

**Trabajo de Fin de Máster para la obtención del título de Máster en Medicina,
Sanidad y Mejora Animal.**

Memoria de investigación con título:

Detección y localización inmunohistoquímica del receptor de leptina en la glándula paratiroides de ratas

Línea de investigación:

Fisiopatología del metabolismo mineral

Alumna:

Ángela Vidal Carrascosa

Tutor:

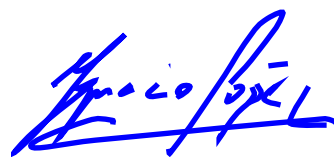
Prof. Dr. Ignacio López Villalba

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba,
España.

Córdoba, a 30 de Agosto de 2016



Fdo: **ÁNGELA VIDAL CARRASCOSA**



VºBº **IGNACIO LÓPEZ VILLALBA**

CONTENIDOS

Resumen	2
Introducción	3
Material y Métodos	6
Resultados	10
Discusión	16
Conclusiones	21
Bibliografía	22
Abstract	24
Agradecimientos	25

DETECCIÓN Y LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR DE LEPTINA EN LA GLÁNDULA PARATIROIDES DE RATAS

Ángela Vidal, Ignacio López¹

¹Dept Medicina y Cirugía Animal, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, España.

Resumen

La glándula paratiroides es una glándula endocrina involucrada en la homeostasis del calcio mediante la producción de parathormona (PTH). La relación existente entre los niveles de leptina y PTH en obesidad e hiperparatiroidismo sugiere la presencia de receptores de leptina en la glándula paratiroides. La leptina es una adipoquina cuya función principal es la regulación del metabolismo energético. Su receptor se encuentra en diferentes órganos, entre ellos hipotálamo y cerebelo. El objetivo de este estudio fue demostrar la presencia y localización del receptor de leptina en la glándula paratiroides. Se utilizaron muestras de glándula paratiroides procedentes de dos ratas Zucker. Las muestras se fijaron y procesaron para realización de inmunohistoquímica con la utilización de anticuerpo primario y secundario. Se emplearon muestras de cerebro y cerebelo como controles positivos y se establecieron controles negativos para todos los tejidos. El receptor de leptina manifestó inmunorreacción positiva en el citoplasma de las células principales de la glándula paratiroides. Estos resultados ponen de manifiesto una relación directa entre la leptina y la hormona paratiroidea y sugieren la existencia de una conexión entre el metabolismo energético y mineral. El desarrollo de hiperparatiroidismo en estatus crónico de obesidad, teniendo en cuenta estos resultados, podría explicarse por la acción de la leptina sobre sus receptores en la glándula paratiroides.

Palabras clave: receptor de leptina, glándula paratiroides, leptina, PTH, hiperparatiroidismo.

Introducción

La glándula paratiroides es el principal órgano endocrino encargado de regular los niveles de calcio en sangre (Capen *et al.* 1989). En la rata está constituido por un único par de glándulas situadas en la región cervical, en las inmediaciones del polo superior del tiroides (Capen *et al.* 1989, Rosof 1934).

La glándula paratiroides de la rata se encuentra separada de los folículos tiroideos por una fina cápsula de tejido conectivo. La arquitectura glandular se estructura en un denso parénquima de células epiteliales poligonales, células principales, formando cordones celulares separados por un estroma de tejido conectivo fibrorreticular que se dispone a lo largo de los vasos sanguíneos de la glándula dando lugar a trabéculas incompletas (Rosof 1934) (Figura 1). Son las células principales las que tienen la actividad secretora de la glándula, liberando hormona paratiroidea (PTH). Según el estado funcional, se ha descrito la presencia de dos tipos de células principales: claras y oscuras. Las células claras deben su nombre al escaso color de su citoplasma a la tinción y se consideran inactivas por la escasez de orgánulos secretores. Las células oscuras, en cambio, poseen un citoplasma electrodensito con abundantes orgánulos de secreción que les confiere la propiedad de células activas (Capen *et al.* 1989, Rosof 1934, Trier 1958). Algunos autores discrepan en cuanto a la diferencia de funcionalidad de estas células y defienden que la electrodensidad no se debe al número de orgánulos secretores sino a la diferencia de tamaño de las organelas celulares y el método de fijación utilizado. De acuerdo con esta hipótesis, el estadio funcional de células claras y oscuras no habría de ser diferente de forma que la clasificación de las células principales se debe únicamente a la electrodensidad de su citoplasma (Larsson 1984).

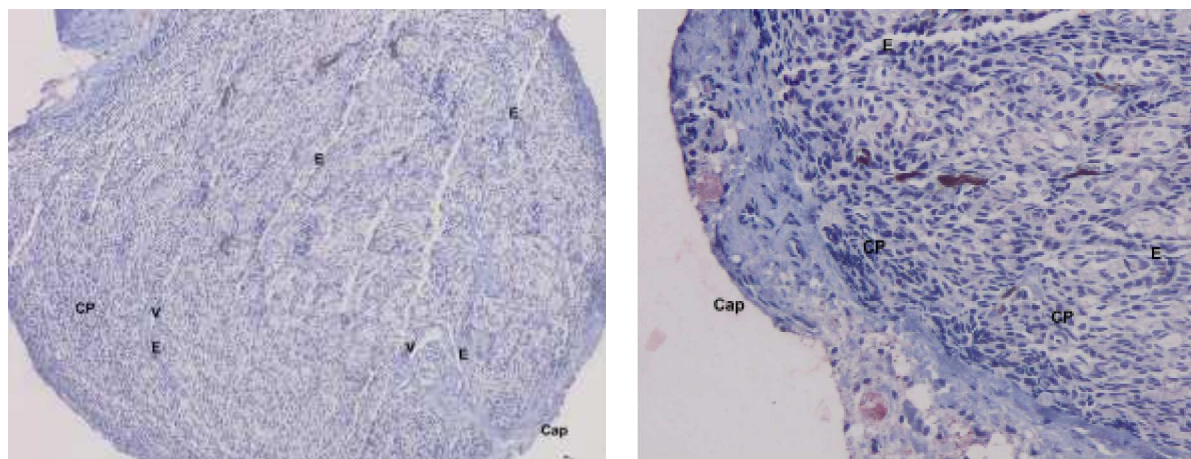


Figura 1. Glándula paratiroides de rata. 10x (izquierda) y 20x (derecha). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Se observa la arquitectura normal de la glándula con una fina cápsula (Cap) de tejido conectivo rodeando la paratiroides y estructurada en un parénquima denso de grupos de células principales (CP) separados por un estroma de tejido conectivo (E) que se dispone alrededor de los vasos (V).

Otro tipo celular descrito en la glándula paratiroides humana son las células oxifílicas, si bien no hay evidencias de que estas células se encuentren en las ratas, ratones y otras especies animales de pequeños mamíferos (Rosof 1934, Trier 1958). Las células oxifílicas son de mayor tamaño que las principales y son consideradas inactivas en cuanto a capacidad secretora de PTH. El elevado número de mitocondrias que poseen respecto de las principales les confiere una alta capacidad enzimática oxidativa (Capen *et al.* 1989); no obstante, no se conoce cuál es la función real de estas células (Larsson 1984, Rosof 1934, Trier 1958).

La PTH es una hormona formada por una cadena de 84 aminoácidos. Se almacena y libera de las células principales de la paratiroides y su principal función es regular la calcemia, con un efecto hipercalcemiante (Rosof 1934). La participación de la PTH en la homeostasis del calcio se basa en las siguientes acciones: 1) activa los osteoblastos estimulando la resorción ósea, 2) aumenta la reabsorción de calcio en el túbulo distal del riñón, 3) estimula la síntesis de 1,25-dihidroxitamina D₃, y 4) aumenta la absorción intestinal de calcio.

