



Universidad de Sevilla

Departamento de Citología e Histología

Normal y Patológica

**Análisis de la contribución de los
restos ultimobranquiales a la
glándula tiroidea: Estudio
morfológico e inmunohistoquímico**

Victoria Vázquez Román

**Tesis Doctoral
Sevilla, 2015**



**Citología e Histología Normal
Y Patológica**

Doña Inés Martín Lacave, Catedrática de Histología y **Don José Carmelo Utrilla Alcolea** Profesor titular de Histología, pertenecientes al Departamento de Citología e Histología normal y patológica, de la facultad de Medicina, de la universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “ **ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS RESTOS ULTIMOBRANQUIALES A LA GLÁNDULA TIROIDEA: ESTUDIO MORFOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO**”, presentada por María Victoria Vázquez Román, licenciada en Farmacia, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo su dirección y en el departamento de Citología e Histología normal y patológica.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en Sevilla a 24 de Septiembre de 2015.

Fdo: Inés Martín Lacave

Fdo: José Carmelo Utrilla Alcolea

La ciencia tiene una característica maravillosa, y es que aprende de sus errores, que utiliza sus equivocaciones para reexaminar los problemas y volver a intentar resolverlos, cada vez por nuevos caminos.

Ruy Pérez Tamayo (Médico patólogo, inmunólogo e investigador).

AGRADECIMIENTOS

Según José Ortega y Gasset, cada uno de nosotros somos lo que somos y nuestras circunstancias, y son estas circunstancias las que me llevaron a comenzar este proyecto que, como todo proyecto importante, ha tenido su desarrollo durante unos años en los que hemos ido evolucionando conjuntamente, tanto el proyecto como yo misma. En el año 2011 tuve la oportunidad de ocupar una plaza de profesora asociada en el área de Histología del departamento y gracias a la Dra. Inés Martín Lacave, comencé la investigación sobre los restos ultimobranquiales en el tiroides, que se convirtió en mi proyecto de tesis doctoral. Desde entonces hasta ahora han sido muchas las personas que me han ayudado y facilitado el camino y a las que estoy muy agradecida.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a Inés Martín Lacave, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y de formar parte de su grupo de investigación. Trabajar al lado de una persona con una trayectoria profesional como la suya, ha sido un privilegio, pero sobre todo quiero destacar su gran calidad humana. Gracias por tu paciencia, por tu comprensión, por hacer las cosas tan fáciles, por tantas veces que has dado prioridad a las circunstancias personales, por compartir conmigo tantos conocimientos y por transmitirme la ilusión con la que afrontas cada proyecto. Por todo esto y por tu amistad, gracias Inés.

A Pepe Utrilla le quiero agradecer sobre todo su generosidad, por compartir conmigo una de las pocas cosas que no compartíamos ya, el lugar de trabajo. De nuevo las circunstancias de la vida nos llevan a lugares que no nos habíamos planteado ir y, aunque hemos intentado mantenernos cada uno en nuestro camino, no han sido pocas las veces que he sentido estar invadiendo una faceta tan propia como es la laboral. Para mí ha sido enriquecedor ver tu constancia y meticulosidad en todo lo que te propones. Gracias por enseñarme las técnicas inmunohistoquímicas y lo que es hacer el trabajo bien hecho de principio a fin.

A José M^a Fernández Santos, Carmen Garnacho y Amparo Gómez. Aunque la amistad con José M^a es anterior, he tenido la oportunidad de conocerlo en otro ámbito y de disfrutar con su forma tan particular de ver las cosas. Muchas gracias por tus consejos histológicos e informáticos, y por estar ahí siempre que te he necesitado. A mi

compañera de despacho, Carmen, que siempre está dispuesta a ayudarme en cualquier cosa y a la que valoro muchísimo personal y profesionalmente. Gracias por compartir conmigo tus conocimientos y sobre todo por tu amistad. A Amparo, por ser tan humana y por su sentido del humor con el que siempre te consigues arrancar una sonrisa. Entiendo que vuestros alumnos os estimen y valoren tanto.

Al resto de profesores del área de histología, Ana Fernández, Ana Moreno y Manolo de Miguel, por la confianza que han puesto en mí durante todo este tiempo que llevo impartiendo las prácticas de histología, sois un referente y un estímulo para seguir aprendiendo. Para mí es un placer participar de esta pequeña familia de histólogos.

Y continúo dando las gracias a los que junto con los compañeros de otras áreas, forman la familia del departamento, Manolo Castrillo, Rosa, Auxi, Ana Mayoral, Loli (que sigue visitándonos de vez en cuando), porque han estado siempre dispuestos a ayudarme en lo que he necesitado, de forma amable y cariñosa. Muchas gracias.

Gracias a Jesús, a Flora y a Rocío, compañeros de grupo de investigación con los que he compartido muchos momentos, de los que también he aprendido y que me han ayudado desinteresadamente.

Tampoco quiero olvidarme de dar las gracias a Inés Carmona y a María José Ríos, que fueron las que me guiaron en mis comienzos como profesora, compartiendo conmigo todos sus conocimientos y su forma de dar las prácticas. Gracias de corazón.

Y volviendo a las circunstancias personales, soy lo que soy gracias a mi familia y sin ella no podría haber realizado este recorrido. Para mis padres siempre fue una prioridad nuestra educación y formación, y nunca podré agradecerles su generosidad infinita. Ojalá yo sepa hacer las cosas tan bien como ellos. A mi hermana Mili, por su apoyo incondicional y por creer en mí más que yo misma, creo que ya no me quedan días para devolverte tantos favores como me has hecho. A mis hijos, Javier y Victoria, por entender mi falta de tiempo para estar con ellos y por darme la oportunidad de disfrutarlos cada día. Y por último, a mi marido, por su apoyo constante, gracias por acompañarme en mis momentos buenos, y animarme en los malos, sin ti no lo habría conseguido.

Muchas gracias. Viti

A mis padres y hermanos

A Pepe, Javier y Victoria

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN

1.- GLÁNDULA TIROIDEA.....	1
1.1. Estructura histológica general.....	1
1.2. Componentes epiteliales.....	2
1.2.1. Células foliculares.....	3
1.2.2. Células C o parafoliculares.....	8
1.2.3. Restos ultimobranquiales (UB)	16
2.- DESARROLLO EMBRIONARIO DEL TIROIDES.....	17
2.1. Generalidades.....	17
2.2. Organogénesis.....	19
2.3.- Histogénesis.....	21
2.3.1. Histogénesis de las células foliculares.....	21
2.3.2. Histogénesis del cuerpo UB y de las células C.....	22
2.3.3. Peculiaridades del desarrollo tiroideo en distintas especies de vertebrados.....	24
2.4. Factores de transcripción tiroideos.....	25
2.4.1. Factores de transcripción implicados en el desarrollo del tiroides y del Cuerpo UB.....	25
2.4.2. Otros factores y vías de señalización que influyen en el desarrollo del tiroides.....	28
2.5. Origen embrionario de las células C.....	30
2.5.1. Teoría clásica: origen en las crestas neurales.....	30
2.5.2. Teoría del origen ectodérmico	31
2.5.3. Teoría actual: origen endodérmico.....	32
3.- RESTOS ULTIMOBRANQUIALES.....	34
3.1. En roedores: folículos UB (FUB).....	35
3.1.1. Localización.....	35

3.1.2. Morfología.....	36
3.1.3. Características ultraestructurales	38
3.1.4. Incidencia.....	39
3.2. En humanos: <i>Solid cell Nest</i> (SCN).....	40
3.2.1. Localización.....	40
3.2.2. Morfología.....	40
3.2.3. Características ultraestructurales.....	42
3.2.4. Frecuencia.....	42
3.3. En otras especies de mamíferos.....	42
3.3.1. En el perro: “complejo de células C”	42
3.3.2. En toros: “remanentes UB”	43
3.3.3. En el bisonte: “remanentes UB”	43
3.3.4. En el zorro: “folículos inusuales”	43
3.3.5. En la cobaya: “S follicles”	44
3.4. En vertebrados no mamíferos.....	44
3.5. Marcadores inmunohistoquímicos (IHQ) de los restos UB.....	45
3.5.1. Marcadores IHQ de los FUB.....	45
3.5.2. Marcadores IHQ de los SCN.....	45
3.6. Patología tiroidea asociada a los restos UB	47
4.-CÉLULAS MADRES.....	49
4.1. Tipos de células madres.....	49
4.2. Células madres en el tiroides.....	52
4.3. Marcadores IHQ de las células madres en el tiroides.....	54
 <u>II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</u>	
1.-PLANTEAMIENTO DEL TEMA.....	59
2.-OBJETIVOS.....	60

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- ANIMALES EXPERIMENTALES.....	65
2.- FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	65
3.- ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	65
3.1. Material.....	65
3.2. Metodología.....	66
3.3. Análisis estadístico.....	67
4.- ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO Y DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	67
4.1. Análisis IHQ.....	67
4.1.1. Material.....	67
4.1.2. Anticuerpos.....	68
4.1.3. Método IHQ.....	69
4.2. Doble marcaje mediante IHQ.....	73
4.2.1. Material.....	73
4.2.2. Metodología.....	73
4.3. Doble marcaje mediante inmunofluorescencia (IF).....	75
4.3.1. Material.....	76
4.3.2. Metodología.....	76

IV. RESULTADOS

1.-ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	81
1.1. Localización de los FUB en el tiroides.....	81
1.2. Morfología de los FUB en las distintas edades.....	82
1.3. Relación de los FUB con las células endocrinas tiroideas.....	88
1.4. Incidencia de los FUB.....	89
2.-ANÁLISIS IHQ.....	89
2.1. Nidos sólidos celulares.....	89
2.2. FUB inmaduros.....	92

2.3. FUB maduros.....	94
2.4. Cistoadenomas UB.....	95
2.5. Identificación de células endocrinas en la pared de los FUB.....	99
2.6. Anomalías en el desarrollo del CUB.....	100
3.- DOBLE IHQ.....	101
3.1. Doble IHQ para p63 y CT.....	101
3.2. Doble IHQ para p63 y Tg.....	104
4.- DOBLE IF.....	106
4.1. Doble IF en los restos UB sólidos.....	107
4.2. Doble IF en los “FUB inmaduros”	108
4.3. Doble IF en los “FUB maduros”	109
<u>V. DISCUSIÓN</u>.....	113
<u>VI. CONCLUSIONES</u>.....	135
<u>VII. BIBLIOGRAFÍA</u>.....	139
<u>VIII. ANEXOS</u>	
ANEXO 1.- Índice de abreviaturas	
ANEXO 2.- Publicaciones relacionadas	

I.INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.- GLÁNDULA TIROIDEA

1.1. Estructura histológica general

La **glándula tiroidea** es un órgano endocrino cuya función es indispensable para el crecimiento y el desarrollo normales ya que produce, principalmente, las hormonas tiroideas encargadas de regular el metabolismo basal. Se encuentra situada en la base del cuello, junto al cartílago tiroides de la laringe y en posición anterior a la tráquea, entre el segundo y tercer anillos traqueales en humanos y el cuarto-quinto en la rata.

El tiroides tiene forma de mariposa y consta de dos lóbulos laterales que se sitúan a ambos lados de la tráquea, que en humanos miden alrededor de 5cm de longitud cada uno, 2,5 cm de ancho y pesan entre 20 a 30 g (Diéguez 2007). En la rata, la longitud media del lóbulo tiroideo es de 2,07 mm y el peso medio de la glándula se va incrementando a lo largo de su vida ($21,8 \pm 4.0$ mg a $46,5 \pm 19,05$ mg en machos y $17,2 \pm 4,53$ mg a $41,7 \pm 26,92$ mg en ratas hembras)(Rao-Rupanagudi S Gopinath C. 1992; Pfeffer et al. 1999). Los lóbulos tiroideos están unidos mediante una porción de tejido situada en posición anterior denominada istmo que, frecuentemente, puede originar un tercer lóbulo, el lóbulo piramidal o medio (figura 1).

La glándula está rodeada por una fina cápsula de tejido conjuntivo que envía tabiques hacia el interior del parénquima, dividiéndola en lobulillos incompletos (Ross 2012; Welsch 2009)

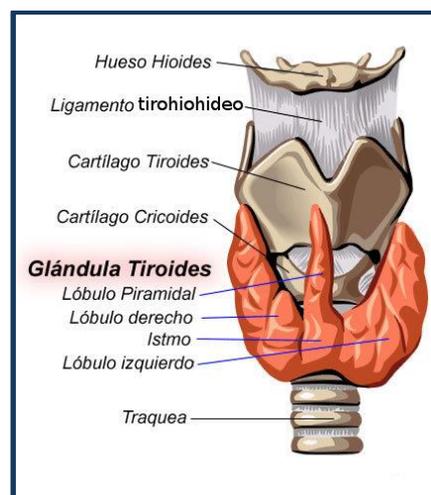


Figura 1.- Representación esquemática de la posición y anatomía del tiroides humano (Richard L. Drake, Adam M.W. Mitchell, 2015).

El tiroides es un órgano muy vascularizado pues está irrigado por las arterias tiroideas superiores e inferiores y presenta una extensa red capilar de tipo fenestrado, que se dispone en plexos profundos que facilitan el tránsito de las hormonas tiroideas hacia la luz del capilar. El drenaje venoso se realiza mediante abundantes plexos vasculares que desde la superficie lateral y medial de los lóbulos originan las venas tiroideas superior, media e inferior. A esta red capilar se une una abundante red de capilares linfáticos situados alrededor de los folículos.

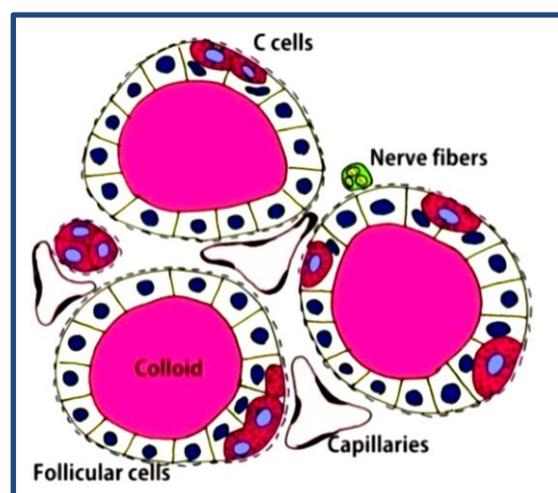
El sistema nervioso simpático (SNS) interviene en la regulación de la función tiroidea mediante un mecanismo de control nervioso, junto con el eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo (HHT) que constituye la regulación principal.

1.2. Componentes epiteliales

El **folículo tiroideo** es la unidad estructural y funcional de la glándula tiroidea. Centenares de miles de folículos, cuyo diámetro varía de 0.2 a 1 mm, forman casi toda la masa de la glándula tiroidea humana. Los folículos constituyen una estructura única entre las glándulas endocrinas, ya que en la luz folicular almacenan el complejo glucoproteico cuyo componente principal es la tiroglobulina (Tg), que es una forma inactiva de almacenamiento de las hormonas tiroideas. La Tg muestra apariencia viscosa, eosinofilia y es PAS+.

Se trata de un compartimento de aspecto quístico más o menos esférico, que tiene una pared formada por un epitelio simple cúbico o cilíndrico bajo, el epitelio folicular, que descansa sobre una delgada lámina basal, y contiene una luz rellena de coloide, la luz folicular (figura 2). En el espacio interfolicular se observan abundantes capilares sanguíneos y linfáticos, además de fibroblastos dispersos, fibras de colágeno, linfocitos, plasmocitos y células cebadas o mastocitos que, en roedores, son grandes y poliédricas con numerosos gránulos secretores.

Figura 2.-Diagrama esquemático de los componentes histológicos de la glándula tiroidea normal (Fernandez-Santos JM et al, 2012).



El tamaño de los folículos tiroideos y de las células foliculares que lo revisten depende del estado funcional de la glándula. Así, los folículos más activos presentan un tamaño menor, con un coloide disminuido y menos denso, y las células foliculares que lo revisten presentan una morfología cúbica o cilíndrica. En cambio, los folículos con una menor actividad, se caracterizan por tener un tamaño mayor, con una gran cantidad de coloide y revestidos por células epiteliales planas. Al menos en roedores, los folículos más activos se encuentran habitualmente en el área central del lóbulo tiroideo, mientras que los menos activos se sitúan en la periferia del mismo (figura 3) (Barbier et al. 1976; Hartoft-Nielsen et al. 2005).

