to embryology n. 141 vol. 24. Carnegie Inst. Washington Pub. n 443, 1933.

187.-WELLS S.A., BURDICK J.F., CHRISTIANSEN C.L. Long-term survival of dogs transplanted with parathyroid glands as autografts and as allografts in immunosuppressed hosts. TRANS.PROC. 1973.5:769

*Bibliografia*

188.-WELLS S.A., BURDICK J.F., KETCHAM A.S. Transplantation of the parathyroid glands in dogs: Biochemical, histological and radioimmunoassay proof function. TRANSPLANTATION. 1973.15:179

189.-WELLS S.A., BURDICK J.F., HATTLER B.G., CHRISTIANSEN C., PETTIGREW H.M., ABE M., SHERWOOD L.M. The allografted parathyroid gland: evaluation of function in the immunosuppressed host. ANN.SURG. 1974. 180:805-813

190.-WELLS S.A.,CHRISTIANSEN C. The transplanted parathyroid gland: evaluation of cryopreservation and other environmental factors which affects its function. SURGERY. 1974. 75:49-55

191.-WELLS S.A.; GUNNELLS J.C.; SHELBOURNE J.D.; SCHNEIDER A.B.; SHERWOOD L.M. Transplantation of the parathyroid glands in man: clinical indications and results. SURGERY 1975. 78:34-44

192.-WELLS S.A., ELLIS G.J., GUNNELLS J.C., SCHNEIDER A.B., SHERWOOD L.M. Parathyroid autotransplantation in primary parathyroid hyperplasia. N.ENGL.J.MED. 1976.295:57-62

193.-WELLS S.A.; GUNNELLS J.C.; GUTMAN R.A.; SHELBOURNE J.D.; SCHNEIDER A.B.; SHERWOOD L.M. The successful transplantation of frozen parathyroid tissue in man. SURGERY 1977. 81:86-90

*Bibliografia*

194.-WELLS S.A.; FARNDON J.R.; DALE J.K.; LEIGHT G.S.; DILLEY W.G. Long-term evaluation of patients with primary parathyroid hyperplasia managed by total parathyroidectomy and heterotopic autotransplantation. *Ann.Surg.*1980. 192:451-458.

195.-WELLS S.A.; LEIGHT G.S.; ROSS A.J. Primary hyperparathyroidism. *Curr.Probl.Surg.* 1980. 8:387-463.

196.-WELSH C.L.; TAYLOR G.W.; CATTELL W.R.; BAKER L.R. Parathyroid surgery in chronic renal failure: subtotal parathyroidectomy or autotransplantation? *Br.J.Surg.* 1984; 71(8): 591-2

197.-WHEELER M.H. The hyperfunctioning intrathyroidal parathyroid gland : a potential pitfall in parathyroid surgery. *WORLD J. SURG.* 1987. 11:110-4

198.-WHITE K.S.; WILKINSON C.A.; NIXON W.P.Jr; ALMKVIST R.D. Total parathyroidectomy and forearm autotransplantation for chronic renal failure: a useful tool for the general surgeon in private practice. *South Med J.* 1986; 79(7): 844-6

199.-ZDON M.J.; ILIOPOULOS J.I.; THOMAS J.H.; PIERCE G.E.; HERMRECK A.S.; FRIESEN S.R. Subtotal parathyroidectomy for secondary hyperparathyroidism. *Surgery.* 1984; 96(6): 1103-8

*Bibliografía*

200.-ZWAS S.T. Preoperative parathyroid localization by superimposed iodine-131 toluidine blue and technetium-99 m pertechnetate imaging. J. NUCL. MED. 1987.28:298-307