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de receptor de PTH en tejido adiposo (Hoang *et al.* 2013, Taniguchi *et al.* 1987), donde se le atribuye la capacidad de estimular la liberación de leptina (Hoang *et al.* 2013) e inducir la lipólisis (Taniguchi *et al.* 1987).

Diferentes publicaciones respaldan la asociación entre leptina y PTH, impulsando al estudio de la leptina como factor importante en el desarrollo de hiperparatiroidismo primario (Bolland *et al.* 2005, Cheng *et al.* 2011, Hoang *et al.* 2013, Taniguchi *et al.* 1987). El hiperparatiroidismo es una enfermedad endocrina caracterizada por el aumento en la producción de PTH. Se admite la existencia de una asociación entre el aumento del peso corporal previo al desarrollo de hiperparatiroidismo siendo, además, la obesidad un factor desencadenante de hipercalcemia en estos pacientes (Bolland *et al.* 2005).

En este sentido, la leptina puede jugar un papel importante en tanto que es la hormona encargada de regular el balance energético (Cheng *et al.* 2011). Hoang *et al.* demostraron que en pacientes con hiperparatiroidismo, corrigiendo éste con extirpación quirúrgica de la glándula paratiroides, no sólo se corregían los niveles de PTH sino que también se producía un descenso en los niveles de leptina.

La leptina es una citoquina derivada de los adipocitos cuya función principal es la regulación del metabolismo energético inhibiendo el centro del apetito en el hipotálamo (Cheng *et al.* 2011, Patel *et al.* 2008). Este control es posible por la presencia del receptor de leptina (ObR), una proteína transmembrana compuesta por diferentes subunidades. Así, se encuentran la subunidad ObRb que corresponde al receptor activo de la leptina y ObRa, isoforma de transducción (Takaya *et al.* 1996).

Varios autores han demostrado la presencia del receptor de leptina en diferentes tejidos como hipotálamo, hipófisis y tejido adiposo y postulan que la leptina posee una acción directa en

estos órganos. Morioka *et al.* demostraron esta teoría creando un modelo de ratón deficiente de ObR en páncreas concluyendo que en estatus de obesidad, la alteración funcional del receptor de leptina en el páncreas induce la intolerancia a la glucosa y altera el correcto funcionamiento de las células pancreáticas.

Teniendo en cuenta la relación existente entre obesidad e hiperparatiroidismo y con la evidencia de que pacientes obesos presentan un estado de hiperleptinemia, se plantea la hipótesis de la existencia de un vínculo directo entre leptina y PTH que se explique por la existencia de receptores específicos para leptina en la glándula paratiroides.

La leptina, como hormona directamente relacionada con el metabolismo energético y obesidad se estudia habitualmente en modelos animales utilizando ratas tipo Zucker. Esto es así porque estas ratas tienen la ventaja sobre otros modelos animales de la misma especie de presentar dos variantes: rata Zucker de fenotipo delgado y rata Zucker de fenotipo obeso. Las ratas de fenotipo obeso presentan una mutación en el receptor de leptina que impide la correcta expresión y funcionalidad del mismo. Las ratas de fenotipo delgado, en cambio, no tienen mutación de dicho receptor con lo que su expresión en los diferentes tejidos en los que se encuentra no está alterada (Takaya *et al.*, 1996). Así, la elección de ratas Zucker de fenotipo delgado para la realización del presente estudio queda justificada por la utilidad de la misma en experimentos específicos sobre el receptor de leptina.

Aunque, como ya hemos comentado anteriormente, existe información que de forma indirecta conecta la leptina con la glándula paratiroides, según nuestro conocimiento no se ha demostrado la presencia del receptor de leptina en la paratiroides de ninguna especie, por lo que nos proponemos poner de manifiesto la presencia del receptor de leptina en paratiroides de rata Zucker *lean*. Por ello, el objetivo que nos planteamos en este trabajo es demostrar la existencia del receptor de leptina en paratiroides mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Material y métodos

El diseño de este estudio se plantea fijando dos objetivos: el primero, poner a punto la técnica inmunohistoquímica para la detección del receptor ObR; el segundo, confirmar su presencia y localizar el receptor en la glándula paratiroides como fin último del trabajo.

Se utilizaron dos ratas tipo Zucker de fenotipo delgado para la realización de este estudio. Las ratas fueron sacrificadas por exanguinación bajo anestesia general con tiopental sódico. Los tejidos incluidos fueron grasa, cerebro, cerebelo, hipófisis y glándula paratiroides. Todos ellos extraídos y fijados en formol tamponado al 10% durante 24 horas y posteriormente procesados e incluidos en parafina. A partir de las muestras parafinadas se obtuvieron cortes histológicos de 4 μm de grosor para la realización de la técnica inmunohistoquímica, que fueron encargados al departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Córdoba. Estos cortes de los diferentes tejidos se montaron en portaobjetos con poli-L-lisina y posteriormente se llevó a cabo sobre ellos la técnica de la avidina-biotina-peroxidasa (ABC).

Para llevar a cabo la puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica y marcar el receptor de leptina, se utilizó un protocolo con diferentes variantes (Tabla 1) sobre cortes histológicos de grasa, cerebro, cerebelo e hipófisis, en los que está descrita la expresión del receptor de leptina. Así, se utilizaron dos tipos de anticuerpos primarios anti-ObR, cada uno de ellos con sus respectivos anticuerpos secundarios biotinilados. Además para cada pareja de anticuerpo fue necesario utilizar suero normal, con el fin de neutralizar reacciones cruzadas en la unión del anticuerpo primario.

Se procedió a desparafinar las preparaciones con xilol, donde estuvieron sumergidas durante 15 minutos para posteriormente introducir las en una cuna con alcohol 100° durante 10 minutos. Con el fin de evitar tinciones de fondo inespecíficas se continuó con la inhibición de la peroxidasa endógena con una solución al 0,3% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en metanol, tratamiento que se realizó en dos fases: primero las muestras se mantuvieron durante 30 minutos en un agitador magnético sumergidas en 200 mL de metanol con 6,4 mL de H_2O_2 , y pasado este tiempo se añadieron 2,4 mL de H_2O_2 continuando en agitación durante otros 15 minutos. Terminado el proceso de inhibición, las preparaciones se rehidrataron en una escala de alcohol 96°, alcohol 70° y agua destilada manteniéndose durante 5 minutos en cada uno de ellos. Las preparaciones hidratadas, se introdujeron 10 minutos en una cuna con una solución de tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffer Saline*).

El pretratamiento es un proceso que permite el desenmascaramiento antigénico facilitando la posterior unión con el anticuerpo primario. Tres protocolos diferentes se llevaron a cabo para este estudio, de forma que hubo preparaciones que no fueron sometidas a ningún tipo de pretratamiento y otras a las que se les realizó desenmascaramiento antigénico bien con una solución de citrato sódico a pH 6, bien con una solución de ácido cítrico 10 mM a pH 6.

El pretratamiento con citrato sódico consistió en sumergir las muestras en 400 mL de una solución compuesta por 500 mL de agua destilada y 1,47 gramos de citrato sódico en polvo, previamente balanceada a pH 6 mediante la adición de HCl 1N. Las preparaciones, en un recipiente apto para microondas, se mantuvieron durante 7 minutos a potencia *medium* y posteriormente 13 minutos a potencia intermedia entre *defrost* y *medium-low*, alcanzando una temperatura cercana al punto de ebullición y en un microondas convencional (MI 2015, Orbegozo). Se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos para finalmente añadir los 100 mL restantes de la solución.