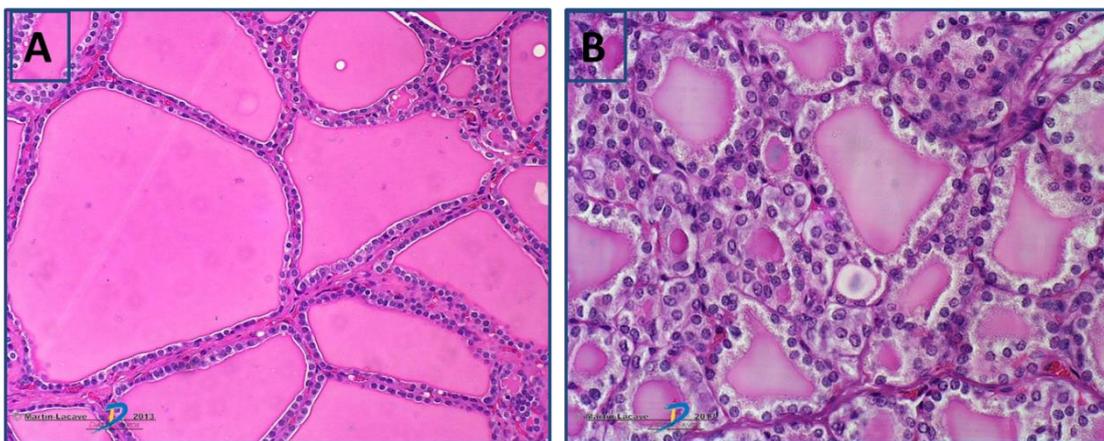


Figura 3.- Microfotografía de la glándula tiroidea. Corte teñido con H-E de los folículos tiroideos. Cada folículo consiste en una simple capa de células epiteliales que rodean una masa central de coloide. Se observan folículos de diversos tamaños. A) Tiroides humano; B) Tiroides de rata (Martín-Lacave, 2014).

El parénquima tiroideo está compuesto principalmente por tres tipos de células: las células foliculares, las células C o parafoliculares y los restos ultimobranquiales (UB), que van a describirse seguidamente.

1.2.1. Células foliculares

Las células foliculares o tirocitos constituyen el componente epitelial mayoritario de la glándula tiroidea. Tienen a su cargo la producción de las hormonas tiroideas triyodotironina (T_3) y tetrayodotironina o tiroxina (T_4). La organización en folículos, hace que el tirocito guarde una clara polaridad, con su polo basal descansando sobre la membrana basal y su polo apical orientado hacia la luz folicular. Con Hematoxilina-Eosina (H-E) exhiben un citoplasma basófilo pálido y un núcleo esferoidal con nucléolo prominente. Con las técnicas de coloración adecuadas, se pueden identificar inclusiones lipídicas y vesículas PAS positivas.

Ultraestructuralmente, se aprecian los orgánulos que se asocian a su vez a las células secretoras y absorptivas, complejos de unión y desmosomas en las zonas lateroapicales, así como microvellosidades cortas en su porción apical. En la región celular basal, hay gran abundancia de retículo endoplasmático rugoso (RER), mientras que el aparato de Golgi ocupa una posición perinuclear. Las mitocondrias son abundantes y se encuentran distribuidas por todo el citoplasma con formas y tamaños variables. En el citoplasma supranuclear se observan vesículas electrodensas que contienen Tg, fagosomas o gotas de coloide dirigidas hacia la luz folicular, así como lisosomas que descienden hacia la porción basal y transportan las hormonas tiroideas (figura 4) (Murakami & Uchiyama 1986).

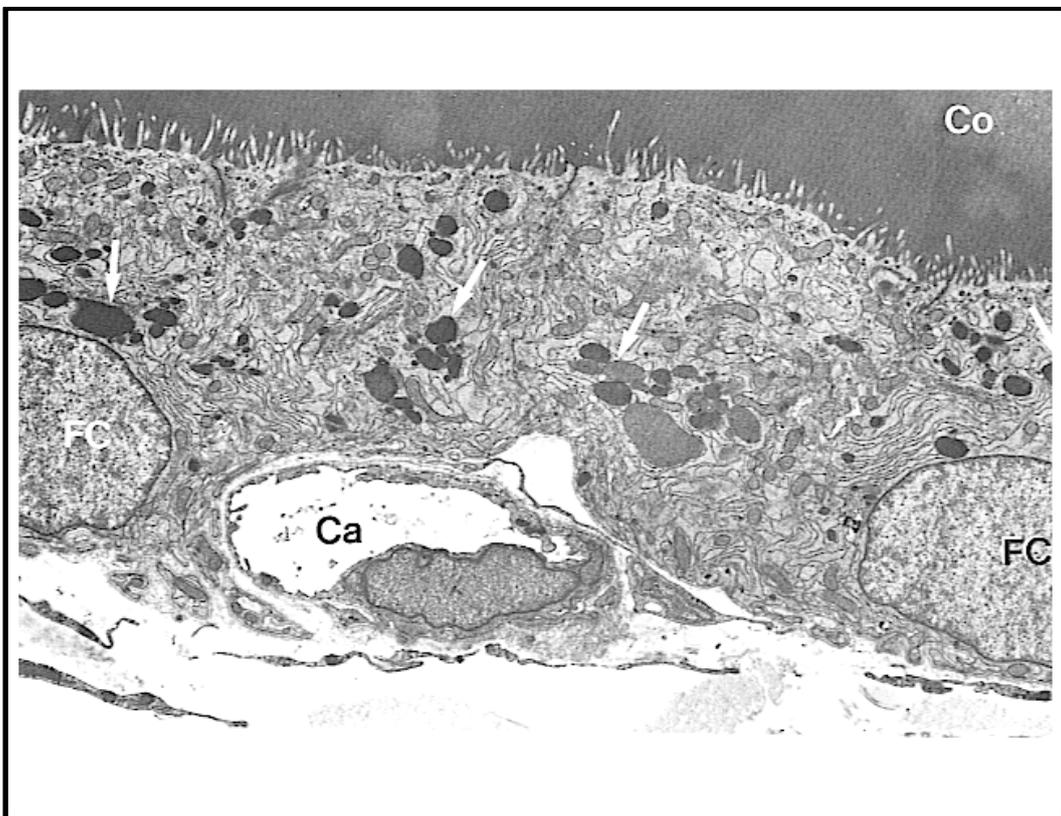


Figura 4.- Electromicrografía de tiroides. Se muestra parte de un folículo tiroideo con células foliculares (FC); Se observa un capilar sanguíneo (Ca) y vesículas electrodensas de Tg (flechas); Coloide (Co) (Wagner & Soler.Univ.Delaware 2013).

Síntesis de las hormonas tiroideas

Como se ha indicado, las células foliculares son las encargadas de producir Tg, una glucoproteína a partir de la que se sintetizan las hormonas tiroideas activas. A la Tg se va a incorporar yodo formando una yodoproteína, que va a constituir la forma de almacenamiento extracelular de las hormonas tiroideas a nivel de la luz folicular.

El proceso de biosíntesis de las hormonas tiroideas consta de las siguientes fases:

1) Captación de yodo

La entrada de yoduro en el tirocito se realiza a través de la membrana basolateral, mediante un mecanismo de transporte activo que está mediado por una glucoproteína transportadora denominada **NIS (Na^+/I^- symporter)**. La regulación de NIS depende de la hormona estimulante del tiroides o tirotropina (TSH) que, mediante un mecanismo específico del tiroides en el que interviene cAMP, estimula la expresión del gen NIS. Por otro lado, la TSH regula la captación de yodo mediando en la distribución subcelular de NIS (Riedel et al. 2001). También existe un mecanismo de regulación negativa de la expresión de NIS cuando la concentración plasmática de yoduro es elevada (figura 5).

2) Organificación del yodo

El paso de yoduro (I^-) hacia la luz folicular se lleva a cabo mediante transportadores como la pendrina (Reardon, Trembath 1996), a través de la membrana apical de la célula folicular. El I^- en el lumen va a sufrir un proceso de oxidación e incorporación a la molécula de Tg. Esta reacción es catalizada por la enzima tiroperoxidasa (TPO), que se encuentra en la membrana apical del tirocito y es dependiente de H_2O_2 , que devuelve la TPO a su estado oxidado (Larsen PR 2004; Ross 2012). La TSH estimula la producción de H_2O_2 , así como la oxidación e incorporación de yoduro a la molécula de Tg.

3) Síntesis de tiroglobulina

La Tg, es una glucoproteína sintetizada exclusivamente por las células foliculares y que se almacena en el coloide del folículo tiroideo. Se sintetiza en los polirribosomas del RER. Posteriormente, pasa a las cisternas del aparato de Golgi y es glucosilada progresivamente en vesículas de secreción y liberada a la luz folicular por exocitosis.

La regulación de la expresión de Tg es llevada a cabo, principalmente, por la TSH, aunque se ha visto que también intervienen el factor de crecimiento para la insulina IGF-1 (*insuline growth factor-1*) y la insulina, que aumentan considerablemente los niveles de mRNA de Tg (Santisteban et al. 1987).

4) Yodación de la tirosina

La yodación de la tirosina ocurre a nivel del coloide, en la interfase con las microvellosidades de las células foliculares y también es catalizada por la TPO. La adición de un átomo de yodo a un solo residuo de tirosina forma una monoyodotirosina (MIT), y la adición de un segundo átomo de yodo al residuo de MIT forma un residuo de diyodotirosina (DIT).

5) Formación y almacenamiento de T_3 y T_4

Las hormonas tiroideas T_3 y T_4 se forman por reacciones de acoplamiento oxidativo de dos residuos de tirosina yodados muy cercanos. Así, dos DIT formarán la T_4 , y el acoplamiento de MIT y DIT dará lugar a la T_3 , quedando unidas al resto de la molécula de Tg, que se almacena en la luz folicular.

6) Reabsorción del coloide

Como se ha mencionado anteriormente, la cantidad y el tamaño del coloide van a estar directamente relacionados con la actividad de la glándula. En respuesta a la TSH, las células foliculares captan Tg del coloide por un proceso de endocitosis mediado por receptores. En la porción apical de las células foliculares se forman vesículas de reabsorción del coloide, que gradualmente migran hacia la región celular basal donde se fusionan con los lisosomas, en los que serán sometidas a la acción de las enzimas hidrolíticas que liberarán las hormonas tiroideas.

7) Liberación de T_3 y T_4 en la sangre y reciclaje de las hormonas tiroideas

La T_3 y T_4 atraviesan la membrana basal y se introducen en los capilares sanguíneos y linfáticos circundantes. La mayoría de las hormonas liberadas se unen a la proteína fijadora de tiroxina, y sólo queda una pequeña proporción de hormonas circulantes libres que son metabólicamente activas (Marinò & McCluskey 2000a; Marinò & McCluskey 2000b). Una vez desacopladas de la Tg, las moléculas de DIT y de MIT se desyodan en el citoplasma de las células foliculares para liberar el aminoácido tirosina y el yodo, que quedan disponibles para su reciclaje.

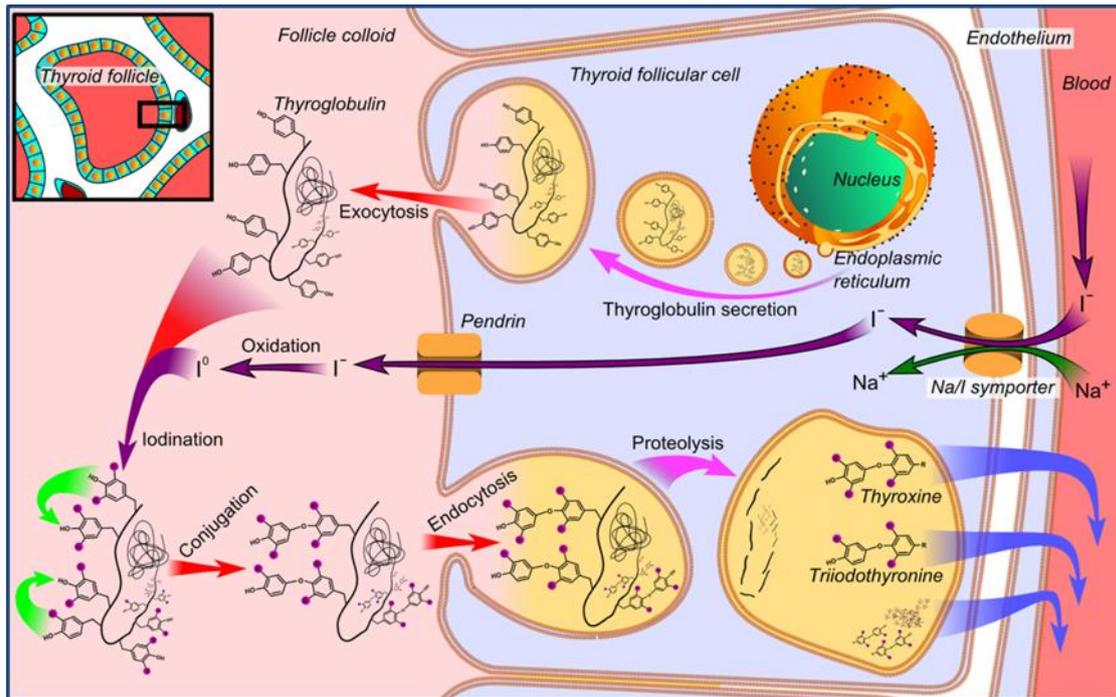


Figura 5.- Representación esquemática de la biosíntesis de las hormonas tiroideas en una célula folicular (Walter, 2003).

Regulación de la actividad de las células foliculares

La función tiroidea está regulada, principalmente, por el **eje neuroendocrino** constituido por el **hipotálamo, la hipófisis anterior y el propio tiroides (HHT)**, junto a sus mecanismos de retroalimentación negativa. En la regulación de la función tiroidea van a participar, por tanto, la TRH, la TSH, y las propias hormonas tiroideas.

La **TRH** (*thyrotropin releasing hormone*) es una hormona producida en el hipotálamo que regula la producción de hormonas tiroideas, ya que induce la secreción de TSH mediante la unión a su receptor TRH-R, que se localiza en la membrana plasmática de las células tirotróficas de la adenohipófisis.

La **TSH** es el principal factor regulador de la función tiroidea. Actúa estimulando el desarrollo de la glándula, así como la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas. La acción de la TSH, depende de la interacción entre los efectos estimuladores de la TRH hipotalámica y los inhibidores de **las hormonas tiroideas T₃ y T₄**, que ejercen un mecanismo de retrocontrol negativo, inhibiendo la síntesis y liberación de la TSH (figura 6).

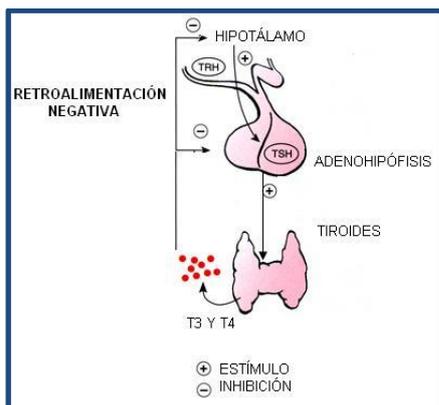


Figura 6.- Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides. TRH: hormona liberadora de TSH; TSH: tirotropina; T₃ y T₄: hormonas tiroideas (Ross-Pawlina, 2013)

1.2.2. Células C o parafoliculares

Las **células C** constituyen el segundo tipo de células endocrinas del tiroides. Se encuentran en un número bastante inferior al de las células foliculares. Se denominan células C por ser las principales productoras y secretoras de la hormona polipeptídica calcitonina (CT), el antagonista fisiológico de la paratohormona. La CT, promueve la incorporación del calcio en los huesos y disminuye la calcemia, sobre todo por inhibición de los osteoclastos y estimulación de la eliminación renal del calcio. Las células C reciben también el nombre de “células parafoliculares” porque, normalmente, se localizan entre el epitelio folicular y la lámina basal del folículo tiroideo en “posición parafolicular”, aunque en ocasiones, como ocurre en las ratas, ocupan también una posición interfolicular, pero nunca alcanzan el coloide (Monsour et al. 1985; Pearse 1966).

En **mamíferos** como el hombre, la rata y el conejo, se localizan en la región central de cada lóbulo tiroideo, a la que se le ha dado por ello el nombre de “**área de células C**”, siendo esta zona donde se encuentran los folículos tiroideos más activos. En otras especies, como en el gato y la cobaya, también pueden detectarse células C en otros órganos, como paratiroides o timo (Y Kameda 1971).

Al igual que ocurre con la posición, la proporción de células C con respecto al total de las células endocrinas varía entre las diferentes especies, alcanzándose un porcentaje medio del 5% en la rata y sólo de menos del 0.1% en el hombre. La variación de la frecuencia de las células C con respecto a la edad, es un dato contradictorio en el hombre, sin embargo, en roedores, parece claro que el número de células C aumenta con la edad (Conde et al. 1995).

En las tinciones rutinarias con H-E, **las células C no son fáciles de identificar** debido a que su citoplasma se tiñe muy débilmente. Mediante técnicas específicas, se han podido observar las características microscópicas de estas células. Las células C, tanto de rata como humanas, son generalmente de un tamaño mayor que las células

foliculares, observándose un aumento de su volumen durante el desarrollo postnatal. Presentan formas variables, redondeadas, ovaladas o fusiformes, aunque normalmente son poliédricas. Su núcleo ocupa una posición central, siendo algo mayor que el de las células foliculares, pero lo más típico es la presencia de numerosos gránulos argirófilos en el citoplasma (figura 7).

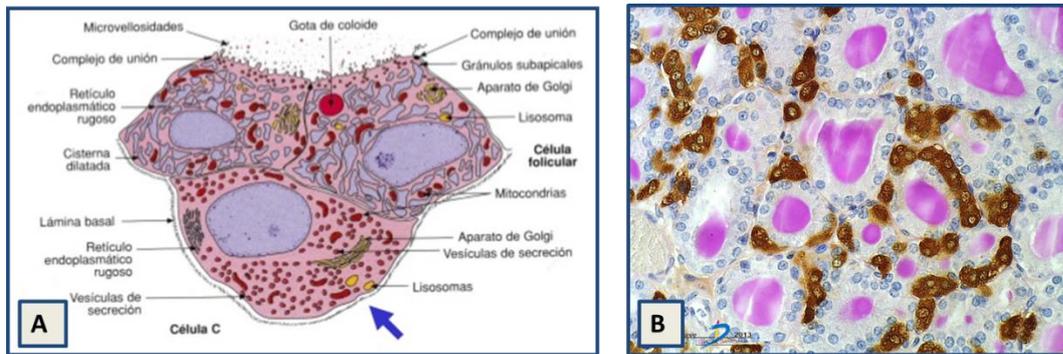


Figura 7.- A) Esquema de la pared de un folículo tiroideo donde se muestra la posición parafolicular de las células C (Gartner, 2002). B) Tiroides de rata. Inmunotinción para calcitonina seguida de la técnica del PAS, donde se distingue la forma y posición de la célula C (Martín-Lacave, 2014).

Ultraestructuralmente, lo más destacable de las células C es la gran cantidad de gránulos de secreción que se distribuyen por todo el citoplasma y que contienen principalmente CT. También se observan en el citoplasma mitocondrias de formas y tamaños variables, lisosomas dispersos y un RER en posición periférica, próximo a un aparato de Golgi prominente. El núcleo central es de forma redondeada y cromatina laxa (figura 8).

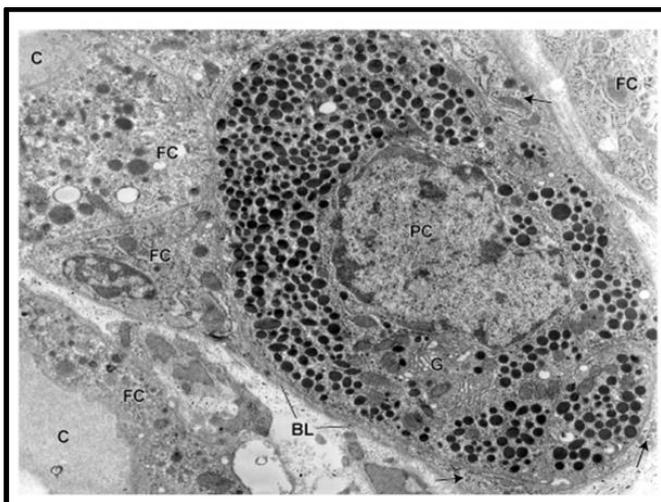


Figura 8.- Ultraestructura de la célula C (MET), que muestra posición parafolicular y abundancia de pequeños gránulos de secreción típicos. Células foliculares (Fc); Capilares (C); Núcleo celular (Pc) (Ross, 2012).

Clásicamente, las células C pertenecían al **sistema APUD (*Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*)**, término que creó Pearse en 1966 y que englobaba a un grupo de células de origen neuroectodérmico que compartían propiedades ultraestructurales cuya principal función era la secreción de péptidos endocrinos que almacenaban en gránulos secretorios (Pearse 1966).

En 1977, el término APUD fue reemplazado por el de **“Sistema Neuroendocrino Difuso” (SNED)**, tras comprobarse que no todas las células de la serie APUD tenían su origen en las crestas neurales (CN), ni todas acumulaban precursores aminados. Las células del SNED son células que sintetizan péptidos reguladores comunes a los sistemas nervioso y endocrino. Además de las células C, pertenecen al SNED las células neuroendocrinas del intestino, las de los islotes pancreáticos, las bronquio-pulmonares y del aparato urogenital, las células cromafines de la médula suprarrenal, las células de la adenohipófisis, de la pineal, del cuerpo carotídeo, de las paratiroides, de los ganglios simpáticos y de los melanocitos (Pearse 1977).

Las células neuroendocrinas son inmunoreactivas a marcadores como cromogranina, NSE (*Neuron-Specific Enolase*) y sinaptofisina, algunos de los cuales se expresan también en diferentes poblaciones de células nerviosas (figura 9).

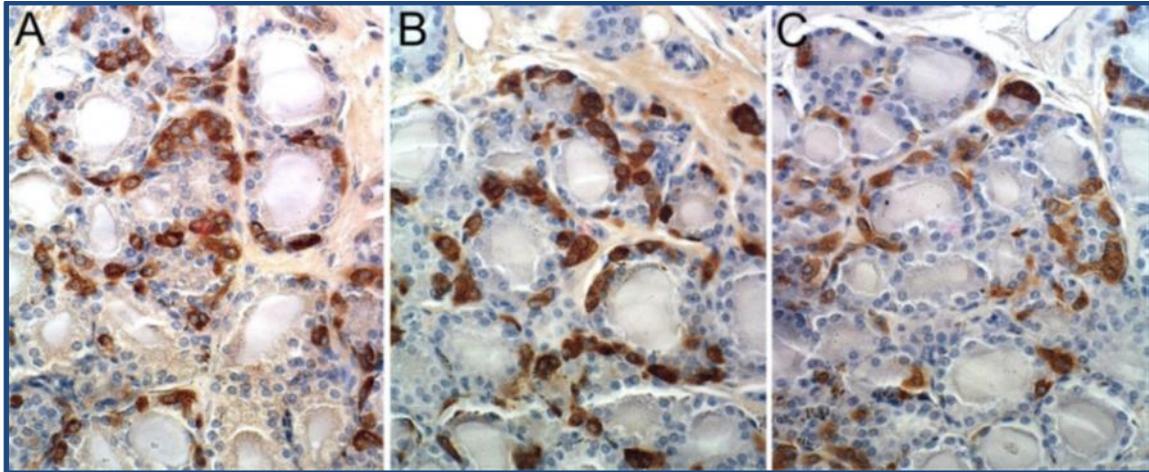


Figura 9.- Demostración IHQ de cromogranina A (A), calcitonina (B) and CGRP (C), en secciones consecutivas de una glándula tiroidea de rata. (Fernandez-Santos JM et al., 2012).

Como se ha comentado anteriormente, el principal péptido sintetizado por las células C es la CT. La CT es una hormona hipocalcemiante, que también se produce en otras localizaciones extra-tiroideas como son las paratiroides, el cerebro, el pulmón, la próstata y la uretra (Pondel 2001). La CT actúa sobre el hueso inhibiendo la resorción ósea y de forma indirecta sobre otros tejidos relacionados con la remodelación del hueso como son los riñones (Inzerillo et al. 2002).

Las células C, además de CT sintetizan otros **péptidos reguladores** que se expresan de forma variable en distintas especies (Tabla 1), algunos de estos péptidos tienen una **acción estimulante** sobre la producción de hormonas tiroideas como la serotonina, la ghrelina o la gastrina, mientras que otros ejercen una **acción inhibitoria** sobre la función tiroidea, como la propia CT, el CGRP o la somatostatina (Utrilla et al. 2013). Prueba de la función reguladora paracrina que las células C ejercen en el tiroides, es la localización de receptores específicos para algunos de estos péptidos en las células foliculares (De Miguel et al. 2005; Morillo-Bernal et al. 2011).

Regulatory factors	Species	Authors
Calcitonin (CT)	Pig, dog	Bussolati and Pearse, 1967 [39]
Somatostatin	Mammals	Kameda et al., 1982 ([33]
Katacalcin-I/CCP-I/PDN-21	Human	Ali-Rachedi et al., 1983 [31]
CGRP (<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>)	Mammals	Sabate et al., 1985 [30, 40]; Kameda, 1987 [30, 40]
Serotonin	Sheep	Barasch et al., 1987 [41]
GRP (<i>Gastrin-Releasing Peptide</i>)	Human	Sunday et al., 1988 [32]
Helodermin-like peptide	Human, rat, pig, dog, etc.	Grunditz et al., 1989 [35]
CCK/ C-terminal gastrin	Rat	Arias et al., 1989 [42]
TRH (<i>Thyroid Releasing Hormone</i>)	Rat	Gkonos et al., 1989 [36]
Neuromedin U	Rat	Domin et al., 1990 [34]
CCP-II (<i>CT Carboxyl terminal Peptide</i>)	Human	Cohen et al., 1992 [43]
PTHrP (<i>Parathyroid Hormone-related Protein</i>)	Sheep	Okada et al., 1995 [44]
Melatonin	Rat	Kvetnoy, 1999 [45]
Neuropéptide Y	Human	Scopsi et al., 1990 [46]
Ghrelina	Rat, human	Raghay et al., 2006 [38]
Pneumadina	Rat	Kosowicz et al., 2003 [47]
CART (<i>Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript</i>)	Pig	Wierup et al., 2004 [37]
Motilin	Human	Xu et al., 2008 [48]
NERP (<i>NeuroEndocrine Regulatory Peptide</i>)	Human	Matsuo et al., 2010 [49]

Tabla 1.- Factores reguladores identificados en el citoplasma de las células C, según orden cronológico (Fernandez-Santos JM et al. 2012).

A continuación se van a analizar los efectos paracrinos que ejercen algunos de los factores reguladores sintetizados por las células C

-Péptidos de la familia de la CT (CT, CGRP, Katalcalcina)

El CGRP se localiza tanto en las células C como en las fibras nerviosas que rodean los vasos sanguíneos y los folículos tiroideos. Por sí mismo no afecta a la estimulación basal de hormonas tiroideas, sin embargo, actuando de forma conjunta con la CT y la katalcalcina, se ha demostrado que inhiben la secreción de TSH (Ahrén 1989).

- Somatostatina (SS)

El número de células C que son inmunorreactivas para la SS varía según la especie. En el hombre son pocas las células C que la expresan y en la rata varía según la edad, dándose la mayor expresión en la rata neonatal (Fierabracci et al. 1993; Ain et al. 1997, Utrilla et al. 2013).

En el tiroides normal, la SS, inhibe la liberación de las hormonas tiroideas T_3 y T_4 , así como la captación de yoduro estimulada por la TSH. Además se ha demostrado que la SS ejerce un efecto sobre la proliferación celular, ya que, inhibe el crecimiento celular estimulado por la TSH e IGF-1 (Degli Uberti et al. 1991).

- TRH

La TRH desencadena el proceso de síntesis de las hormonas tiroideas, ya que su principal función es la de estimular la liberación de TSH por las células tirotróficas de la adenohipófisis.

Diversos estudios han confirmado la expresión de TRH en las células C (Gkonos et al. 1989; Utrilla et al. 2013). En cuanto al receptor para la TRH, se han caracterizado dos subtipos, TRH-R1 y TRH-R2. En las células C se han detectado los dos subtipos de receptores para la TRH, mientras que en las células foliculares tan sólo se ha detectado el subtipo TRH-R2 (De Miguel et al. 2005).

Los niveles de TRH y de péptidos relacionados con la TRH, están fuertemente influenciados por el estado funcional de la glándula (Rausell et al. 1999). Así en situaciones de hipertiroidismo con niveles de TSH bajos, la adición de TRH *in vitro* disminuye de forma directa las hormonas tiroideas circulantes en sangre. Esto puede indicar que, posiblemente, el control de la TRH sobre la producción de hormonas tiroideas se realice de forma dual, por un lado vía TSH por medio del eje HHT y, por otro lado, mediante el efecto paracrino de las células C sobre las células foliculares,

como un mecanismo adicional de control de la función tiroidea (Sato et al. 1995). Todas las células C inmunopositivas para CT, lo son también para TRH (Fernandez-Santos JM et al. 2012; Utrilla et al. 2013) (figura 10).

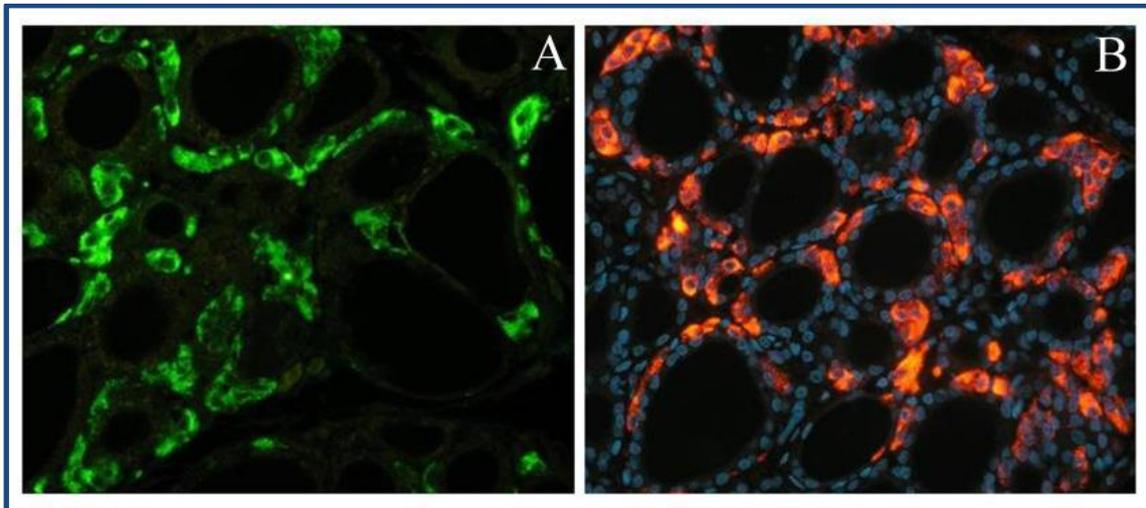


Figura 10.- Inmunofluorescencia para calcitonina (A) y TRH (B) en tiroides de rata. Todas las células C son inmunopositivas tanto para calcitonina como para TRH. (Fernandez-Santos JM et al. 2012)

- Ghrelina

Raghy et al., en 2006, demostraron que en el tiroides humano adulto la ghrelina se sintetiza sólo en las células C (Raghy et al. 2006). Además, nuestro grupo de investigación, detectó el receptor para la ghrelina (GSH-R) en las células foliculares de ratas, tanto en cortes histológicos como en cultivos celulares (Morillo-Bernal et al. 2011). La ghrelina actúa sobre la síntesis de las hormonas tiroideas vía GSH-R, aumentando la función tiroidea mediante la estimulación de las células foliculares (Park et al. 2008; Morillo-Bernal et al. 2011).

La ghrelina tiene un efecto directo sobre tres genes implicados en la síntesis de hormonas tiroideas (NIS, TPO y Tg) y este efecto directo sobre la actividad de las células foliculares puede influir sobre el eje HHT (Sosić-Jurjević et al. 2009; Kluge et al. 2010).

- CART (*Cocaine and amphetamine related transcript*)

Wierup et al., en 2007, localizó CART en las células C de cerdo y en otras células neuroendocrinas (Wierup et al. 2007). Nuestro grupo de investigación también

identificó recientemente la presencia de CART en las células C de tiroides humano y de rata (Utrilla et al. 2013).

Al parecer CART ejerce una importante acción moduladora de la función tiroidea ya que actúa sobre el eje HHT, regulando la actividad de la TRH sobre las células tirotropas de la adenohipófisis (Fekete et al. 2000).

- Serotonina

La serotonina presenta un efecto estimulador sobre la actividad del tiroides. Por un lado es capaz de estimular la producción de TRH a nivel del hipotálamo, dando lugar a un incremento de la producción de TSH en la adenohipófisis. Por otro lado, las células C almacenan gránulos secretores de serotonina, que ejerce un efecto de estimulación de la síntesis de hormonas tiroideas sobre las células foliculares, de ahí que se le atribuya un efecto paracrino intra-tiroideo (Barasch, Tamir, et al. 1987; Utrilla et al. 2013).

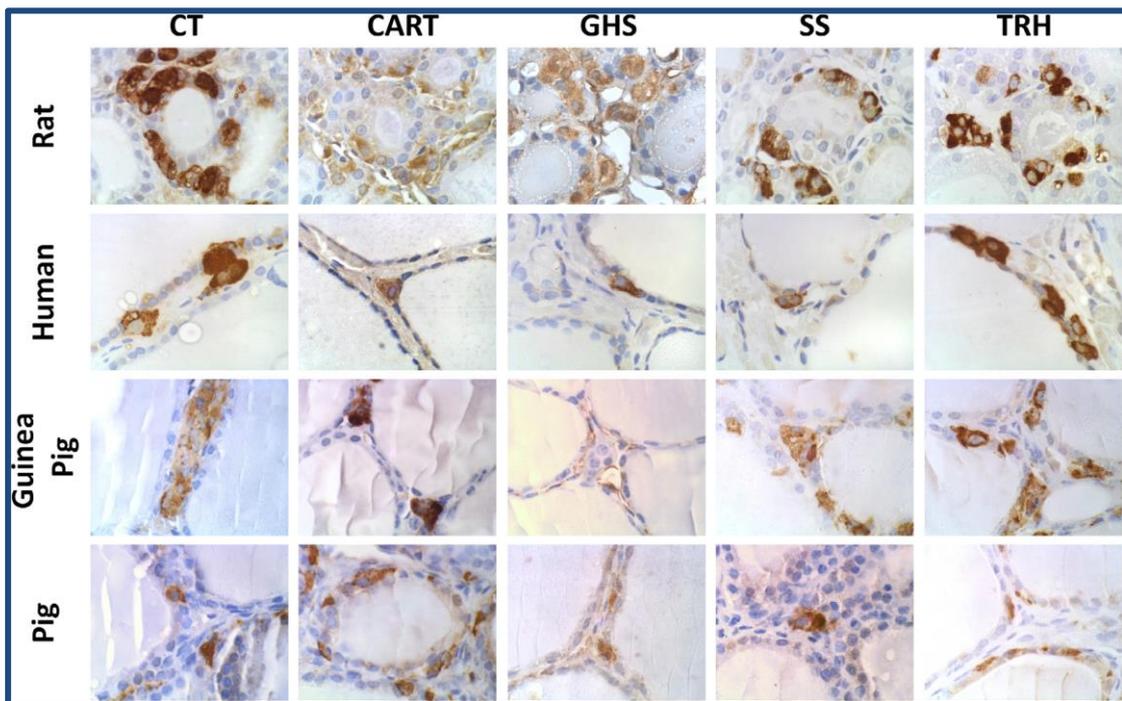


Figura 11.- Patrón IHQ de diferentes péptidos hipotalámicos en la glándula tiroidea de diferentes mamíferos: rata, humanos, cobaya y cerdo. El número de células C varía según la especie, pero todos los péptidos estudiados se expresan en todas las especies con la excepción de la ghrelina en el tiroides de cobaya (Utrilla et al., 2013).