Respecto a las preparaciones sometidas a pretratamiento con ácido cítrico, se preparó una solución 10 mM añadiendo 3,15 gramos de ácido cítrico en polvo a 1500 mL de agua destilada. Previo balanceo de la solución a pH 6 con NaOH 1N, se cubrieron las muestras con la solución en un recipiente apto para microondas, donde se introdujeron durante 15 minutos haciendo tres ciclos de 5 minutos cada uno y añadiendo 100 mL entre ellos, como ya describieron Dall'Aglio *et al* en 2015. El primer ciclo se realizó a potencia *medium* y los dos restante en *medium-low* con el fin de no superar una temperatura de 100°C. Tras los 15 minutos de pretratamiento las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos añadiendo al final otros 100 mL de la solución de ácido cítrico. Terminado el pretratamiento se realizaron 4 baños con PBS de 5 minutos cada uno antes de la adición del suero normal.

A continuación, todas las preparaciones, independientemente de la realización o no del desenmascaramiento antigénico, fueron incubadas durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en cámara húmeda, con suero normal de cabra al 10%, para aquellas preparaciones a las que se añadirían anticuerpo monoclonal de ratón (sc-8391, Santa Cruz Biotechnology), o suero normal de pollo al 1%, en caso de añadir anticuerpo policlonal de cabra (sc-1834, Santa Cruz Biotechnology).

Posteriormente, se incubaron a diferentes concentraciones (1:30 o 1:100) con uno de los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal de ratón (sc-8391, Santa Cruz Biotechnology) que marca la isoforma corta del receptor de leptina en los aminoácidos 870-894, o anticuerpo policlonal de cabra (sc-1834, Santa Cruz Biotechnology), capaz de marcar el carbono terminal de la isoforma corta del receptor.

Se reservó siempre una preparación de cada tejido y tipo de pretratamiento sin anticuerpo primario para utilizarlo como control negativo. Las muestras se mantuvieron durante 18 horas en cámara húmeda a 4°C.

La utilización del anticuerpo monoclonal de ratón a concentración 1:30 y 1:75 en un protocolo sin pretratamiento con incubación de 42 horas también fue probada en este estudio.

El anticuerpo secundario biotinilado: anticuerpo anti-ratón hecho en cabra (sc-2039, Santa Cruz Biotechnology; 1:20) o anticuerpo anti-cabra hecho en pollo (sc-2894, Santa Cruz Biotechnology; 1:200), se añadió después de la incubación del anticuerpo primario previo

lavado de 20 minutos en PBS en ciclos de 5 minutos cada uno. Éste se mantuvo en cámara húmeda durante 30 minutos y a temperatura ambiente; tiempo tras el cual se procedió al tratamiento con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) durante 1 hora a temperatura ambiente también en cámara húmeda. Finalmente el revelado de las preparaciones se hizo con el cromóforo NovaRED (NovaRED Peroxidase Kit - Vector Laboratories) durante 3 minutos seguido de 3 baños con agua destilada de 5 minutos cada uno y tinción con hematoxilina.

Un mejor contrastado de las preparaciones se obtuvo introduciéndolas durante 2 segundos en una solución de carbonato de litio, que se aclaró con agua destilada antes de proceder al montaje.

Las muestras fueron deshidratadas siguiendo una escala ascendente de alcoholes, montadas y observadas al microscopio óptico.

Una vez puesta a punto la técnica, se puso de manifiesto el receptor de leptina en paratiroides de ratas Zucker de fenotipo delgado. Para ello se utilizaron cortes histológicos de la glándula paratiroides y se incluyeron preparaciones de cerebro y cerebelo como controles positivos. Se utilizó anticuerpo primario policlonal de cabra (sc-1834, 1:30, Santa Cruz) y anticuerpo secundario biotinilado de pollo (sc-2894, 1:200, Santa Cruz) además de someter las preparaciones a desenmascaramiento antigénico con ácido cítrico (Tabla 1).

PreTto	Ac 1°	[Ac 1°]	Incubación Ac 1°	Ac 2°	[Ac 2°]	Suero normal
NO	sc-8391	1:30	18h	sc-2039	1:20	Cabra 10%
NO	sc-8391	1:75	42h	sc-2039	1:20	Cabra 10%
NO	sc-8391	1:30	42h	sc-2039	1:20	Cabra 10%
Citrato sódico	sc-8391	1:100	18h	sc-2039	1:20	Cabra 10%
Citrato sódico	sc-8391	1:30	18h	sc-2039	1:20	Cabra 10%
NO	sc-1834	1:30	18h	sc-2894	1:200	Pollo 1%
Citrato sódico	sc-1834	1:30	18h	sc-2894	1:200	Pollo 1%
Ácido cítrico	sc-1834	1:30	18h	sc-2894	1:200	Pollo 1%
Ácido cítrico	sc-1834	1:100	18h	sc-2894	1:200	Pollo 1%

Tabla 1. Protocolos de inmunohistoquímica realizados durante el estudio.

Resultados

La ejecución de la puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica resultó en una inmunorreactividad muy marcada en aquellas preparaciones de cerebro y cerebelo incubadas con el anticuerpo primario policlonal de cabra (sc-1834) y que, además, fueron sometidas a un protocolo de pretratamiento con una solución de ácido cítrico 10 mM a pH 6. Los anticuerpos se utilizaron a concentraciones de 1:30 y 1:200 para el anticuerpo primario y secundario respectivamente. No se observó tinción en ninguno de los controles negativos utilizados, lo que demuestra la validez de la técnica.

No obstante, las muestras de tejido adiposo sometidas al mismo protocolo fueron descartadas como controles positivos por presentar inmunorreacción más débil complicando su correcta interpretación. Es por ello que fueron elegidas las preparaciones de cerebro como control positivo para llevar a cabo el objetivo principal de este estudio: demostrar la presencia del receptor de leptina en la glándula paratiroides.

No se obtuvieron resultados positivos en las muestras de cerebro y cerebelo cuando se redujo la concentración del anticuerpo primario a concentración 1:100 y aplicando el mismo pretratamiento con ácido cítrico. Tampoco se consiguió inmunorreacción utilizando la solución de citrato sódico pH 6 para realizar el tratamiento de desenmascaramiento antigénico en un protocolo con anticuerpo policlonal de cabra (sc-1834). Las preparaciones sin pretratamiento previo también resultaron negativas.

Ninguno de los protocolos empleados basados en el uso del anticuerpo primario monoclonal de ratón (sc-8391) manifestó positividad tanto en muestras de tejido adiposo, cerebro, cerebelo o glándula paratiroides. Esto pudo deberse a un defecto en el anticuerpo, a la realización de un protocolo inadecuado para este anticuerpo o la inutilidad del mismo para el objetivo propuesto en nuestro estudio.

La inmunorreactividad encontrada en cerebro se localiza en el hipotálamo, en el que los cuerpos neuronales y prolongaciones dendríticas manifestaron la presencia del receptor ObR (Figura 2).

Estos resultados encontrados en el cerebro de ratas Zucker en la puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica coinciden con publicaciones anteriores que demostraron la presencia y localización del receptor de leptina en cerebro tanto de ratas Sprague-Dawley (Shioda *et al*, 1998) como en cerebro humano (Couce *et al*, 1997).

En las muestras de cerebelo, el receptor se manifiesta en los cuerpos neuronales y prolongaciones dendríticas de la sustancia blanca cerebelosa (Figura 3). Además, también en la corteza cerebelosa se mostró el receptor de leptina con positividad marcada en las células de Purkinje así como en la capa granular (Figura 4).

También se encontró expresión del receptor de leptina en la hipófisis siendo tanto en las membranas como en el citoplasma de diferentes líneas celulares de la adenohipófisis donde se hizo evidente su presencia.