- Melatonina

Mediante técnicas de IHQ, se ha probado la presencia de melatonina en las células C. Además, nuestro grupo de investigación, ha demostrado la existencia en las células c de los mecanismos necesarios para la síntesis de melatonina, mediante el estudio de la expresión de las enzimas clave, AANAT (*aralkylamine N-acetyltransferase*) e HIOMT (*hydroxyindole-O-methyl transferase*), así como la detección de los receptores para la melatonina tanto en las células C como en las células foliculares (García-Marín et al. 2012).

Se ha descrito que la melatonina tiene un efecto inhibitor de la actividad mitótica basal y estimulada por la TSH sobre las células foliculares. También se ha demostrado que tiene un efecto directo sobre la secreción de T_4 y que, además, disminuye la respuesta de la glándula a la TSH. Por último, se ha sugerido que la melatonina puede desempeñar un papel modulador del estrés oxidativo generado en el tiroides, debido a la capacidad que tiene para secuestrar directamente el H_2O_2 necesario para el correcto funcionamiento de la glándula (Tan et al. 2000; García-Marín, 2015).

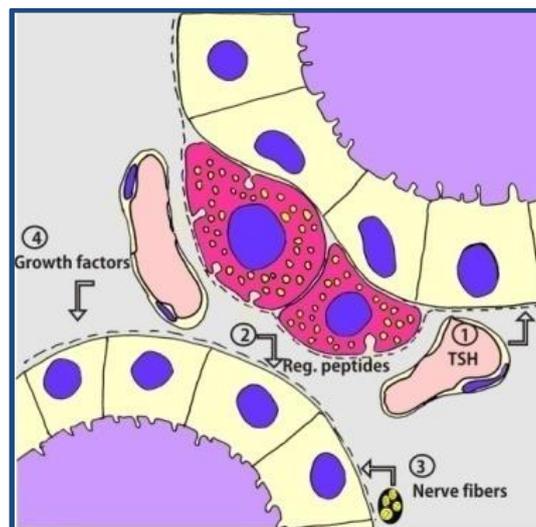


Figura 12.- Diagrama esquemático de los diferentes mecanismos que regulan la síntesis de hormonas tiroideas por las células foliculares. (Fernandez-Santos JM et al. 2012).

De los péptidos reguladores sintetizados por las células C, se han descrito los más importantes estudiados hasta el momento, pero siguen apareciendo nuevos péptidos relacionados con la función moduladora de las células C sobre la actividad tiroidea. La

inter-relación entre las células C y las células foliculares podría justificar desde el punto de vista filogenético la posición parafolicular de las células C (figura 12).

1.2.3. Restos ultimobranquiales

En el tiroides, además de los folículos tiroideos, compuestos por las células foliculares y las células C, aparecen unas estructuras heterogéneas que se considera que son un **remanente embrionario del cuerpo ultimobranquial (CUB)** y que, por ello, se conocen como restos ultimobranquiales (UB).

Los restos UB, han sido descritos en una gran variedad de especies, incluida la humana, y como veremos más adelante, muestran características diferenciales interespecíficas, así como distintas denominaciones.

En roedores, el primero que los describió fue Van-Dyke en 1944 (Van Dyke JH. 1944), y le siguieron otros autores, quienes, además de estudiar las características morfológicas de estos restos, le fueron asignando distintas denominaciones como son: **“segunda clase de folículos tiroideos”** (Wollman & Hilfer 1978), **“folículos ultimobranquiales (FUB)”** (Wollman & Nève 1971b); (Nève & Wollman 1971), **“túbulos ultimobranquiales”** (Conde et al. 1992; Martin-Lacave et al.1999) o **“quistes ultimobranquiales”** (Rao-Rupanagudi et al. 1992). En general, los FUB se localizan en el centro del lóbulo tiroideo, parcialmente embebidos entre los folículos tiroideos normales. Sus características morfológicas, su aspecto y su tamaño varían a lo largo de la vida postnatal.

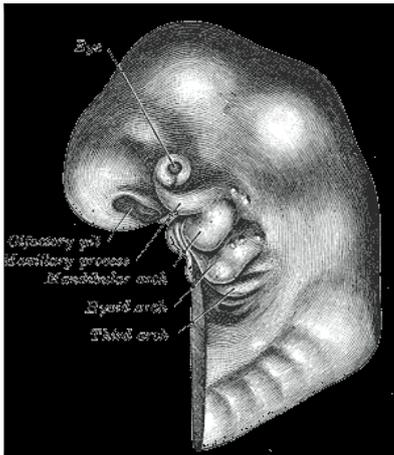
En el hombre, a los restos UB se les denomina **“Solid Cell Nests (SCN)”** y han sido extensamente estudiados desde que Getzowa los describiera por primera vez en 1907. Originalmente, fueron descritos como proliferaciones celulares sólidas que se pueden encontrar en las glándulas tiroideas normales. Los SCN se localizan preferentemente en el estroma interfolicular, en el tercio medio-superior del lóbulo tiroideo y su posición anatómica es comparable con la posición que ocupan las células C en el tiroides (Harach 1988; Mizukami et al. 1994).

Se acepta que tanto los SCN en humanos como los FUB en roedores, **son remanentes embrionarios del CUB** y que, por lo tanto, tienen un origen UB común (Wollman & Hilfer 1977; Wollman & Hilfer 1978; Beckner et al. 1990). A pesar de este origen común, existen diferencias en cuanto a la apariencia y evolución de estos restos UB en la vida postnatal de ambas especies, que serán descritas extensamente más adelante.

2.- DESARROLLO EMBRIONARIO DEL TIROIDES

2.1. Generalidades

La **faringe embrionaria** tiene una gran complejidad estructural debido a que de esta región derivan diversos tejidos y órganos faríngeos. En vertebrados, desde un punto de vista filogenético, es en la región faríngea donde se producen cambios fundamentales entre las distintas especies para adaptarse a su medio. Externamente, la región faríngea se caracteriza por la presencia de cuatro pares de **arcos faríngeos**, que son abultamientos en las caras laterales del embrión, resultado de la proliferación del mesodermo (figura 13). Cada arco branquial tiene contribución endodérmica, mesodérmica, ectodérmica y de las crestas neurales (CN). Contienen una arteria principal (saco aórtico), un par de nervios y un eje central de mesénquima precartilaginosa que se transformará en derivados esqueléticos característicos del adulto (figura 14). Los arcos branquiales se hallan separados por fuera por el tejido ectodérmico de las **hendiduras o surcos branquiales**.



Del lado interno de la faringe se producen unas depresiones llamadas **bolsas faríngeas** (evaginaciones del intestino primitivo), que separan interiormente cada uno de los arcos branquiales. El epitelio de las bolsas faríngeas es endodérmico.

En fases tempranas del desarrollo se aprecian cambios en la localización de los arcos branquiales, en las hendiduras ectodérmicas y en las bolsas faríngeas, entre los distintos grupos de vertebrados.

Estructuras del arco branquial							
Derivado adulto de la hendidura branquial	Arco número	Arco aórtico	Par craneal	Ejemplos de músculos branquiométricos	Derivados esqueléticos	Derivados adultos de la bolsa faríngea y de las estructuras de revestimiento	
Oído externo	Conducto externo	I (mandibular)	I (arteria maxilar)	V (trigémino)	Músculos de la masticación, tensor del tímpano, milohioideo, tensor del velo del paladar, vientre anterior del digástrico	Martillo, yunque, ligamento estenomandibular, cartilago de Meckel, anillo timpánico	Trompa de Eustaquio del oído medio
		II (hioideo)	I (arteria tiroidea, arteria estapedia)	VII (facial)	Músculos mímicos, estapedio, estilohioideo, vientre posterior del digástrico	Estribo, apófisis estiloides, ligamento estilohioideo, cuerpo menor de hioides, parte del cuerpo del hioides	Fosa supratonsilar
Seno cervical (transitorio)		III	I (arteria carótida interna)	IX (glosofaríngeo)	Estilofaríngeo	Cuerno mayor del hioides, parte del cuerpo del hioides	Timo, glándula paratiroides inferior
		IV	IV (arteria subclavia derecha y aorta)	X (vago)	Musculatura faríngea y laringea	Cartilagos laringeos	Glándula paratiroides superior, cuerpo ultimobranquial

Figura 14.- Derivados de la faringe. Contribución de los arcos, hendiduras y bolsas faríngeas. Embriología humana y biología del desarrollo. Carlson, 2009.

En humanos, las primeras bolsas faríngeas participan en la formación del oído; las segundas son menos visibles y forman las amígdalas; las terceras son unas estructuras más complejas, cuyo alargamiento ventral se diferencia en la porción epitelial del timo y también origina tejido paratiroideo. Los primordios del timo y las paratiroides pierden sus conexiones con la tercera bolsa (que termina por desaparecer) y migran caudalmente. El rudimento tímico se alarga y crece como una prolongación tubular dentro del mediastino del tórax. El primordio paratiroideo se separa del tímico y continúa su migración hacia la línea media donde permanece como las paratiroides inferiores. De las cuartas bolsas faríngeas se forman las glándulas paratiroides superiores, que se ubican en el tejido conjuntivo de la superficie posterior de los lóbulos laterales de la glándula tiroidea (Varga, Pospíšilová, Gmitterová, et al. 2008). En la porción más ventral de la cuarta bolsa se encuentra el CUB, que se considera la quinta bolsa faríngea en humanos.

En roedores, el desarrollo embrionario de la región faríngea es similar al de los humanos: la glándula tiroidea, el CUB, el timo y las paratiroides derivan del epitelio endodérmico de la región faríngea. El CUB deriva de la cuarta bolsa faríngea en ratas, mientras que a partir de la tercera bolsa se desarrollan el timo y las paratiroides, que descienden conjuntamente hasta su emplazamiento final, el timo en el mediastino

superior y las paratiroides sobre el tiroides (figura 15) (Kameda et al. 2009; Kameda et al. 2013).

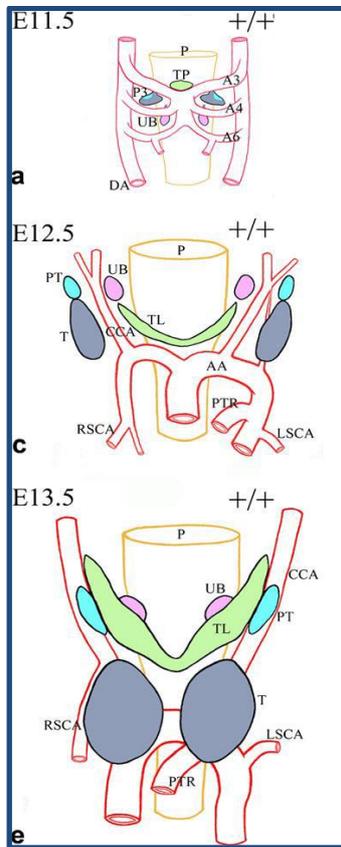


Figura 15.- Representación del desarrollo de los derivados faríngeos en roedores, durante los estadios E11.5, E12.5 y E13.5. Las terceras bolsas faríngeas (P3), van a derivar en el primordio tímico y paratiroideo. El CUB deriva de la cuarta bolsa faríngea (P4) en rata y de la tercera en ratón. En E11.5, el CUB se sitúa en posición medial, cerca del cuarto arco arterial y, en E13.5, entra en contacto y se fusiona con el lóbulo tiroideo. En E12.5 y E13.5 se produce la migración de los primordios tímicos y paratiroideos. (AA arco aórtico, A3 tercer arco arterial, A4 cuarto arco arterial, A6 sexto arco arterial, CA arteria carótida común, DA aorta dorsal, DC conducto carotídeo, LSCA arteria subclavia izquierda, P faringe, PT paratiroides, TR tronco pulmonar, RSCA arteria subclavia derecha, T timo, TL lóbulo tiroideo) (Kameda et al., 2013).

2.2. Organogénesis del tiroides

De los modelos animales en que se ha investigado el desarrollo de la glándula tiroidea, es en los roedores donde la anatomía del tiroides es más similar a la humana. La glándula tiroidea es el primer órgano en desarrollarse en el embrión. Tanto en humanos como en roedores, el desarrollo del tiroides comienza como un **engrosamiento endodérmico** en el suelo de la faringe en situación caudal respecto a la línea media de la lengua (24-32 días en el hombre; E8,5-E10,5 en el ratón). El **primordio tiroideo** se alarga pronto y forma una estructura de crecimiento inferior denominada **divertículo tiroideo** (3ª-4ª semana en el hombre; E10.50 en el ratón). Durante algún tiempo la glándula continúa conectada con su lugar de origen por medio del **conducto tirogloso de Hiss**. En parte de la población humana una porción del conducto tirogloso persiste como el **lóbulo piramidal**. El lugar de origen del primordio

tiroideo también persiste como el **foramen ciego**, una pequeña fosa ciega situada en la base de la lengua (Carlson 2009; Sadler & Langman 2007).

El divertículo tiroideo emigra caudalmente hasta alcanzar la posición traqueal, donde queda definitivamente emplazado. La porción final del conducto, que origina el tiroides, se denomina **vesícula tiroidea** (7ª semana en el hombre; E11.5 en el ratón). Ésta se bifurca dando lugar a la glándula tiroidea que consiste en dos lóbulos principales conectados por un istmo.

Sobre la vesícula tiroidea se va a producir la fusión del CUB en el que se encuentran las células precursoras de las células C, productoras de CT. De esta forma, se puede decir que el tiroides tiene un triple origen embrionario, ya que es el resultado de la fusión de la vesícula tiroidea con el par de CUB (figura 16).

La vesícula tiroidea sufre relativamente pronto un proceso de histodiferenciación y, en estadios tempranos, es posible observar cordones celulares intercalados con tejido conectivo vascular. Las células de la vesícula tiroidea son las precursoras de las células foliculares, que sintetizarán las hormonas tiroideas T_3 y T_4 . Los cordones celulares se van transformando en folículos compuestos por células foliculares y material coloide en su interior donde se almacenan las hormonas tiroideas ((10ª-11ª semana en el hombre; E17 en el ratón) (Fagman & Nilsson 2010; Fagman et al. 2006).

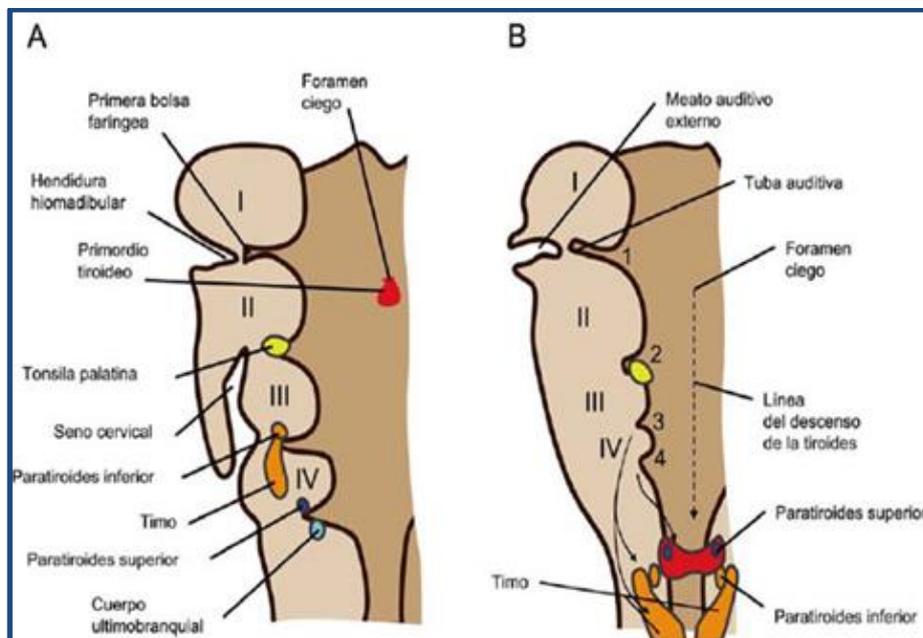


Figura 16.- Representación esquematizada de la organogénesis tiroidea. A) Estado inicial del desarrollo del tiroides en el que se ha formado el primordio tiroideo. B) El primordio tiroideo desciende hasta su posición final y se produce la fusión del CUB, que se ha separado de las bolsas faríngeas (modificado de Carlson, 2005).

2.3. Histogénesis del tiroides

2.3.1. Histogénesis de las células foliculares

La diferenciación histológica de la glándula tiroidea humana, puede dividirse en tres etapas:

1) Precoloidal (7^a-13^a semana): Una vez que el divertículo tiroideo desciende formando el conducto tirogloso de Hiss, comienza el desarrollo histológico del tiroides. Las células tiroideas forman acúmulos y muestran un canalículo intracelular. A partir de la 8^a-9^a semana, se incrementa la disposición cordonal de las células y comienza la formación de folículos inmaduros (10^a-11^a semana). Entre la 11^a-13^a semana las células foliculares empiezan a producir coloide inmaduro.

2) Formación del coloide (13^a-14^a semana): Los canalículos que han emigrado hacia el ápice de la célula, vierten su contenido extracelularmente y coalescen, fundiéndose. Los desmosomas, que mantienen unidos los extremos apicales de las células yuxtapuestas, impiden la extensión del material coloidal acumulado en el espacio central. Esta etapa se acompaña de un rápido incremento en la vascularización de los espacios perifoliculares. A partir de la 13^a semana, se forman proteínas específicas y esenciales como son Tg, TPO, NIS y pendrina.

3) Folicular (14^a-40^a semana): Última etapa del desarrollo, en la que se produce un progresivo aumento en diámetro de los folículos, ya maduros, y del coloide almacenado. Es en este momento cuando la glándula tiroidea se corresponde, histológicamente, con la estructura del adulto. Sin embargo, la histogénesis no se produce de forma sincronizada, ya que, en una misma glándula, pueden observarse simultáneamente folículos en distintas fases de desarrollo (Varga, Pospíšilová, Gmitterová, et al. 2008).

A partir de la 20^a semana de la gestación el eje HHT comienza a ser funcional (Sadler & Langman 2007).

En la *rata*, mediante técnicas IHQ, se determinó que el esbozo de tejido tiroideo aparece en la pared faríngea hacia el día 11^a de la gestación. Posteriormente, desciende a lo largo de la zona ventral, prolifera y sobre el día 14^o se localiza en la parte anterior de la tráquea.

La histogénesis del tiroides de rata, se podría dividir en los siguientes periodos:

Día 14º de la gestación: existe un tejido tiroideo inmaduro con estructura trabecular o sólida a ambos lados de la tráquea. Las tinciones para Tg y PAS son negativas.

Del día 15º al 16º de la gestación: empiezan a aparecer células inmunopositivas para la Tg, aunque en escaso número, localizándose esta inmunorreactividad en el citoplasma del epitelio inmaduro. En el día 16 comienza la lobulillación de la glándula y el crecimiento interlobulillar de los vasos sanguíneos se hace cada vez más evidente.

Día 17º de la gestación: Aparecen estructuras lobulillares primitivas en ambos lóbulos. Las células cuyos citoplasmas son positivos para la TG, aumentan en número y se evidencia, aunque de forma dispersa y escasa, la presencia de hormonas tiroideas en los folículos primitivos. La tinción del PAS se mantiene negativa.

Día del 18º al 21º de la gestación: sobre el día 18º las estructuras foliculares, aunque continúan siendo de pequeño tamaño, están más desarrolladas y las tinciones para la Tg y para la T₃ y T₄ se hacen más evidentes.

En el día 19º aparece la reactividad al PAS, lo cual demuestra presencia de coloide, que irá aumentando hasta el día del nacimiento. En los días 20º y 21º la estructura folicular neonatal se completa mostrando folículos de tamaño adecuado con luces bien desarrolladas e inmunorreactividad evidente para las hormonas tiroideas, para la Tg y para el PAS (Kawaoui & Tsuneda 1985).

2.3.2. Histogénesis del CUB y de las células C

En mamíferos, la glándula tiroidea se forma mediante la **fusión del CUB con la vesícula tiroidea**. El CUB, como hemos visto anteriormente, es un tejido de procedencia endodérmica que aparece como un apéndice del último par de bolsas faríngeas.

El **desarrollo embrionario del CUB en el hombre** ha sido descrito extensamente por distintos autores (Fontaine 1979, Merida-Velasco, Garcia-Garcia et al. 1989).

Se puede dividir en cuatro etapas:

1ª etapa: En esta etapa el CUB se encuentra unido a la cuarta bolsa faríngea y entre la 5ª-7ª semana de gestación comienza su **invaginación**, haciéndose mucho más evidente como la quinta bolsa faríngea.

2ª etapa: Entre la 7ª-8ª semana de gestación, en la que en el tiroides se encuentran folículos inmaduros, **el CUB se separa** de las bolsas faríngeas y comienza su migración hacia la vesícula tiroidea.

3ª etapa: Durante el proceso de desarrollo y entre las semanas 8ª-9ª de gestación, se produce la **incorporación del CUB al tiroides** mediante su fusión.

4ª etapa: La **disolución del CUB en el tiroides** se produce sobre la 9ª semana de la gestación. Sus componentes celulares se diseminan en el tiroides y darán lugar a las células C.

En ratones también se ha estudiado la histogénesis del CUB mediante técnicas de IHQ e IF, en los distintos estadios de desarrollo (Fagman et al. 2006; Kusakabe et al. 2006): El CUB empieza a identificarse en el **estadio E11.5** como una protusión del endodermo en posición dorso-lateral e inferior a la línea media donde se encuentra la vesícula tiroidea en desarrollo.

Entre E12.5 y E13.5 el CUB se separa de la última bolsa faríngea y se acerca al tiroides, que en ese estadio se alarga y adelgaza por la zona central para formar los lóbulos tiroideos y el istmo. En este estado de desarrollo todavía no se expresan ni Tg ni CT.

Entre 13.5 y 15.5 se produce la fusión del CUB con el tiroides, los lóbulos tiroideos ya están desarrollados y se encuentran folículos inmaduros.

En el estadio E15.5, en los lóbulos tiroideos se distinguen ya dos poblaciones celulares, lo que demuestra que el CUB ya se ha dispersado en el tiroides. Algunas células expresan Tg.

Entre E16.5 y E17.5 se incrementa el tamaño de los lóbulos tiroideos y se encuentran signos de diferenciación definitiva. En el epitelio folicular se marcan células positivas para Tg y **a partir de E 19** en posición parafolicular y en la zona central del lóbulo hay células que expresan CT.

Ya en 1907, Getzowa, sugirió que el segundo tipo de células epiteliales que se encuentran en el tiroides, las células C, tenían un origen UB. Pearse & Carvalheira confirmaron que las células C procedían del CUB, usando un método para trazar aminos fluorogénicos en embriones de ratones, e identificaron las células C aprovechando su capacidad de captación y descarboxilación de precursores de grupos aminados. Posteriormente, otros estudios también ratificaron el **origen UB de las células C**, basándose en casos en los que no se produce la fusión y dispersión del CUB en el tiroides, ya sea por un descenso anómalo del tiroides, como ocurre en el tiroides lingual, o por falta de alguno de los factores de transcripción necesarios para su desarrollo normal. Lo cierto es que en cualquiera de estas situaciones, no se detectaron en el tiroides células productoras de CT (Fraser and Duckworth, 1979; Kusakabe et al., 2006; Williams et al., 1989).

2.3.3. Peculiaridades del desarrollo en distintas especies de vertebrados

La investigación sobre el desarrollo del tiroides, tradicionalmente, se ha llevado a cabo sobre modelos animales como son las aves y los roedores, y más recientemente, en los peces. En todos los vertebrados, se ha confirmado que la mayor parte del tejido tiroideo es de procedencia endodérmica. La maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis de las hormonas tiroideas, requiere que el tiroides se organice en folículos tiroideos, que como ya se ha comentado, constituyen la unidad morfofuncional del tiroides.

Mientras que en humanos y en roedores, el tiroides se forma mediante la fusión del primordio tiroideo y el CUB, estas estructuras permanecen separadas como órganos distintos en vertebrados no mamíferos (aves, reptiles, anfibios, y peces) en una estructura denominada **glándula UB** (Kameda 1995) que proviene del último par de bolsas faríngeas. Además, en el hombre y en los roedores, las células C, productoras de calcitonina, se encuentran dispersas en el parénquima tiroideo, mientras que en los vertebrados inferiores se ubican en la glándula ultimobranquial. El tejido del tiroides también se organiza de forma diferente en peces, ya que los folículos tiroideos no forman un órgano encapsulado sino que se diseminan en la región de la mandíbula inferior a lo largo de la aorta ventral, las arterias branquiales, el corazón, el bazo y los riñones, sin formar lóbulos bilaterales como en las otras especies.

A pesar de estas diferencias anatómicas, las células foliculares en vertebrados inferiores, son similares a los tirocitos de mamíferos, en aspectos como la expresión de ciertos factores de transcripción necesarios para la correcta diferenciación del tiroides, la captación de yodo, la síntesis de T_4 y producción de Tg.

2.4. Factores de transcripción tiroideos

2.4.1. Factores de transcripción implicados en el desarrollo del tiroides y del CUB

De la misma forma que el correcto desarrollo de los arcos faríngeos está regulado por factores de transcripción como Hox, Eya1 o TTF-1, el crecimiento y supervivencia de las células progenitoras del tiroides depende de una serie de factores de transcripción específicos para la glándula.

Los factores de transcripción específicos del tiroides, TTF-1, Foxe-1 y Pax8 (Trueba et al. 2005), se denominan así porque en un principio sólo se describieron en este tejido, pero posteriormente se demostró que también se expresan en otros tipos celulares. Los mecanismos moleculares que conducen a la organogénesis e histogénesis del tiroides y del CUB, se basan en una acción cooperativa de TTF-1, Foxe-1 y Pax8 junto con Hhex. Estos factores forman una **red reguladora** de las células progenitoras del tiroides. **Estudiarlos por separado es complicado porque interactúan entre sí y posiblemente con otros factores de transcripción.**

Además, la investigación con ratones transgénicos ha posibilitado el descubrimiento de nuevos mecanismos moleculares importantes para el desarrollo del tiroides y del CUB en vertebrados, todos ellos se exponen a continuación (tablas 2 y 3).

TTF-1/NKx2-1

Este factor es conocido indistintamente por TTF-1, NKx2-1 o T/EBP y está codificado por el gen *Titf1*. Se encuentra en los promotores de todos los genes específicos tiroideos.

Se descubrió en el tiroides, de ahí su nombre, aunque también se expresa en otros órganos como la hipófisis posterior, paratiroides, pulmón y áreas del hipotálamo.

Es el único factor de transcripción que se expresa en el divertículo tiroideo y en el CUB, lo que sugiere un mecanismo común de desarrollo. **Se requiere para la supervivencia de las células foliculares y de las células C y su insuficiencia lleva a una fusión incompleta del CUB con el tiroides** (Westerlund et al. 2008).

La expresión de TTF-1 no es indispensable para la especificación de las células del CUB, pero sí es necesario para su supervivencia. En la glándula UB de los vertebrados inferiores, que permanece separada de la glándula tiroidea, no se expresa TTF-1 (Alt et al. 2006).

Foxe-1/TTF-2

Pertenece a la familia de factores de transcripción con un dominio *forkhead*. El gen que lo codifica se llama *Titf2/Foxe1*. Sólo se encuentra en los promotores de Tg y TPO. Regula la migración del tiroides hasta su posición pre-traqueal, **además es necesario para que se produzca la diferenciación histológica de las células foliculares** (De Felice et al. 1998).

Pax8

Pertenece a la familia de factores de transcripción con un dominio de unión al DNA del tipo *paired*, que contiene motivos hélice-alfa-hélice que hace que pueda unirse a regiones diferentes del ADN. Su unión al promotor de NIS es imprescindible para que éste se exprese, también se une a TTF-1 con el que coopera sinérgicamente en la expresión de génica de Tg y TPO.

Es un marcador específico de células foliculares, porque el resto de factores de transcripción se expresan conjuntamente en otras zonas del endodermo.

Existen diferencias en la expresión de Pax8 en el CUB del hombre y del ratón. Mientras que en el ratón la expresión de Pax8 se limita al ectodermo que rodea la tercera bolsa faríngea, en el hombre el CUB expresa Pax8 desde el comienzo del desarrollo (Trueba et al. 2005).

Los defectos más característicos que conlleva la expresión insuficiente de Pax8 son hipotiroidismo, aumento de la TSH, y niveles de T₃ y T₄ indetectables (Friedrichsen et al. 2004).

Hhex

Pertenece a la familia de factores de transcripción *homeobox*, que están implicados en los procesos de desarrollo. **Se requiere para la formación del primordio tiroideo y, probablemente, también influye en la supervivencia de las células progenitoras tiroideas** (Barbera et al. 2000).

Isl1 (Isl1)

Es un gen que codifica un factor de transcripción del tipo LIM "*homedomain transcription factor*" implicado en el desarrollo de órganos derivados del endodermo.

Isl1, junto con TTF-1, se expresa en el primordio tiroideo y en el CUB. Durante la formación del tiroides y una vez que el CUB se ha fusionado con éste, la expresión de Isl1 va disminuyendo en las células foliculares y el número de células positivas para Isl1 va disminuyendo a medida que aumenta la producción de CT por las células C.

Isl1 también se expresa en el carcinoma medular de tiroides (Westerlund et al. 2008).

Hes1

Hes1 es un regulador mediante represión (factor de crecimiento) de los factores de transcripción bHLH (*basic helix-loop-helix*) que se expresan en varios tejidos. En general, Hes1 mantiene células progenitoras en estado indiferenciado mediante regulación negativa de factores de transcripción necesarios para el desarrollo de distintos órganos.

Se le atribuye una doble función en el desarrollo del tiroides. Por un lado, **la adecuada diferenciación y función endocrina tanto de las células foliculares como de las células C y, por otro lado, el control del número de tirocitos y de células progenitoras de las células C.**

Hes1 se mantiene en el tiroides adulto y aumenta en el cáncer medular y folicular de tiroides (Carre et al. 2011).

Mash1

Mash1 es un factor de transcripción de los genes bHLH (*Basic helix-loop-helix*), que juega un importante papel en la diferenciación de células neuroendocrinas, ya sean derivadas de las CN como del endodermo.

Mash1 se expresa en el CUB durante su formación, migración y dispersión en el tiroides, ocupando la posición de las células parafoliculares. Hay distintas teorías sobre el momento en el que Mash1 se deja de expresar en el tiroides. Según Kameda (Kameda, Nishimaki, Miura, et al. 2007), en el momento en que las células C comienzan a producir CT, ya no se detecta Mash1. Sin embargo, según autores como Westerlund, todavía se sigue expresando en el tiroides adulto (Westerlund et al. 2008). **Mash1 se postula como el responsable de dotar a las células C del “fenotipo neuroendocrino”.**

Tabla 2.- Función de los factores de transcripción implicados en las distintas etapas del desarrollo del tiroides.

Desarrollo embrionario del tiroides	Formación del primordio tiroideo	Migración caudal del primordio tiroideo	Posición pretraqueal de la vesícula tiroidea. Lobulación	Desarrollo histológico del tiroides	Folículos maduros. Tiroides funcional
TTF-1	*	*	*	*	*
Foxe-1		*	*	*	*
Pax8				*	*
Hhex	*			*	
Islet-1	*	*	*	*	
Hes-1				*	*

Tabla 3.- Función de los factores de transcripción implicados en el desarrollo del CUB y la histogénesis de las células C.

Desarrollo embrionario del CUB	Invaginación del CUB	Separación de las bolsas faríngeas y migración hacia la vesícula tiroidea	Fusión con la vesícula tiroidea	Dispersión en el tiroides e histogénesis de las células C	Localización y supervivencia de las células C
TTF-1			*	*	
Pax8	Humanos	Humanos	Humanos		
Islet-1	*	*	*	*	
Hes-1				*	*
Mash-1	*	*	*	*	*/?

2.4.2. Otros factores y vías de señalización que influyen en el desarrollo del tiroides

Como se ha descrito en el apartado anterior, son muchos los factores de transcripción tiroideos que participan en el correcto desarrollo del tiroides y del CUB, pero además de estos factores, se han descubierto otros mecanismos moleculares externos al tiroides que de alguna forma desempeñan un papel en el desarrollo embrionario de este órgano.

Diversos estudios han demostrado que durante fases tempranas del desarrollo embrionario, **los arcos faríngeos son poblados por células procedentes de las CN**. Le Liebre y Le Douarin, 1975, lo demostraron en embriones de pollo (Le Lievre & Le Douarin 1975) y, más tarde, se demostró también en ratones transgénicos mediante “*fate-mapping*” (Waldo et al. 1999; Jiang et al. 2000). Esto puede significar que señales procedentes de las CN sean necesarias para la diferenciación, migración, y supervivencia de los órganos faríngeos y, entre ellos, de la glándula tiroidea.

Las células mesenquimales que proceden de las CN, inducen y participan en el desarrollo normal, estructura y función de diversos órganos como: timo, paratiroides, tiroides, corazón, cara y cuello. En concreto, en el tiroides, **constituyen el tejido conectivo de la glándula** (Varga I et al. 2008).

Por otro lado, **los factores de crecimiento de los fibroblastos** (FGFs “*Fibroblast growth factors*”), constituyen una gran familia de polipéptidos que promueven el desarrollo embrionario mediante la regulación de la proliferación, diferenciación y migración

celular. Los FGFs son expresados por los derivados mesenquimales de las CN y tienen también un importante papel en el desarrollo de los derivados endodérmicos faríngeos (Kameda et al. 2009). Importantes investigaciones realizadas en ratones y peces, mostraron como la expresión de los FGFs de las células mesenquimales que rodean los arcos faríngeos repercuten sobre la correcta diferenciación de las células progenitoras del tiroides.