Siguiendo el protocolo que mejores resultados había obtenido en la puesta a punto del anticuerpo en los tejidos controles: pretratamiento con ácido cítrico 10 mM e incubación con anticuerpo primario policlonal de cabra a concentración 1:30 y secundario a 1:200, se puso de manifiesto el receptor de leptina en las preparaciones de glándula paratiroides de ratas Zucker de fenotipo delgado.

La inmunorreactividad se evidenció en el citoplasma de la mayoría de las células principales de la paratiroides de todas las muestras de ambas ratas utilizadas para el estudio (Figuras 5a y 6).

Las muestras de paratiroides tratadas como control negativo no manifestaron el receptor en las células principales (Figura 5b). Sí se observó tinción en algunas células reticulares (Figura 7). El estudio histológico de preparaciones de la glándula paratiroides con una tinción simple de hematoxilina y eosina confirmó la naturaleza de dicha tinción, tratándose de pigmento y no de inmunorreacción (Figura 8). Este pigmento se pudo observar tanto en muestras positivas, negativas y en aquellas con hematoxilina únicamente. Se localizó en las células reticulares que conforman el tejido conectivo glandular aunque no se presentaba ni en la totalidad de estas células ni en todos los cortes histológicos examinados.

El estudio con hematoxilina y eosina también sirvió para facilitar la comprensión de la estructura histológica normal de la glándula paratiroides de las ratas observándose la organización de las células principales (Figura 9). Estas se disponen en grupos de tamaño variable separados unos de otros por las trabéculas de tejido conjuntivo que conforman el estroma.

No se observó en los controles negativos tinción de fondo que pudiera sugerir un excesivo tiempo de revelado falseando así los resultados considerados positivos en las muestras problema.

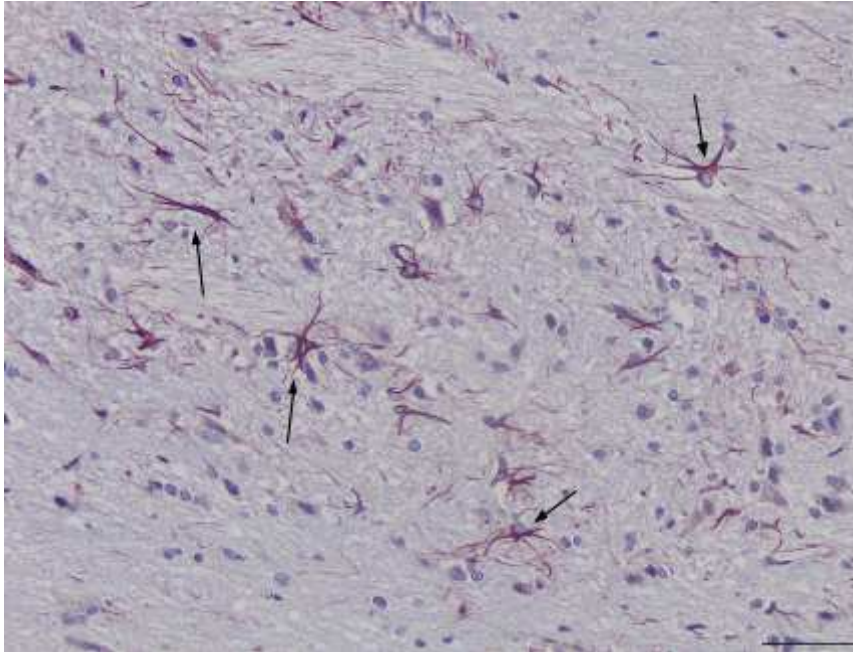


Figura 2. Cerebro de rata (20x). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Inmunorreacción positiva a ObR empleando anticuerpo policlonal de cabra (sc-1834; 1:30) y ácido cítrico. Receptor presente en somas neuronales y dendritas.

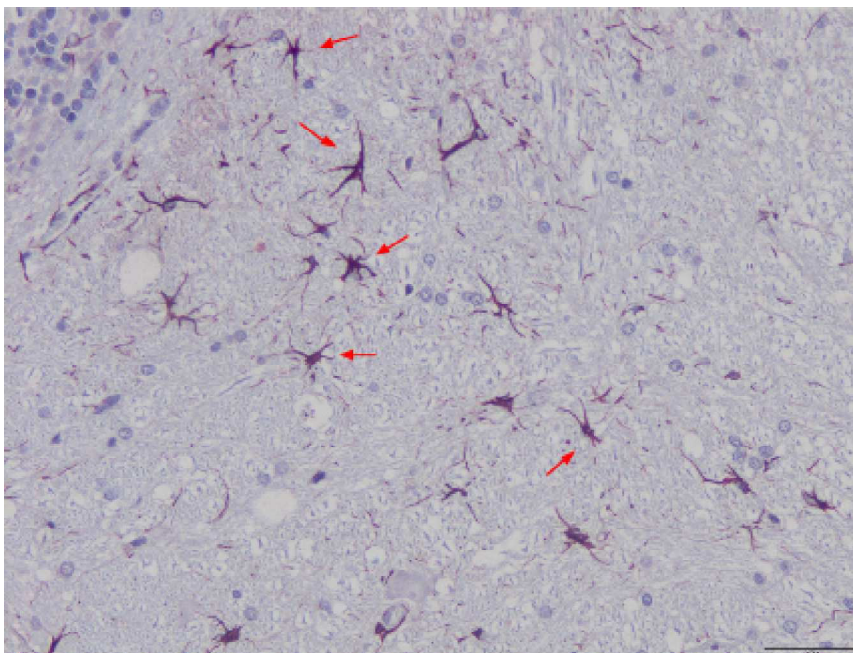


Figura 3. Sustancia blanca del cerebelo de rata Zucker (20x). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Inmunoreactividad positiva empleando anticuerpo policlonal de cabra (sc-1834; 1:30) y ácido cítrico. El receptor ObR se observa en los cuerpos neuronales y dendritas.

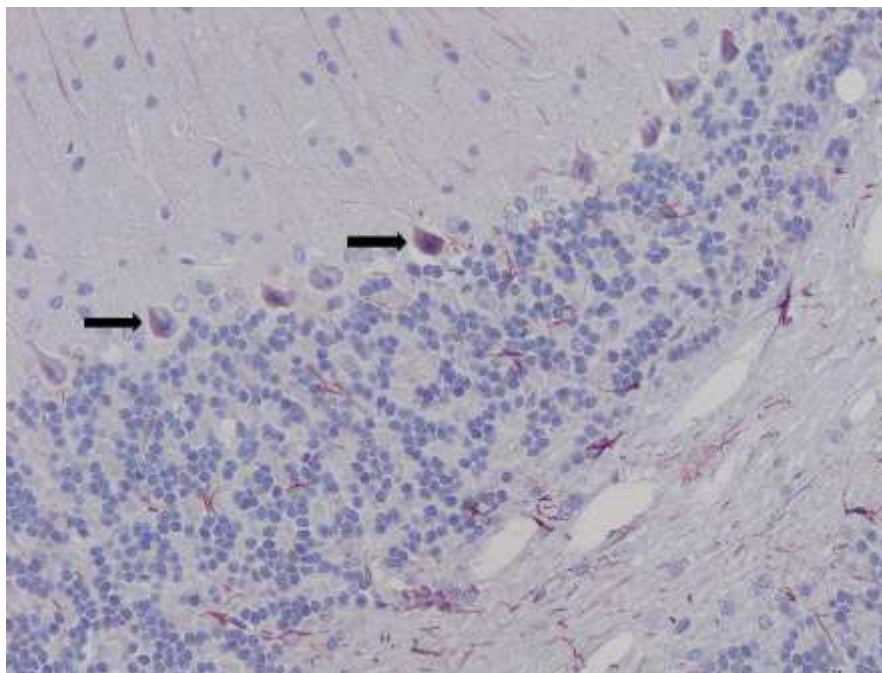


Figura 4. Corteza cerebelosa de rata Zucker (20x). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Inmunohistoquímica realizada con anticuerpo policlonal de cabra (sc-1834; 1:30) y ácido cítrico. Imagen de con inmunorreactividad positiva al receptor de leptina en las células de Purkinje (flecha) y en la capa granular.