La morfogénesis temprana del tiroides se puede producir de forma coordinada con la del corazón, ya que la región endodérmica precursora del tiroides se encuentra en íntimo contacto con **células cardiogénicas de origen mesodérmico**. Factores como FGF8 y TTF-1 se expresan en el desarrollo embrionario tanto del corazón como del tiroides (Serls et al. 2005) y, por lo tanto, pueden producirse interacciones recíprocas mediante vías de señalizaciones comunes. Además de al mesodermo cardiaco, se ha prestado mucha atención a la posible participación de los vasos embrionarios y, en particular, de las **células endoteliales**, como una fuente de señales inductivas para los órganos derivados del endodermo (Fagman et al. 2006; Wendl et al. 2002; Hick et al. 2013), de ahí la importancia de que en fases tempranas embrionarias, la región faríngea precursora del tiroides se encuentre en contacto directo con el endotelio del saco aórtico del tercer arco faríngeo.

En la siguiente figura se muestra, de forma esquematizada, el desarrollo embrionario de la región faríngea y, en particular, del tiroides, teniendo en cuenta las señales inductivas y los distintos factores de transcripción internos y externos que condicionan su correcto desarrollo embrionario (figura 17).

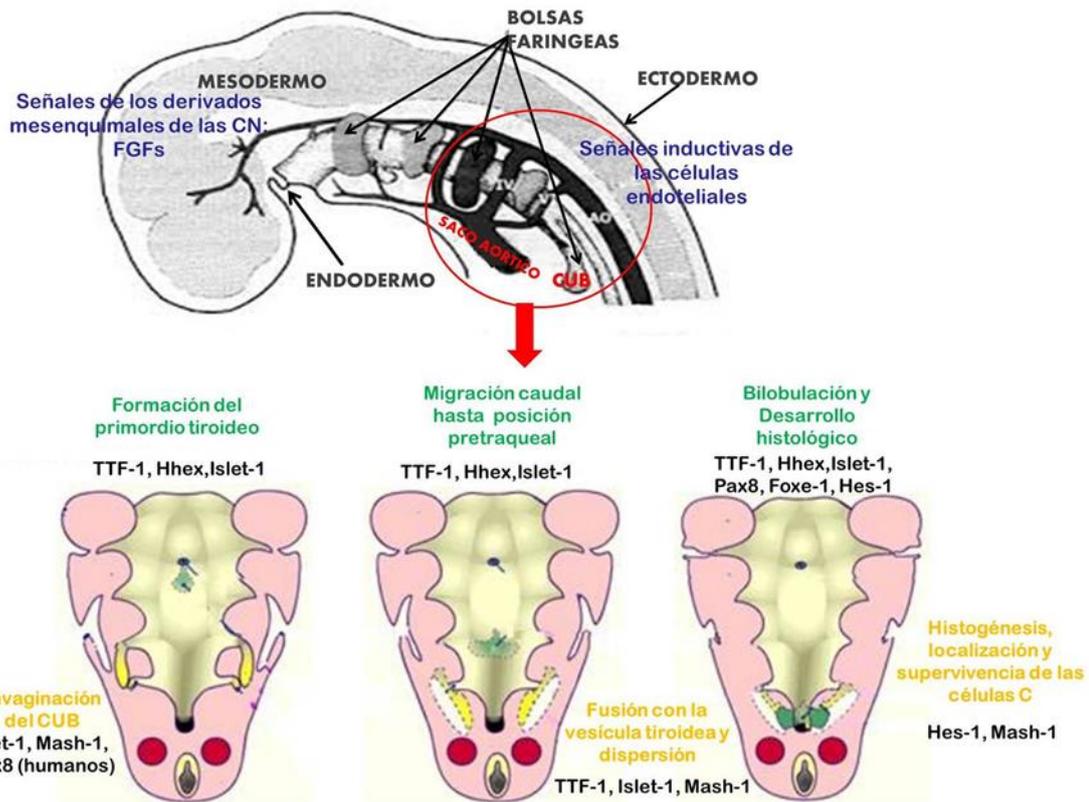


Figura 17.- Factores de transcripción implicados en las distintas etapas del desarrollo embrionario del tiroides.

2.5. Origen embrionario de las células C

2.5.1. Teoría clásica: origen en las crestas neurales

Prácticamente todos los autores que han estudiado el desarrollo del CUB en distintas especies, coinciden en afirmar que durante el desarrollo embrionario, la última bolsa faríngea antes de su incorporación a la glándula tiroidea, es colonizada por precursores de las células C (Fontaine 1979; Kusakabe et al. 2006; Kameda, Nishimaki, Chisaka, et al. 2007; Ozaki et al. 2011)

Clásicamente, se ha afirmado que células procedentes de las CN invaden y se mezclan con las células endodérmicas del CUB, desde el cual migran hacia el tiroides y se funden con éste dando lugar a las células C. Esta afirmación está basada en distintos estudios realizados, principalmente, sobre embriones de pollo y de ratón.

Los primeros estudios demostraron, mediante ensayos de inmunofluorescencia en embriones de pollo, que las células de las CN tenían características APUD y que estaban implicadas en el desarrollo de los melanocitos y de las células cromafines de la

médula adrenal (Pearse, 1966; Polak et al., 1971). Hasta entonces, se pensaba que el origen de estas células era el sistema nervioso simpático y, a partir de aquí, se sugirió un origen común en las CN de todas las células de la serie APUD, incluidas las células C. En este sentido, se consideraron concluyentes los resultados de la investigación realizada por **Le Douarin and Le Lièvre en 1970**, que trasplantaron a un embrión de pollo células de las CN de un embrión de codorniz, para aprovechar las características nucleares diferenciales de sus células y, así, comprobaron que las células de las CN injertadas participaban en la formación del CUB y que tenían las mismas características ultraestructurales que las células C (Le Douarin et al., 1974).

Posteriormente, **Pearse & Polak en 1971**, realizaron un estudio sobre embriones de ratón, en el que le inyectaron a las hembras gestantes L-DOPA una hora antes de sacrificarlas y extraerles el embrión, para a continuación realizarles un método de inducción de Inmunofluorescencia mediante formaldehído (FIF). Al observar la presencia de células fluorescentes en la posición que ocupaban las últimas bolsas faríngeas, concluyeron que las células C se originaban a partir de células de las CN también en mamíferos.

2.5.2. Teoría del origen ectodérmico de las células C

Teorías menos aceptadas son las que proponen un nuevo origen de las células C, tanto en humanos como en ratones, y sugieren que el CUB es colonizado por material celular ectodérmico derivado del margen posterior del cuarto arco faríngeo dando lugar a las células C.

En 1979, **Fontaine** afirmó que, en ratones, células precursoras de las células C estaban presentes en el **mesénquima del cuarto arco branquial**, antes de que éste comenzara a invadir el endodermo de la cuarta bolsa faríngea (Fontaine 1979). En embriones humanos se realizaron estudios cuyas conclusiones iban en una dirección similar; según estos estudios, la quinta bolsa faríngea sería colonizada en fases tempranas del desarrollo por material de naturaleza ectodérmica procedente del margen posterior de la **cuarta hendidura faríngea** (García et al. 1985).

Esta hipótesis la vuelve a defender **Mérida-Velasco** en sus investigaciones (Merida-Velasco et al. 1988; Merida-Velasco et al. 1989), basándose en que en el estadio 13 de O'Rahilly (embrión de 28 días) la vesícula tiroidea alcanza en la región mesobranquial la zona de origen de los cuartos arcos branquiales, apoyándose sobre su cara externa y expandiéndose transversalmente a este nivel. En el estadio 14-16 de O'Rahilly (embrión de 30-40 días) las cuartas bolsas faríngeas se aproximan por sus extremos inferiores a la vesícula tiroidea, que está comenzando la bilobulación. El cuarto par de bolsas se extiende por su extremo inferior, lo que sugiere una migración medial que

dará lugar al quinto par de bolsas, las cuales se fundirán con cada lóbulo tiroideo (Aracil Kessler 2003).

Como se ha descrito anteriormente, el estudio de los **factores de transcripción tiroideos**, permite alcanzar nuevos conocimientos sobre el desarrollo del tiroides. En un estudio realizado en embriones humanos sobre los patrones de expresión génica para Pax8, TTF-1, y Foxe-1, se observó la expresión de PAX8 en la superficie ectodérmica de la cuarta hendidura faríngea y, posteriormente, en el interior del CUB, respaldando así la teoría lanzada por Mérida-Velasco (Sura Trueba et al. 2005).

2.5.3. Teoría actual: origen endodérmico

Actualmente, ha surgido una nueva teoría que contradice lo que en su día se concluía en los estudios citados anteriormente, y que se basa en las siguientes investigaciones:

1.-Existen diferencias relevantes entre el tiroides de los mamíferos y el de otros vertebrados, como aves o peces. Según los estudios realizado por Yoko Kameda (Kameda 1984; Kameda et al. 1988), el rudimento UB en aves está situado cerca del esófago y es rodeado por el ganglio entérico. Desde fases tempranas de su desarrollo embrionario, el esbozo UB es invadido por células nerviosas que expresan tubulina (TuJ-1), HNK-1, que es un marcador de células nerviosas, encefalina y tiroxina hidroxilasa, enzima involucrada en la síntesis de catecolaminas que se expresa en células derivadas de las CN. Además, la glándula UB está ricamente inervada por fibras nerviosas que entran en contacto con la superficie de las células C que, en cultivos, presentan prolongaciones similares a las neuronas (Kameda, 1995). En ratones, sin embargo, el CUB no está en íntimo contacto con ganglios ni con paquetes nerviosos y las células C no expresan encefalina ni tiroxina hidroxilasa.

2.- Estudio con ratones transgénicos:

Ratones Cx43-lacZ: La conexina43 es una proteína que se expresa de forma elevada en las células de las CN. Para detectar dicha proteína mediante IHQ usando un anticuerpo anti- β -galactosidasa, se usan ratones transgénicos que llevan unido a la conexina el *reporter* Lac-Z, de esta forma se puede marcar fielmente la migración de las células de las CN (Lo et al., 1997; Waldo et al., 1999).

Como resultado de esta investigación, se demostró que en ninguna fase del desarrollo del CUB ni del tiroides se detectan células procedentes de las CN, éstas sin embargo, se distribuían en el mesénquima de los arcos faríngeos pero en ningún momento invadían el CUB.

Ratones Wnt1-Cre/R26R: mediante estos ratones doble transgénicos se estudia el destino a largo plazo de los derivados de las CN. Sólo se detectaron células

procedentes de las CN en el ganglio vagal distal, ganglio cervical, nervio vago, nervio simpático, músculo y mesénquima de los arcos faríngeos. En recién nacidos, se detectaron células derivadas de las CN en la arteria carótida común y en el tejido conectivo del tiroides, pero no en el parénquima. Esto sugiere que el CUB debe interactuar con el mesénquima de arcos faríngeos para asegurar su desarrollo normal (Kameda et al., 2007a)

3.- Mapa genético para derivados del endodermo con *Isl1*, *Hes1* y *Mash1*

Isl1-1 (*Isl-1*) marca células definitivas del endodermo pero no células de las CN. Como se comentó anteriormente, *Isl-1* y *TTF-1* se expresan en el primordio tiroideo y en el CUB. Una vez que el CUB se une al tiroides, la expresión de *Isl-1* disminuye en las células foliculares y se observan células *Isl-1*+ dispersas en el parénquima tiroideo, precisamente en el lugar que ocupan las células C (figura 17). El número de células *Isl-1*+ va disminuyendo a medida que aumenta la producción de CT por las células C y se sobreexpresa en el carcinoma medular de tiroides (Westerlund et al. 2008).

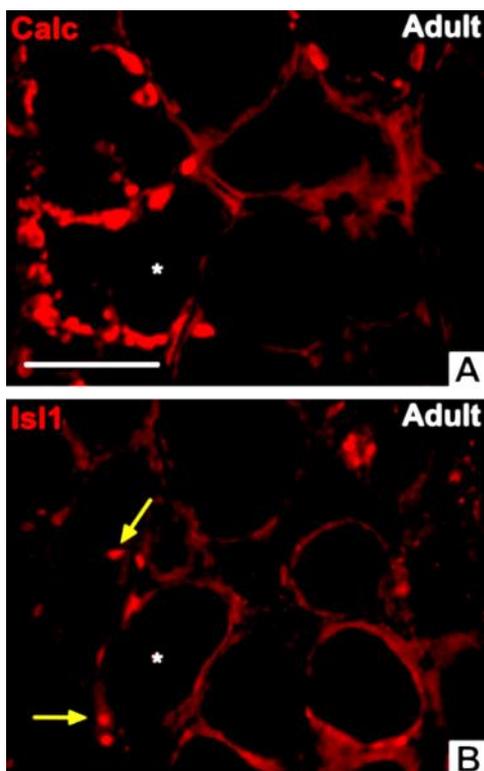


Figura 18.- Expresión de *Isl-1* en el tiroides adulto. A) numerosas células que expresan CT se encuentran dispersas en los folículos tiroideos. B) El número de células *Isl-1* + es mucho más escaso (Westerlund et al., 2008).

Hes1 es conocido en la regulación del desarrollo de diferentes órganos endocrinos derivados del endodermo, como el páncreas y las células neuroendocrinas del pulmón. En la organogénesis tiroidea se le atribuye una doble función, por un lado, el control

del número de tirocitos y células C progenitoras y, por otro lado, la expresión de Hes-1 es necesaria para la adecuada función endocrina de las células foliculares y de las células C (Carre et al., 2011).

Mash1 es un gen que juega un papel importante en la diferenciación de neuronas autónomas independientes de las CN. Como se ha visto anteriormente, durante el desarrollo embrionario de los órganos derivados de la faringe, se producen interacciones entre derivados mesenquimales de las CN y el endodermo faríngeo. El hecho de que Mash1 se exprese en el CUB durante su formación, migración y dispersión en el tiroides ocupando la posición de las células C y posteriormente disminuya, parece indicar que Mash1 puede ser el responsable de dotar a las células C de sus propiedades nerviosas, al igual que ocurre con las células endocrinas pancreáticas, de la médula adrenal o del pulmón (Kameda et al., 2007b).

4.- Expresión de cadherina-E en las células C: la cadherina-E es una proteína transmembrana que se localiza en los epitelios tanto ectodérmicos como endodérmicos y que juega un importante papel en el establecimiento de la polaridad celular y en el mantenimiento del fenotipo epitelial. Las células foliculares expresan altos niveles de cadherina-E en todos los estados de desarrollo y el CUB también la expresa durante su organogénesis. Mediante análisis con microscopía confocal en ratones recién nacidos, se ha observado que las células C, además de expresar CT a nivel citoplasmático, también expresan cadherina-E siguiendo un patrón de membrana, hecho que confirma su origen epitelial.

5.- Origen común de las células del SNED

Actualmente, hay numerosas evidencias que demuestran el origen no neural de las células endocrinas del intestino y de las células endocrinas del páncreas (Andrew, 1974; Andrew et al., 1998; Slack, 1995). Estas células, en algún momento deben compartir ciertas características con las neuronas, debido a que comparten factores de transcripción comunes durante la diferenciación de ambas poblaciones celulares. Al conjunto de características morfológicas comunes es a lo que se le denomina “fenotipo neuroendocrino” que se adquiere, por tanto, durante su diferenciación (Andrew, 1974). Las células C también presentan un fenotipo neuroendocrino y podrían compartir con el resto de células SNED un origen embrionario común.

3.- RESTOS ULTIMOBRANQUIALES

Se ha asumido que **la finalidad principal de la fusión del CUB con el tiroides en desarrollo** es transferirle a éste los precursores de las células C. Pero además de generar las células C, se ha comprobado que restos del CUB permanecen en el tiroides adulto como estructuras complejas que se consideran remanentes embrionarios del mismo.

En humanos, se acepta que los **SCN** proceden del CUB, sobre todo desde que Williams, Toyn y Harach, en 1989, realizaron un estudio para investigar los derivados del CUB antes de su fusión con el lóbulo tiroideo. Analizaron pacientes con tiroides que no habían descendido completamente y encontraron en el CUB estructuras quísticas con áreas solidas irregularmente distribuidas, que se asemejaban a los SCN y que mostraban tanto células positivas para CT como restos de coloide positivo para Tg (Williams, Toyn, & Harach, 1989).

En roedores, Wollman & Neve, demostraron mediante microscopía electrónica que las células del CUB, antes de su fusión con la vesícula tiroidea, tenían las mismas características ultraestructurales que las de las estructuras precursoras de los FUB que, como veremos a continuación, se encuentran en ratas recién nacidas (Wollman & Nève 1971b). Posteriormente, fueron Wollman y Hilfer (Wollman & Hilfer 1978) los que demostraron el origen UB de los **FUB**. Para ello aislaron, antes de su fusión, tejido del divertículo tiroideo y del CUB, los trasplantaron en diferentes cápsulas renales de ratones y les hicieron un seguimiento de su evolución durante varios meses. Posteriormente, los examinaron mediante microscopía electrónica y, de esta forma, comprobaron que a partir del trasplante de tejido del divertículo tiroideo, se formaron los típicos folículos tiroideos con coloide en su interior. Por el contrario, a partir del trasplante de tejido del CUB, se formaron folículos de pequeño tamaño con distintos tipos celulares, que compartían características ultraestructurales con las células del CUB (**células UB**), entre ellos células ciliadas, células con abundante retículo endoplasmático liso, células con muchos ribosomas libres y células C, que eran las mayoritarias. En el trasplante del CUB no se observó la aparición del típico epitelio folicular.