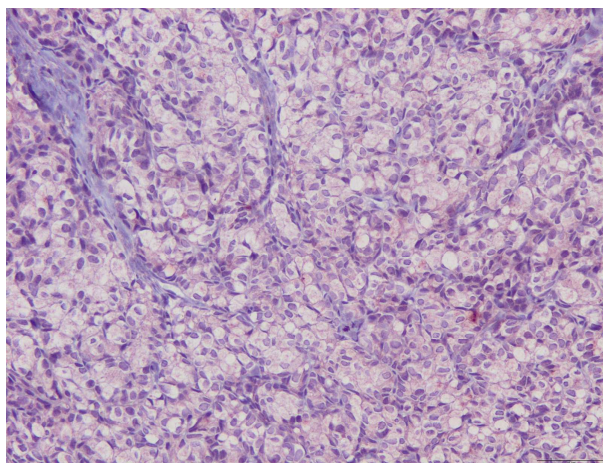


Figura 5a. Glándula paratiroides de rata (20x). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Manifestación del receptor de leptina empleando anticuerpo policlonal de cabra (sc-1834; 1:30) y ácido cítrico. Se observa inmunorreacción positiva en el citoplasma de las células principales.

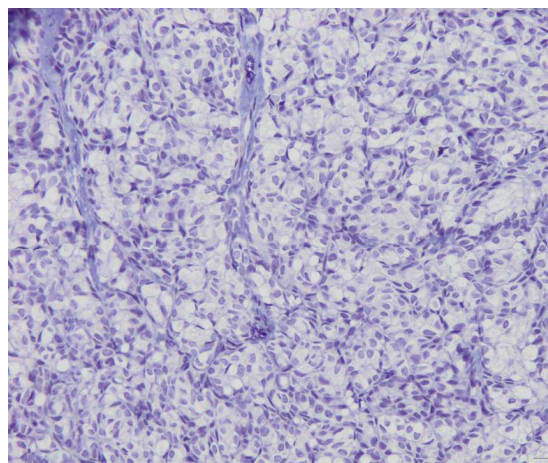


Figura 5b. Glándula paratiroides (20x). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Control negativo sin inmunoreacción al receptor de leptina.

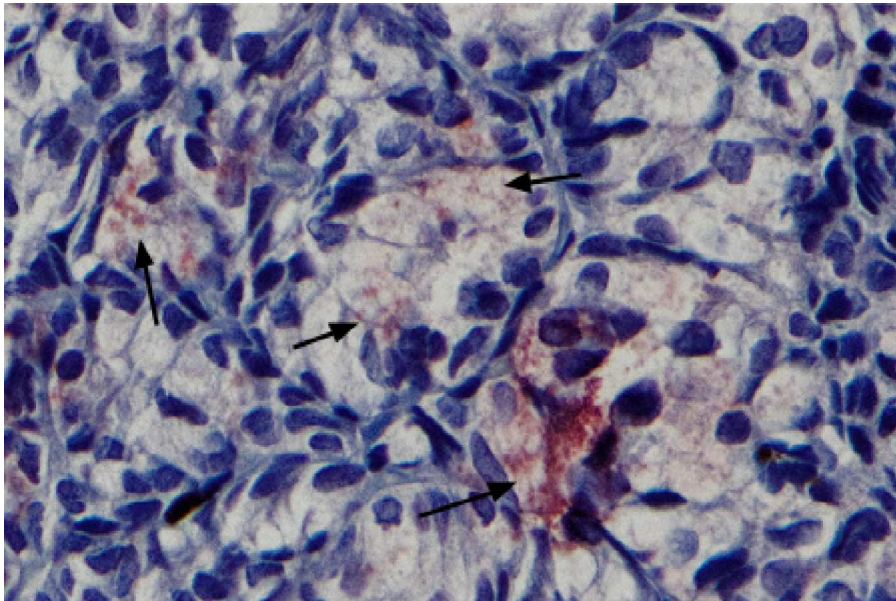


Figura 6. Glándula paratiroides de rata (40x). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Técnica inmunohistoquímica con anticuerpo policlonal de cabra (sc-1834; 1:30). Detalle de la manifestación del receptor de leptina (en rojo, flechas) en la células principales de la glándula paratiroides.

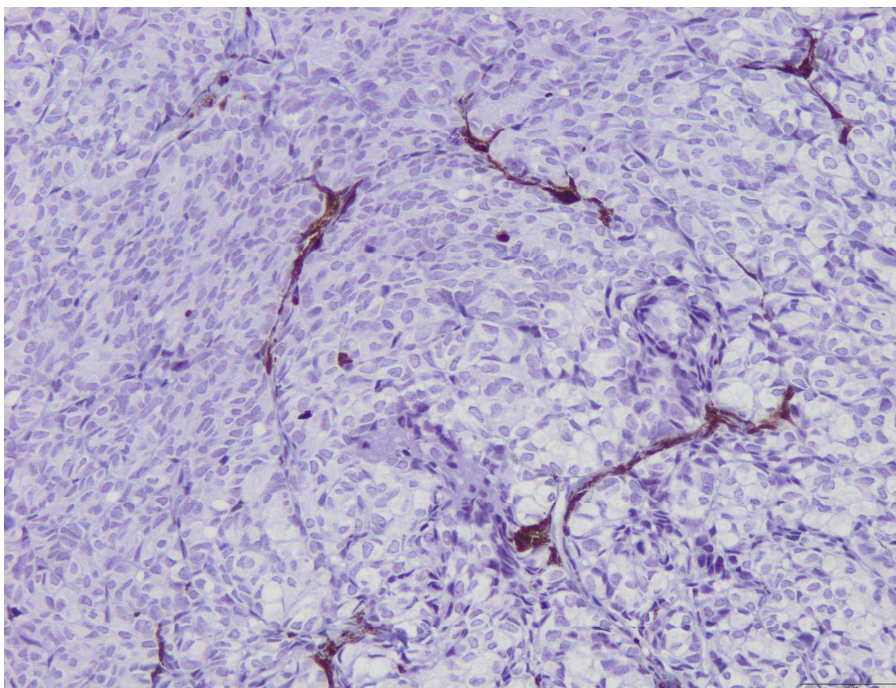


Figura 7. Glándula paratiroides de rata (20x). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Control negativo de técnica inmunohistoquímica para el receptor ObR. Se observa pigmento en células reticulares.

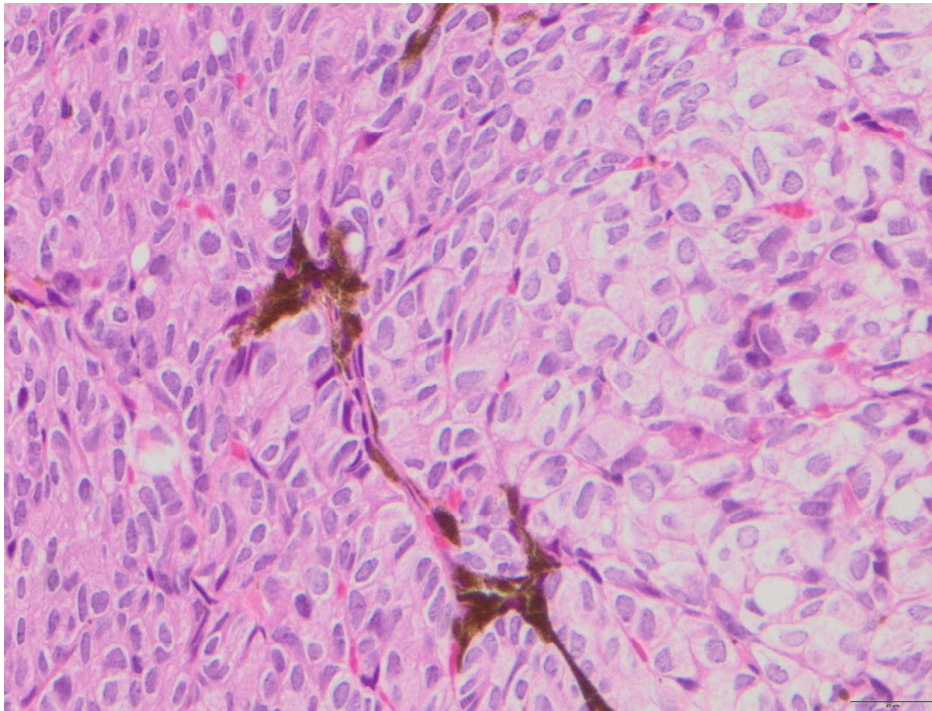


Figura 8. Glándula paratiroides de rata Zucker (40x). Tinción con hematoxilina y eosina. Detalle de la presencia de pigmento en las células reticulares.

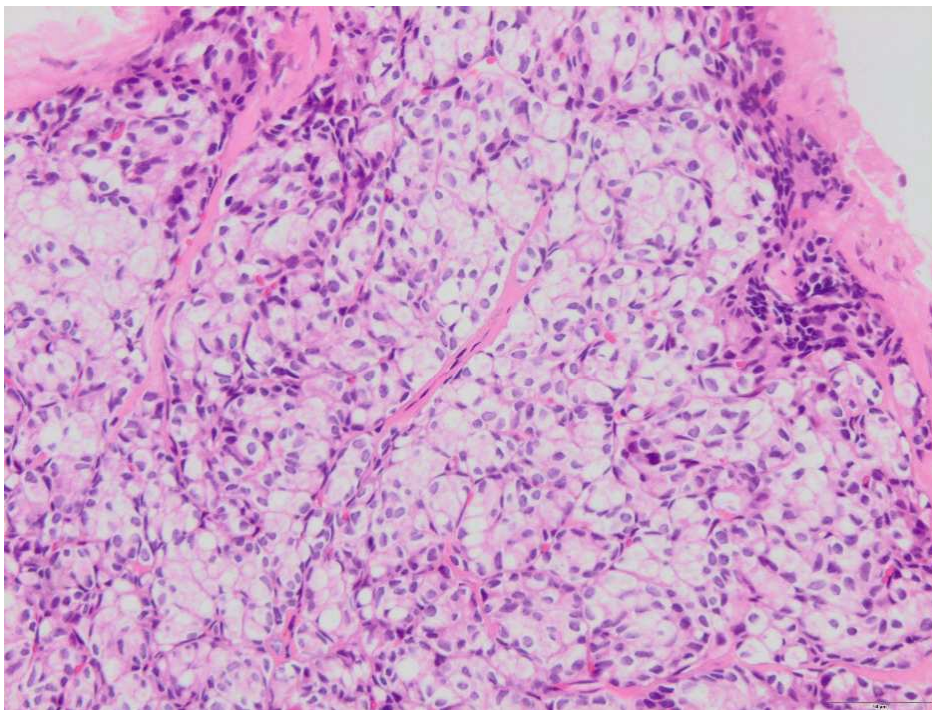


Figura 9. Glándula paratiroides de rata Zucker (20x). Tinción con hematoxilina y eosina. Se observa la arquitectura normal de la glándula paratiroides de las ratas.

Discusión

Este estudio se ha diseñado para demostrar la presencia y localización de receptores de leptina en la glándula paratiroides de las ratas. Los resultados obtenidos revelan que el receptor ObR se encuentra en esta glándula y se expresa en el citoplasma de las células principales paratiroides.

El objetivo planteado se fundamenta en el fin de establecer y dilucidar la relación existente entre el metabolismo energético y mineral a través de una conexión directa entre la leptina y la PTH.

La leptina es la principal hormona encargada de regular el metabolismo energético y con ello el apetito y la cantidad de grasa corporal de un individuo (Cheng *et al.* 2011, Patel *et al.* 2008, San Miguel *et al.* 2006). El principal tejido de secreción de leptina es el tejido adiposo, que actúa de órgano endocrino modulando la liberación de leptina a sangre (San Miguel *et al.* 2006). Igualmente, la principal vía de acción de esta adipoquina se encuentra en el hipotálamo, donde se une a los receptores específicos de leptina (ObR) regulando así la acción del centro del apetito y con ello la ingesta y balance energético (Cheng *et al.* 2011, San Miguel *et al.* 2006).

El receptor de leptina posee diferentes isoformas (Takaya *et al.* 1996). La isoforma larga (ObRb) se encuentra mayoritariamente en el hipotálamo (San Miguel *et al.* 2006, Takaya *et al.* 1996); sin embargo, las isoformas cortas se han localizado en un amplio número de tejidos y órganos tales como riñón, hígado, páncreas, hipófisis, cerebelo o pulmón (San Miguel *et al.* 2006). El conocimiento de ello ha llevado a la realización de estudios con el objetivo de localizar el receptor de leptina en aquellos tejidos en los que esta hormona parece intervenir en la funcionalidad propia del tejido en cuestión. Este es el caso de nuestro estudio, en el que la existencia de sucesivas publicaciones relacionando la acción de la leptina con el desarrollo de hiperparatiroidismo ha dado lugar a la necesidad de demostrar la existencia de un eje directo entre la adipoquina y la glándula paratiroides.

Sabiendo que la leptina tiene un papel de inhibición sobre el apetito, cabría esperar que en pacientes obesos esta hormona estuviera disminuida. Sin embargo, se encuentran niveles de leptina aumentados ligados a la obesidad (San Miguel *et al.* 2006). Además estos pacientes obesos también presentan un elevado índice de masa corporal, factor que se ha asociado directamente con una mayor predisposición a desarrollar hiperparatiroidismo (Bolland *et al.* 2005, Cheng *et al.* 2011, Hoang *et al.* 2013).

La existencia de receptores de PTH en tejido adiposo (Hoang *et al.* 2013, Taniguchi *et al.* 1987) respaldan la hipótesis de que el hiperparatiroidismo predispone al desarrollo de obesidad. De esta forma, el exceso continuado de PTH en pacientes hiperparatiroides se traduciría en la interacción de dicha hormona con su receptor en tejido adiposo, lo que

resultaría en la estimulación de los adipocitos con liberación de leptina estableciéndose un estado de hiperleptinemia y obesidad en estos pacientes (Hoang *et al.* 2013). No obstante, hay numerosos estudios que plantean que la leptina juega un papel importante no sólo durante el hiperparatiroidismo ya instaurado sino también en el estadio previo al desarrollo de esta enfermedad (Bolland *et al.* 2005). Estos trabajos van encaminados a explicar que la obesidad es un factor predisponente para el desarrollo de hiperparatiroidismo.

De acuerdo con estas publicaciones, pacientes con hiperparatiroidismo manifiestan hiperleptinemia y obesidad con la consecuente alteración del metabolismo energético (Ni *et al.* 1994). Además, cuando a estos pacientes se les realiza paratiroidectomía no sólo se corrigen los niveles de calcio sino también disminuyen los de leptina (Hoang *et al.*, 2014). En una situación similar, en pacientes obesos se ha observado una mayor predisposición al desarrollo de hiperparatiroidismo secundario al estatus de obesidad (Bolland *et al.* 2005). Además en pacientes obesos a los que se les hacía cirugía bariátrica se reducía la PTH (Grethen *et al.*, 2012).