3.1. En roedores: folículos UB (FUB)

Son varios los trabajos que han descrito la morfología de los FUBs en roedores, principalmente en ratas (Van Dyke JH. 1944; Nève & Wollman 1971; Wollman & Nève 1971b; Wollman & Nève 1971a; Martín-Lacave et al. 1992).

3.1.1. Localización

Los restos UB, normalmente, **se localizan** en la zona central del lóbulo tiroideo, parcialmente embebidos entre los folículos tiroideos normales y en contacto con el tejido conectivo perivascular de la vena principal del lóbulo tiroideo.

3.1.2. Morfología

Respecto a la **morfología** de los FUB, se sabe que su tamaño y aspecto pueden cambiar según la edad. Algunos trabajos han estudiado el desarrollo y las propiedades de los restos UB en la vida postnatal de roedores. Posiblemente, el más completo, fue el trabajo que realizaron Wollman y Neve, en 1971 (Wollman & Nève 1971a), sobre ratas Fischer, en el periodo comprendido entre el nacimiento hasta el año de vida. Atendiendo a los resultados obtenidos en este trabajo, que posteriormente han sido corroborados por otros autores, **la morfología de los FUBs va evolucionando desde el nacimiento hasta la edad adulta** según las siguientes formas de presentación (figura 18).

En ratas recién nacidas, aparecen como estructuras celulares sólidas que se consideran precursoras de las demás formas y que son relativamente grandes respecto a los folículos tiroideos a esa edad. Estas agrupaciones celulares se van alargando y pueden dar lugar a otras estructuras en las que se puede observar una luz o cavidad central.

En ratas de al menos una semana de vida, los restos UB son más grandes y están compuestos por células pequeñas y con escaso citoplasma, que pueden presentar distintas apariencias:

- Estructura epitelial con forma de perla.
- Folículos pequeños en contacto con el tejido conectivo perivascular en las que se identifica un epitelio simple con desechos celulares en su interior.
- Folículos más grandes, normalmente con pared biestratificada, en la que las células de la capa externa son más pequeñas que el resto.
- Folículos con una apariencia mixta entre los folículos tiroideos normales y los FUB.

En ratas a partir de 30 días, los FUB se consideran maduros y su apariencia puede ser también variable, identificándose formas esféricas, tubulares y cilíndricas, que pueden ser ramificadas o curvas.

A partir del año, los folículos son de distintos tamaños y, normalmente, de apariencia quística, revestidos por un epitelio estratificado en el que las células apicales tienden a aplanarse con respecto a las basales.

En cuanto al **contenido luminal**, también se observan cambios entre las distintas formas. En las ratas más jóvenes, se aprecian restos celulares con núcleos picnóticos o fragmentados que desaparecen en unas semanas, mientras que en las de al menos dos meses de edad, se pueden ver folículos con material de desecho formado por restos celulares dispuestos en capas y apariencia nuclear heterogénea. En la parte central de la luz no hay núcleos, puede ser porque al evolucionar las formas menos desarrolladas hacia formas foliculares, desaparezcan las células del interior de los restos UB

alargados, o bien porque al multiplicarse las células de la pared, se produzca la descamación de las células más superficiales y los desechos se vayan depositando en el interior a medida que se van formando los folículos.

Los folículos mixtos son de especial interés y se describen como un tipo de folículo en los que en una parte de su epitelio se identifican células que tienen las mismas características morfológicas y estructurales que las células foliculares (células F) y, asociado a éste, se encuentra otra parte de epitelio donde mayoritariamente se identifican células UB. También pueden aparecer como un FUB tubular fundido con parte del epitelio folicular. En la luz de los folículos mixtos, igualmente, se distinguen desechos celulares, así como material de secreción mucínica PAS+.

En ratas de más de 6 meses de vida, es difícil diferenciar los folículos mixtos del resto del parénquima tiroideo, debido a que el epitelio de los folículos mixtos también puede ser simple. Una característica importante para poder diferenciarlos es la presencia de núcleos picnóticos en su luz.

La proporción de células F respecto a la de células UB en los folículos mixtos es variable, lo que sí parece probado es la funcionalidad de las células F, debido a que frecuentemente contienen gotas de coloide en su interior. Esto quiere decir que son capaces de reabsorberlo, al igual que ocurre con las células foliculares de los folículos tiroideos normales y, además, porque en la luz de los folículos mixtos, además de células descamativas, también se encuentra un material viscoso PAS+.

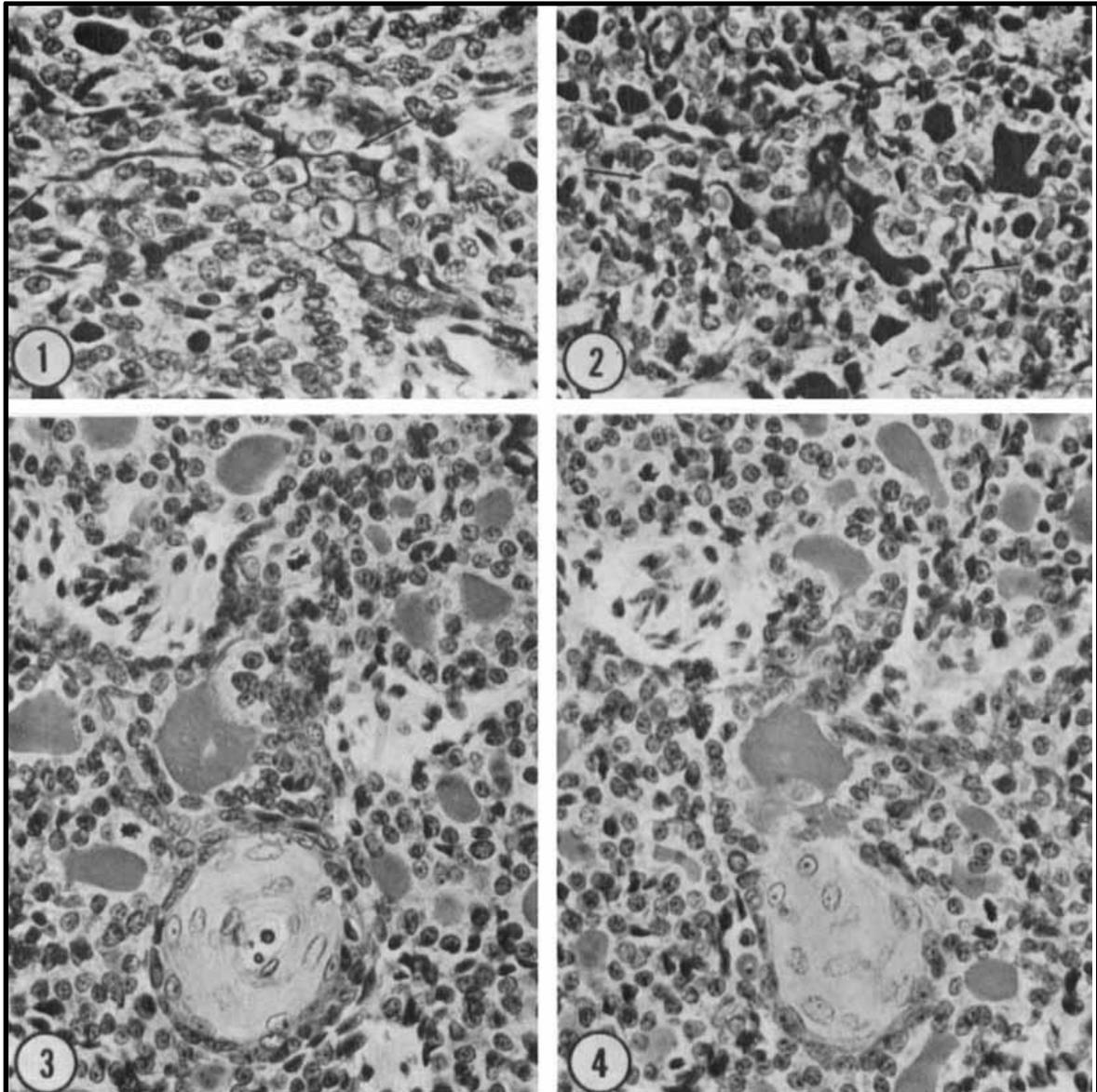


Figura 19.- Morfología de los FUBs en el tiroides de ratas jóvenes. 1) Nidos sólidos en una rata de 2 días; 2) Folículo alargado con coloide y restos celulares en el lumen en una rata de 2 días; 3-4) Secciones a distinto nivel de un FUB mixto en una rata de 7 días. El epitelio del FUB tiene forma de perla y está asociado al epitelio de un folículo tiroideo (Wollman & Nève 1971a).

3.1.3. Características ultraestructurales

Entre los restos UB de las ratas y de los ratones existen algunas diferencias ultraestructurales. Como ha sido expuesto anteriormente, en la rata, los FUB son en su mayoría quistes escamosos de células U; en el ratón, sin embargo, además de las células UB, pueden identificarse otros tipos celulares.

Las células UB en todas las formas de presentación de **los restos UB en la rata, mantienen características ultraestructurales similares.** En las formas maduras, las

células UB basales, a diferencia de las células foliculares normales, presentan hemidesmosomas en su membrana plasmática basal y pliegues de membrana entre las células vecinas. En su citoplasma se distinguen acumulaciones de filamentos en distintas zonas y en contacto con los hemidesmosomas, con un RER escaso aunque con abundantes ribosomas libres. Las células UB más apicales difieren, sin embargo, de las basales en que los filamentos citoplásmicos están dispersos de manera uniforme y en que presentan abundantes ribosomas libres (Calvert & Isler 1970; Nève & Wollman 1971).

El contenido luminal de los FUB, además de estar compuestos por un material similar al coloide de los folículos tiroideos, presenta un material relativamente denso sobre una fina red reticular que no se mezcla con el coloide y que cubre la superficie de las células descamadas y la zona apical de las células UB. Los restos celulares que se acumulan en la luz presentan un citoplasma muy electro-denso, que consiste en una malla de fibrillas con organelas desintegradas y vesículas con el mismo contenido luminal, que también se aprecian en las células UB más apicales. Este hallazgo sugiere que las células UB pueden ser células secretoras holocrinas.

En el ratón los FUB son relativamente grandes, de aspecto irregular y pueden aparecer parcialmente segmentados. Por sus características ultraestructurales se pueden distinguir cinco tipos de células en sus paredes (Wollman & Nève 1971b):

Células ciliadas: con cilios proyectados hacia la luz apical que son fácilmente observables debido a la heterogeneidad del contenido luminal.

Células F: son las típicas células foliculares tiroideas con microvellosidades y gran cantidad de RER.

Células C: distinguibles por sus características ultraestructurales, principalmente por presentar gran cantidad de gránulos secretores.

Células AR: también tienen actividad secretora, presentan vesículas secretoras, gránulos de glucógeno y abundante retículo endoplasmático liso.

Células UB: con características similares a las descritas en la rata, que se encuentran distribuidas entre las células AR y las células ciliadas.

El contenido luminal es similar al de los quistes UB de la rata, con material que forma una malla reticular con zonas PAS+, aunque presenta menos filamentos dispersos y su distribución es más heterogénea. Funcionalmente son activos, aunque el metabolismo del yodo es lento y, posiblemente, lo desempeñen las células foliculares asociadas.

3.1.4. Incidencia

En relación con la **frecuencia de presentación de los FUB** en los lóbulos tiroideos, se han publicado distintos trabajos. Hay autores, como Wollman y Nevé, que afirmaron que los FUB aparecen en todos los lóbulos estudiados y que, generalmente, se pueden

I

reconocer más de uno por lóbulo estando normalmente interconectados entre sí (Wollman & Nève 1971a). Sin embargo, para autores como Van Dyke (Van Dyke JH. 1944), los ratios de frecuencia son distintos según la edad de la rata: 15% para ratas jóvenes, 34,5% en ratas adultas y 61,9% en ratas viejas. En otro estudio morfológico que realizó Rao-Rupanagudi, se detectaron FUB en 1/3 de los tiroides de todos los animales examinados (Rao-Rupanagudi et al. 1992). Además, tanto este autor como Takaoka informaron que el número de FUBs disminuía con la edad (Takaoka et al. 1995).

En cuanto a la **incidencia según el género**, tanto Van Dyke como Rao-Rupanagudi concluyeron que los FUBs son más frecuentes en ratas hembras que en ratas macho sobre todo en las ratas de mayor edad. Esta afirmación no se puede contrastar con otros trabajos de investigación porque en el resto sólo se han empleado ratas macho.

3.2. En humanos: *Solid cell Nest (SCN)*

3.2.1. Localización

Los SCN se localizan en el estroma interfolicular, en el tercio medio-superior del lóbulo tiroideo y su posición anatómica es comparable con la posición que ocupan las células C en el tiroides (Harach 1988).

3.2.2. Morfología

Los SCN, normalmente, aparecen como estructuras irregulares de aproximadamente 1 mm de diámetro máximo y de **aspecto sólido** que están situadas entre los folículos tiroideos y delimitadas por una membrana basal. Están formados por células aplanadas eosinófilas y no queratinizadas entre las que no se observan uniones intercelulares (fig.20).

Se componen de dos tipos celulares:

Células principales o “main cells”: En cortes histológicos teñidos con H-E se ven como células de aspecto variable, que pueden ser poligonales, alargadas u ovaladas, con un citoplasma ligeramente eosinófilo y con sus límites celulares bien definidos. Los núcleos celulares ocupan una posición central y son de forma redondeada u ovalada, con membrana nuclear irregular, cromatina laxa y nucléolo evidente (Janzer et al. 1979).

Células C: se encuentran en menor proporción que las “main cells” y, normalmente, en la zona periférica de los SCN, siendo, además, de menor tamaño. Se caracterizan por presentar un citoplasma claro en el que destaca el núcleo redondeado y pequeño. El

citoplasma a veces se ve vacío al microscopio óptico y otras veces contiene muchas vacuolas y gránulos secretores finos (Cameselle-Teijeiro et al. 1994).

Ocasionalmente, además de las formas sólidas, junto a los SCN se pueden distinguir **estructuras quísticas, que pueden ser foliculares o tubulares**, y se asemejan a los folículos tiroideos, con un epitelio formado por las células principales descritas anteriormente. En estos casos las “*main cells*” forman un epitelio simple de células aplanadas con una cavidad central, en la que se observa un contenido luminal PAS + similar al coloide, con material mucínico asociado, con células descamativas y con sustancias de desecho (figura 20).

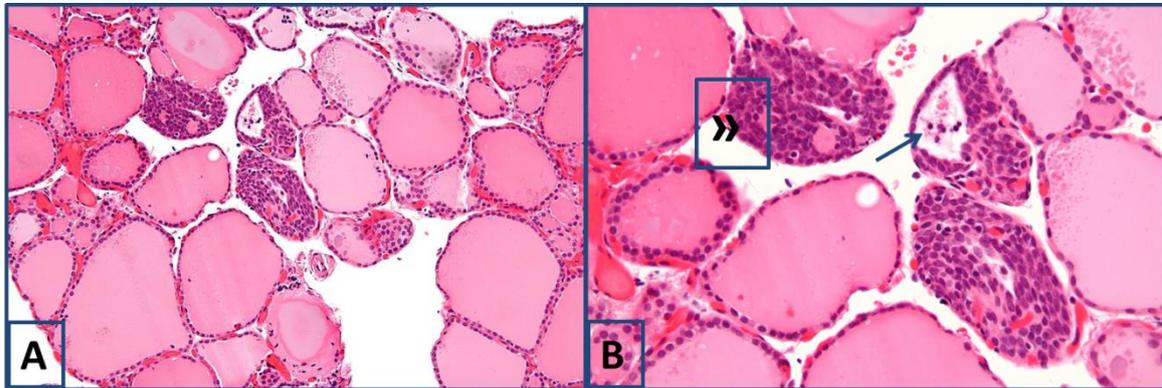


Figura 20.- Microfotografía que muestra los SCN en la glándula tiroidea humana. Los SCN pueden aparecer como formas sólidas (») y, ocasionalmente, como formas quísticas (→). A) (H-E) 200x; B) (H-E) 400x (Mizukami et al., 1994).

También pueden diferenciarse **folículos mixtos** formados, por una parte, por un epitelio estratificado plano de “*main cells*” y, asociado a éste, un epitelio simple de células foliculares cúbicas (Harach 1987). El contenido luminal de los folículos mixtos es similar al descrito anteriormente para los SCN quísticos (figura 21)

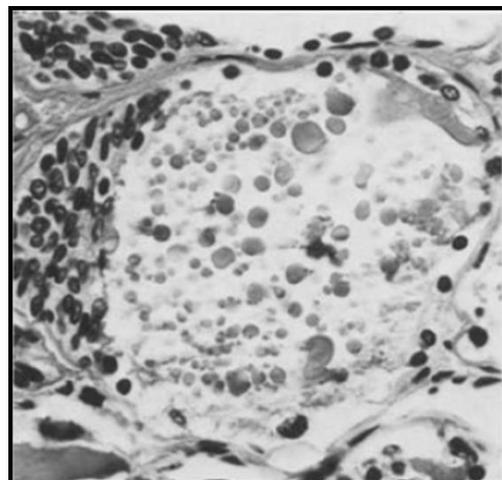


Figura 21.- Folículo mixto en una glándula tiroidea humana (Janzer et al., 1979).