Por otro lado, la relación de la leptina con la glándula paratiroides ha sido estudiada por diferentes autores que encontraron asociación directa de esta hormona con el metabolismo mineral y del calcio. En este sentido, se ha demostrado la existencia de una correlación positiva entre la leptina y los niveles de fosfatasa alcalina, como marcador de remodelación ósea, en individuos con hiperparatiroidismo (Cheng *et al.* 2011). En otro estudio Morioka *et al.* observaron que la administración de leptina en ratones normales producía un descenso de los niveles de calcio y de insulina mientras que en ratones modificados que no expresaban el receptor de leptina en páncreas, los niveles de calcio e insulina eran más altos.

Otros autores han observado que en ratones de fenotipo obeso, la propia obesidad puede actuar como factor protector frente a la osteoporosis (Matsunuma *et al.* 2004). A primera vista, esto se explica por la correlación positiva existente entre el aumento del peso y de la grasa corporal sobre la densidad mineral de los huesos. Sin embargo, en la misma línea de investigación, Stunes *et al.* en 2012 observaron que la densidad mineral ósea se mantenía en ratas normales cuando se les administraba leptina vía subcutánea a pesar de producirse un descenso en el peso de los animales. El análisis de ambos estudios sugieren que la relación existente entre obesidad y metabolismo mineral puede deberse a la intervención de la leptina.

En obesidad también se han encontrado niveles elevados de otros parámetros relacionados con la homeostasis del calcio como la 1,25-dihidroxitamina D₃ junto al incremento de PTH (Grethen *et al.*, 2012). Sin embargo, en algunos pacientes obesos los niveles de vitamina D₃ no se encuentran elevados sino disminuidos, hecho que fue objeto de estudio bajo la hipótesis de ser la causa del desarrollo de hiperparatiroidismo en pacientes obesos (Bolland *et al.* 2005). No obstante, Grethen *et al.* demostraron que el inicio de la enfermedad es independiente de los niveles de 1,25-dihidroxitamina D₃. Además, estos hallazgos también sugieren que el

hiperparatiroidismo podría ser causa del estado de hiperleptinemia que presentan algunos pacientes obesos.

Por tanto, teniendo en cuenta la información existente en la bibliografía y con el resultado de nuestro estudio donde se obtiene inmunorreacción positiva al receptor ObR en la glándula paratiroides, se puede establecer la existencia de un eje de acción directo de la leptina sobre la PTH a través de su receptor específico. Dicho de otro modo, con nuestros resultados se demuestra que el receptor de leptina se encuentra en la glándula paratiroides y podemos dar una posible explicación al estatus de obesidad que precede al desarrollo de hiperparatiroidismo. Así, la hiperleptinemia encontrada en pacientes obesos favorecería la interacción de esta adipoquina con sus receptores en glándula paratiroides estimulando la producción de PTH y predisponiendo, por tanto, al establecimiento de la enfermedad en pacientes obesos. El eje de actuación entre tejido adiposo y glándula paratiroides tal como exponemos daría lugar a un estado de desequilibrio continuado entre el metabolismo energético y mineral.

La elección de la rata como modelo para nuestro trabajo se basa en que el receptor ObR presenta la ventaja sobre otras especies animales en que la homología en la estructura de dicho receptor es de un 71% respecto de la especie humana y, al contrario que ocurre en ratones, las mutaciones no son frecuentes (San Miguel *et al*, 2006). Concretamente fueron preparaciones de la glándula paratiroides de ratas Zucker de fenotipo delgado. Las ratas Zucker son un modelo ideal para el estudio de la obesidad, y del comportamiento de la leptina en particular, diferenciándose dos fenotipos: rata Zucker *fatty* o fenotipo obeso y rata Zucker *lean* o fenotipo delgado. La diferencia entre ambos radica en la existencia de una mutación en el receptor de leptina en aquellas ratas de fenotipo obeso de forma que estos animales presentan resistencia a la acción de la leptina manifestándose en el desarrollo de obesidad. Esta mutación no se encuentra en ratas Zucker de fenotipo delgado, las cuales poseen el receptor de leptina intacto y funcional (Takaya *et al*, 1996).

Por otro lado, la particularidad de las ratas Zucker respecto a la presencia de pigmento en sus tejidos supone que el examen correcto de las preparaciones utilizadas como control negativo cobren gran importancia. En nuestra investigación, también se evaluaron las muestras con el examen histológico de la glándula bajo tinción con hematoxilina y eosina. La presencia de pigmento en las células reticulares puede llevar a error en la interpretación de las muestras positivas durante la evaluación inicial previa comparación de estas preparaciones con los controles negativos. Este hecho refuerza la necesidad indiscutible de reservar en todo procedimiento de inmunohistoquímica muestras del mismo tejido como control negativo de la técnica. Como consecuencia de este hallazgo encontrado en el desarrollo de nuestro estudio, merece destacar también la importancia de la elección de cortes histológicos similares en cuanto a profundidad y localización para que un resultado positivo pueda ser cotejado correctamente con su control. Esta reflexión nace del hecho de haber encontrado en nuestros resultados algunas preparaciones positivas con pigmento cuyos controles no lo tenían, dando

lugar a error, inicialmente, en la interpretación de los resultados. En estos casos, la única diferencia entre preparaciones positivas y controles era que pertenecían a cortes histológicos de diferente profundidad del bloque.

De igual modo, disponer de controles negativos permitió diferenciar si un resultado inicialmente catalogado como positivo correspondía realmente a la expresión del receptor de leptina o, por el contrario, si se debía a presencia de tinción de fondo de la preparación o incluso a un exceso en el tiempo de exposición al cromóforo durante el revelado. En ambos casos, tinción de fondo o quemado de la preparación, las muestras utilizadas como control negativo mostrarían el mismo patrón de tinción que las muestras sospechosas de ser positivas. En el caso opuesto, si el resultado es fruto de inmunorreacción positiva al receptor de leptina, sólo las muestras de examen manifestarían el resultado.

En nuestro estudio se han utilizado dos anticuerpos para poner de manifiesto el receptor de leptina en la glándula paratiroides en ratas: anticuerpo monoclonal de ratón y anticuerpo policlonal de cabra. No se obtuvieron resultados positivos en los experimentos realizados con anticuerpo monoclonal de ratón, ya sea en protocolos con pretratamiento de desenmascaramiento antigénico utilizando una solución de citrato sódico o sin él. El uso de diferentes concentraciones para dicho anticuerpo tampoco resultó en éxito.

En vista de los resultados negativos obtenidos en los intentos iniciales de la puesta a punto de la técnica y con la firme sospecha de la existencia de receptores de leptina en la paratiroides, surgió la necesidad de cambiar el diseño del experimento. Por tanto, aprovechando que el anticuerpo monoclonal de ratón se había agotado, se decidió comprar un anticuerpo diferente optando por el anticuerpo policlonal de cabra. No obstante, también se obtuvieron resultados negativos cuando se utilizó este anticuerpo tanto con un protocolo sin pretratamiento como con el uso citrato sódico. Dall'Aglio *et al* describieron en su trabajo en burros un protocolo con pretratamiento basado en el uso de una solución de ácido cítrico para manifestar el receptor ObR en glándula salival con anticuerpo policlonal de cabra. Aplicando el mismo protocolo sobre nuestras muestras conseguimos la expresión del receptor tanto en los tejidos de cerebro y cerebelo como en la glándula paratiroides. Este acontecimiento hace sospechar que el fracaso resultante con el anticuerpo monoclonal de ratón, probado inicialmente, pudiera deberse a una técnica inadecuada. Todos los protocolos descritos en la bibliografía para este anticuerpo se probaron aunque sin éxito. Sin embargo, en ninguno de los protocolos realizados con el anticuerpo monoclonal de ratón se utilizó ácido cítrico como pretratamiento de las muestras al no tener conocimiento de bibliografía que emplease esta metodología.

Por tanto, puesto que existen publicaciones en la que se utiliza anticuerpo monoclonal de ratón para marcar el receptor de leptina en otros tejidos y teniendo en cuenta que las especificaciones técnicas del anticuerpo aseguran su utilidad para experimentos en ratas y compatibilidad para realización de técnica inmunohistoquímica, sería interesante comprobar si

la inclusión de una solución de ácido cítrico en un protocolo con anticuerpo primario monoclonal de ratón pudiera resultar en inmunorreacción positiva al receptor de leptina.

La glándula paratiroides no comparte su estructura histológica en ratas y ratones respecto a otras especies como perros, gatos y humanos (Capen *et al.* 1989, Trier 1958). Puesto que nuestro estudio se desarrolla en tejidos procedentes de la glándula paratiroides de ratas y se conoce que la glándula paratiroides de otras especies se compone, además de las células principales, de un número variable de células oxifílicas, sería también interesante llevar a cabo otras investigaciones para evaluar la manifestación del receptor en la glándula paratiroides de estas especies.

Conclusiones

Este es el primer estudio que demuestra la presencia de receptores específicos de leptina en la glándula paratiroides, así como su localización en el citoplasma de las células principales que la conforman.

Este estudio permite dar una base científica a diferentes hipótesis existentes en la bibliografía que intentaban conectar el metabolismo energético y el metabolismo mineral, demostrando la existencia de un eje de acción directa entre leptina y hormona paratiroidea. En este sentido se comprueba que la relación directa entre leptina y PTH no sólo se debe a la existencia de receptores de parathormona en los adipocitos sino también a la presencia de receptores de leptina en la glándula paratiroides.

Bibliografía

Bolland MJ, Grey AB, Gamble GD, Reid IR. (2005). Association between primary hyperparathyroidism and increased body weight: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(3):1525-30. Epub 2004 Dec 21.

Capen, C. C. and Rosol, T. J. (1989). Recent advances in the structure and function of the parathyroid gland in animals and the effects of xenobiotics. *Toxicol Pathol.* 17(2):333-45.

Cheng SP, Doherty GM, Chang YC, Liu CL. (2011). Leptin: the link between overweight and primary hyperparathyroidism?. *Med Hypotheses.* 76(1):94-6. doi: 10.1016/j.mehy.2010.08.039. Epub 2010 Sep 9.

Couce ME, Burguera B, Parisi JE, Jensen MD, Lloyd RV. (1997). Localization of leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology.* Sep;66(3):145-50.

Dall'Aglio C, Bazzucchi C, Mercati F, Ceccarelli P (2015). Presence and distribution of leptin and its receptor in the minor salivary glands of the donkey. *Acta Histochemica* 117;305–308.

Grethen E, Hill KM, Jones R, Cacucci BM, Gupta CE, Acton A, Considine RV & Peacock M. (2012). Serum leptin, parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D, fibroblast growth factor 23, bone alkaline phosphatase, and sclerostin relationships in obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 1655-1662.

Hoang D, MD, Niclas Broer, MD, Sanziana A. Roman, MD, FACS, Xiaopan Yao, PhD, Nathalie Abitbol, BS, Fangyong Li, MPH, Julie A. Sosa, MD, FACS, Gloria R. Sue, MA, Andrew T. DeWan, PhD, Ma-Li Wong, MD, FRANZCP, Julio Licinio, MD, FRANZCP, Christine Simpson, MS, Alexander Y. Li, BS, Nicole Pizzoferrato, BS, Deepak Narayan, MD. (2013). Leptin Signaling and Hyperparathyroidism: Clinical and Genetic Associations. *Journal of the American College of Surgeons* 218 1239-1250. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.11.013.

Larsson, Hans-Olov. (1984). *Quantitative Morphological Studies of the Parathyroid Gland.* Umeå University medical dissertations, New Series, No 114; ISSN 0346-6612.

Matsunuma A1, Kawane T, Maeda T, Hamada S, Horiuchi N.. (2004). Leptin corrects increased gene expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1-alpha-hydroxylase and -24-hydroxylase in leptin-deficient, ob/ob mice. *Endocrinology.* Marzo 2004; 145(3):1367-75.

Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN. (2007). Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest.* 117(10):2860-8.

Ni Z, Smogorzewski M & Massry SG. (1994) Effects of parathyroid hormone on cytosolic calcium of rat adipocytes. *Endocrinology* 135 1837-1844.

Patel, J., & Ebenezer, I. (2008). The effect of intraperitoneal administration of leptin on short-term food intake in rats. *European Journal of Pharmacology*, 480(1-2), 142-153. 10.1016/j.ejphar.2007.10.046.

Rosof, J. A. (1934), An experimental study of the histology and cytology of the parathyroid glands in the albino rat. *J. Exp. Zool.*, 68: 121–165. doi: 10.1002/jez.1400680105.

San Miguel A , del Campo F, Mazón M.A, Alonso N, Calvo B, Martín-Gil F.J, Aguado P, Arranz M.L. (2006). Estructura, funciones e importancia clínica de la leptina. *Química Clínica* 2006; 25 (1) 5-9.

Shioda S, Funahashi H, Nakajo S, Yada T, Maruta O, Nakai Y. (1998). Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett.* Feb 27;243(1-3):41-4.

Stunes AK, Westbroek I, Gordeladze JO, Gustafsson BI, Reseland JE, Syversen U. (2012). Systemic leptin administration in supraphysiological doses maintains bone mineral density and mechanical strength despite significant weight loss. *Endocrinology.* Mayo 2012;153(5):2245-53. doi: 10.1210/en.2011-1848.

Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Nakao K. (1996). Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 5;225(1):75-83.

Taniguchi A, Kataoka K, Kono T, Oseko F, Okuda H, Nagata I, Imura H. (1987). Parathyroid hormone-induced lipolysis in human adipose tissue. *J Lipid Res.* 28(5):490-4.

Trier, J. S. (1958). The Fine Structure of the Parathyroid Gland. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 4(1), 13–22.

Abstract

The parathyroid gland is an endocrine gland involved in calcium homeostasis through the production of parathyroid hormone (PTH). The relationship between leptin and PTH levels in obesity and hyperparathyroidism suggests the presence of leptin receptors in the parathyroid gland. Leptin is an adipokine whose main function is the regulation of energy metabolism. Leptin receptor is localized in different organs including hypothalamus and cerebellum. The aim of this study was to demonstrate the presence and localization of the leptin receptor in the parathyroid gland. Parathyroid gland samples from two Zucker rats were used. Samples were fixed and processed for immunohistochemistry using primary and secondary antibody. Brain samples and cerebellum samples were used as positive controls, and negative controls for all tissues were established. Leptin receptor expressed positive immunoreaction in the cytoplasm of the chief cells of parathyroid gland. These results demonstrate a direct connection between leptin and parathyroid hormone and suggest a link between energy metabolism and mineral metabolism. The development of chronic hyperparathyroidism during the obesity status, according to these results could be explained for the action of leptin on its receptors in the parathyroid gland.

Key words: leptin receptor, parathyroid gland, leptin, PTH, hyperparathyroidism.

Agradecimientos

Al Prof. Dr. Ignacio López Villalba, como tutor de la presente memoria, por confiar en mí para llevar a cabo la elaboración de este trabajo de investigación.

A la Prof. Dra. Ana Isabel Raya Bermúdez, por su apoyo y guía, por prestarme su conocimiento sobre la materia.

Al Instituto Maimónides de Investigación Biomédica (IMIBIC), por permitirme entrar en sus instalaciones para el desarrollo del presente trabajo.

Al departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Córdoba.