3.2.3. Características ultraestructurales

En las formas sólidas, las “*main cells*” contienen numerosos tonofilamentos, estructuras similares a los desmosomas y, en algunos casos, se observan numerosos ribosomas libres. No se aprecia queratinización. El núcleo puede presentar grandes indentaciones y 1 o 2 nucleolos. En la periferia de los nidos sólidos y en algunos casos entre las “*main cells*”, se sitúan las células C, que se diferencian, principalmente, por mostrar en su citoplasma gránulos secretores electrodensos, con diámetro variable entre 100 y 250 nm, y por ser positivas para la CT.

En las formas quísticas, además de las características descritas, en algunas células se observan micro-vacuolas citoplasmáticas y cilios distribuidos en su superficie apical. En la luz se observan restos celulares, agrupaciones de vacuolas ovoides con contenido claro y en, algunos casos, con células linfoides asociadas. Todas estas características ultraestructurales confirman la **naturaleza secretora de los SCN** (Martin et al. 2000).

3.2.4. Frecuencia

Los SCN pueden encontrarse en un solo lóbulo o, también, bilateralmente e, incluso, puede haber más de uno por lóbulo tiroideo.

En cuanto a la **frecuencia** de aparición de los SCN, existe cierta controversia, ya que hay autores que describen una mayor incidencia en hembras, con ratio 1:6 macho/hembra, lo cual relacionan con la alta frecuencia relativa de lesiones tiroideas en mujeres (Fraser & Duckworth 1979; Cameselle-Teijeiro et al. 1994).

Otros autores (Harach 1988; Mizukami et al. 1994) detectan SCN en un porcentaje bajo de muestras en exámenes rutinarios pero afirman que su frecuencia se elevaría al aumentar el número de secciones estudiadas. Por lo tanto, se esperaría que los SCN estuvieran presentes en todas las glándulas tiroideas, al igual que podría ocurrir con los FUB en roedores.

3.3. En otras especies de mamíferos

Además de en el hombre y en la rata, se han identificado restos UB en otros vertebrados, que han recibido distintas denominaciones según la especie y se conocen algunas características de cada uno de ellos que se exponen a continuación.

3.3.1. En el perro: “complejos de células C”

Los restos UB que se localizan en la glándula tiroidea del perro se denominan “**complejos de células C**”. Normalmente se describen como islotes de células, aunque

en algunas ocasiones también pueden adoptar una forma quística con una pared formada por un epitelio simple de células cúbicas, o bien, estratificado con células planas (Kameda 1987; Y. Kameda 1971).

Los “complejos de células C” contienen cuatro tipos de células en distintas proporciones:

1) Células foliculares, positivas para Tg; 2) Células C, positivas para CT, NSE y CGRP; 3) células estrelladas o cúbicas, que aparecen en las formas quísticas y que son positivas para SS; 4) Células indiferenciadas, negativas para todos los antígenos nombrados anteriormente (Leblanc et al. 1990).

A los “complejos de células C” se les atribuye un origen UB, basándose en la similitud que muestran con unas masas celulares que aparecen en el CUB de los perros durante su desarrollo embrionario (Godwin MC 1937).

3.3.2. En toros: “remanentes UB”

En el toro, “los remanentes UB” pueden aparecer como: 1) restos sólidos, formados por células indiferenciadas que pueden dar lugar a células inmunorreactivas para Tg o en células inmunorreactivas para CT o SS; 2) estructuras foliculares, con formas quísticas o tubulares, en cuya pared se identifican células positivas para Tg y otras positivas para CT (Ljungberg & Nilsson 1985).

Los restos UB de la glándula tiroidea de los toros pueden sufrir cambios proliferativos que dan lugar a una extensa patología.

3.3.3. En el bisonte: “FUB”

Los FUB en el bisonte europeo, se encuentran distribuidos entre el parénquima tiroideo normal, rodeados de abundante tejido conectivo y pueden presentar tamaño, aspecto y contenido luminal variables. En la pared de estos FUB se pueden detectar células C (Sawicki B 1991). De manera simultánea, es frecuente encontrar agregados sólidos celulares (SCN) (Sawicki B 1997), en los que, mediante IHQ, se detectó una población celular heterogénea, con células inmunoreactivas para CT, CGRP, NSE o SS y, también, se identificaron células poco diferenciadas en un número variable (Sawicki & Zabel 1997).

3.3.4. En el zorro: “folículos inusuales”

Las características morfológicas de los “folículos inusuales” en el tiroides del zorro son similares a las descritas para otros mamíferos, incluidas las ratas. Se aprecian folículos quísticos, tubulares o alargados, rodeados de una cápsula de tejido conectivo, revestidos por una pared estratificada de células planas o cúbicas y con células descamativas en el lumen. La peculiaridad principal es que en la pared de estos

folículos se identifican células C mediante IHQ. En algunas ocasiones, también se encuentran folículos mixtos en los que los folículos inusuales mantienen continuidad con algún folículo tiroideo adyacente (Srivastav & Swarup 1982).

3.3.5. En la cobaya: “S follicles”

La “segunda clase de folículos tiroideos” o “S follicles” del tiroides de la cobaya, se localiza en el centro de la parte superior del lóbulo tiroideo rodeada de tejido conectivo. Estas estructuras están compuestas por una población celular heterogénea. Los “S follicles” pueden dividirse en tres partes (Juhl 1981b; Juhl 1981a):

- Una parte superior de forma tubular formada por un epitelio simple de células S (*S-follicles cells*), que contienen vesículas pinocíticas y hemidesmosomas en la membrana plasmática basal. Además, se localizan células C.
- Una parte media irregular, que primero tiene una forma tubular que después se ensancha. En esta parte existen áreas de contacto con los folículos tiroideos adyacentes y se pueden identificar células foliculares en su pared. Además de las células S, se distinguen células oscuras, células con gránulos citoplasmáticos, células ciliadas y células C (Juhl 1981a).
- Una parte inferior que en las cobayas jóvenes tiene forma folicular con una cavidad central, mientras que en las adultas esta cavidad desaparece y resulta muy difícil distinguirla de los folículos tiroideos adyacentes.

3.4. En vertebrados no mamíferos

Como se ha descrito anteriormente, **en los vertebrados no mamíferos** el último par de bolsas faríngeas no se fusiona con el tiroides, sino que permanece como una estructura independiente, que se denomina **glándula UB**.

En la aves la glándula UB está situada delante del esófago y se dispone como un cuerpo compacto que consiste en agrupaciones sólidas de células C entre un estroma conectivo.

En la glándula UB adulta, las células C forman grupos celulares de distintos tamaños diseminados entre el tejido conectivo y se identifican unas estructuras quísticas que aumentan con la edad y que se denominan **quistes UB**. Los quistes UB presentan aspecto, tamaño y contenido luminal variables (Sehe 1965; Y. Kameda 1984).

Se han realizado distintos estudios mediante microscopía electrónica e IHQ, con el fin de investigar las características ultraestructurales y el significado funcional de estos quistes, con especial atención a la presencia de células C y a su posible actividad secretora (Ito et al. 1986).

Los quistes UB están formados por un epitelio estratificado de células planas o cúbicas, con un contenido luminal de aspecto coloidal, con vesículas de secreción y desechos celulares. Se confirmó la presencia de células C en la pared de los quistes UB, con numerosos gránulos secretores que almacenaban CT y, además de las células C, se encontraron células con microvellosidades proyectadas hacia la luz.

Puesto que los quistes aumentaban progresivamente en volumen y en número con la edad, se sugirió que además de tener una función secretora, podían jugar un papel en el almacenamiento de productos hormonales en exceso o que no fueran necesarios (Kameda, 1984).

3.5. Marcadores IHQ de los restos UB

3.5.1. Marcadores IHQ de los FUB

Los trabajos de investigación publicados sobre los marcadores IHQ de los FUBs en ratas, son escasos e incompletos.

Los estudios IHQ más relevantes, hasta el momento, han sido los realizados por investigadores de nuestro Departamento en ratas Wistar de distintas edades (Conde et al. 1992), con la finalidad de comprobar si en la pared de los FUB se identificaban células positivas para Tg y para CT. Sólo se localizaron células aisladas inmunorreactivas para CT en las formas sólidas de los FUB presentes en una rata de 5 días (Martin-Lacave, Conde, Moreno, et al. 1992), mientras que en los folículos de ratas de mayor edad, normalmente quísticos, no se localizó ninguna. A todas las edades estudiadas, los restos UB presentaron microfóliculos PAS+ y, en algunos FUB, células inmunorreactivas para Tg. A partir de estos resultados, estos autores lanzaron la hipótesis del doble origen embrionario de las células foliculares, UB y endodérmico, que ya habían sugerido en anteriores publicaciones, donde demostraron que los FUB presentaban un perfil glucoproteico similar al de las células foliculares (Moreno et al. 1989).

3.5.2. Marcadores IHQ de los SCN

Identificar convenientemente los SCN representa un reto para los especialistas en tiroides por su posible confusión con algunas patologías tiroideas.

Se han realizado diversos estudios IHQ para caracterizar las células que integran los SCN. Concretamente, se ha demostrado que las células principales de los SCN o "*main cells*" son inmunorreactivas para algunas citoqueratinas, CEA, p.63, bcl-2, y ki67. Sin embargo, carecen de inmunoreactividad para TG, CT, CGRP y TTF-1 (Cameselle-Teijeiro et al. 1994;Harach 1988; Reis-Filho et al. 2003; Rios Moreno et al. 2011) (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de los resultados IHQ sobre SCN publicados hasta la fecha

	CITOQUERATINAS (CK)				CEA	TG	CT	CGRP	p63	bcl-2	TTF-1
	34 β E12	AE1/ AE3	CAM5.2	CK7							
CF	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
CC	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
SCN	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-

CF, células foliculares; CC, células C; 34 β E12 (CKs 1,5,10 y 14); AE1/AE3 (CKs 1, 2,10,11 y 14); CAM5.2 (CKs 8 y 18); Tg, tiroglobulina; CT, calcitonina; CGRP, péptido relacionado con el gen de la CT.

Aunque, inicialmente, la evaluación histológica de los SCN, basada en la determinación IHQ con CEA y citoqueratinas epidérmicas, parecía suficiente para diferenciarlos correctamente, sin embargo, debido a que estos dos marcadores también lo expresan algunos carcinomas neuroendocrinos, fue necesario identificar otros marcadores específicos de los SCN.

Seguidamente se van a tratar aquellos marcadores de más interés:

Citoqueratinas: los filamentos intermedios son los elementos más resistentes del citoesqueleto, forman una red que rodea al núcleo y que se extiende hacia la periferia celular hasta interactuar con la membrana plasmática. De éstos, **las citoqueratinas** forman el grupo de filamentos intermedios más diverso, pues está constituido por numerosas clases de proteínas fibrilares y que se distribuyen entre las distintas células de estirpe epitelial. La misión de las citoqueratinas es la de proporcionar resistencia mecánica a la célula, regular la localización de las proteínas y participar en la transmisión de señales intracelulares.

La composición de subunidades de citoqueratinas puede ser extremadamente heterogénea, variando con dependencia de la localización anatómica, el crecimiento celular, el ambiente, el estado de diferenciación y el momento de desarrollo embrionario.

Se conocen 20 tipos de citoqueratinas que se clasifican según su peso molecular y, actualmente, según su punto isoeléctrico. Las citoqueratinas se han clasificado en dos subfamilias, una que comprende las CKs 1-8 y otra las CKs 9-20, requiriéndose un miembro de cada grupo para la formación de cada filamento de queratina. Además, existen diversas isoformas de las mismas, lo que supone la existencia de un mayor número de queratinas y una expresión propia para cada tejido o tipo celular, lo que conlleva cierta especificidad funcional (Painter et al. 2010).

Se ha establecido que las citoqueratinas de bajo peso molecular se encuentran en los epitelios simples, las de peso molecular intermedio en los epitelios estratificados, y las de alto peso molecular en los epitelios queratinizados, aunque su expresión puede verse afectada por factores ambientales o por cambios patológicos (Steinert & Roop 1988; Martin Lacave. I; Garcia Caballero T. 2012)

El empleo de anticuerpos anti-CKs es de gran utilidad para la identificación de las células principales de los SCN, en concreto para las **citoqueratinas de alto peso molecular**, pues no están presentes en las células foliculares ni en las células C (Harach & Wasenius 1987; Harach 1988).

El factor de transcripción nuclear p63 es miembro de la familia del gen p53 y presenta con éste homología estructural. Pertenece a la familia de supresores tumorales p53, que tienen la capacidad de actuar regulando la progresión del ciclo celular, manteniendo la capacidad proliferativa o induciendo apoptosis, en función del estímulo ambiental recibido por la célula. Resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el ADN dañado, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. p53 es ubicuo (se expresa en todos los tejidos), mientras que p63 presentan especificidad tisular.

La expresión de p63 es específica para las *“main cells”* de los SCN y no se expresa en carcinomas diferenciados de tiroides como son el carcinoma papilar y el carcinoma medular. Por ello se considera que p63 es un marcador efectivo para distinguir los SCN de otras patologías tiroideas.

El factor de transcripción TTF-1, como se ha descrito anteriormente, se considera un marcador de células diferenciadas, tanto de las células foliculares como de las células C, mientras que las *“células principales”* de los SCN carecen de marcaje para TTF-1 (Reis-Filho et al. 2003).

3.6. Patología tiroidea asociada a los restos UB

En diversos mamíferos, ocasionalmente, los restos UB presentes en el tiroides pueden sufrir alteraciones proliferativas, dando lugar a formaciones que se consideran patológicas.

Concretamente, en el toro, los remanentes UB pueden experimentar cambios hiperplásicos o neoplásicos que afectan a sus componentes epiteliales y que derivan en el denominado *“tumor UB”*. **El tumor UB en toros**, es una estructura compleja que exhibe un patrón sólido y, ocasionalmente, puede contener folículos tiroideos entre las masa de células UB. Su tamaño y frecuencia aumenta con la edad. Están integrados por una población celular heterogénea formada, principalmente, por células poco diferenciadas, células positivas para la Tg y una proporción baja de células C (Capen &

Black 1974; Ishimura & Fujita 1979; Ljungberg & Nilsson 1985). Cuando el tumor UB llega a invadir estructuras adyacentes, se denomina carcinoma UB y podría originar metástasis en los ganglios cervicales o en los pulmones del toro (Harmon & Kelley 2001a).

Se han descrito Hallazgos similares en la glándula tiroidea del **caballo**, en los que los **remanentes UB** se presentan como agregados celulares con células positivas para Tg y para CT. Estos agregados pueden localizarse, o bien entre los folículos tiroideos normales sin que se aprecie compresión del tejido folicular adyacente, o bien como estructuras que derivan de una hiperplasia nodular de los remanentes UB y que comprimen a los folículos tiroideos adyacentes; o, finalmente, como adenomas de los remanentes UB rodeados de una cápsula fibrosa (Turk et al. 1983; Tateyama et al. 1988).

Por otro lado, en ratas tratadas con un aporte extra de vitamina A, se reconocieron unas estructuras quísticas de gran tamaño que, en algunos casos, presentaban capacidad invasiva, a las que se denominaron **cistoadenomas tiroideos** (Van Dyke JH. 1944). Estas estructuras se identificaron, especialmente, en las ratas viejas y se consideró que se originaban a partir de los remanentes UB descritos en estas ratas (Van Dyke JH. 1944).

Por último, en el tiroides humano, se ha descrito la existencia de alteraciones patológicas que se presentan asociadas a los SCN (Cameselle-Teijeiro et al. 1994), como pueden ser:

- Áreas con hiperplasia de células C.
- Microquistes con material granular eosinófilo en el contenido luminal.
- Focos de cartílago maduro en íntimo contacto con los SCN.
- Focos de células que expresan NSE alrededor de los SCN.

Además, los SCN presentan características morfológicas que les asemejan a diversas patologías tiroideas como son la hiperplasia de células C, los focos celulares presentes en la tiroiditis de Hashimoto o las micro-metástasis de tiroides e, incluso, algunos carcinomas tiroideos. Distintos estudios tratan de esclarecer la posible relación entre los restos UB y algunos carcinomas tiroideos, como los carcinomas mixtos de tiroides y los carcinomas mucoepidermoides, basándose en que estas patologías presentan características intermedias entre el carcinoma folicular y el carcinoma medular, pudiendo tener un origen común (Kato R et al. 1990; Cameselle-Teijeiro et al. 1995; Ueki et al. 2011). En todos estos casos es necesaria una tipificación IHQ para establecer un diagnóstico diferencial (Harach 1988).

4. CÉLULAS MADRES. “Stem cells”

Las células madres son células dotadas simultáneamente de la capacidad de auto-renovación (es decir, producir más células madres) y de originar células hijas comprometidas en el proceso de desarrollo, que se convertirán finalmente por diferenciación en tipos celulares especializados tanto de forma morfológica como funcional. Todas las células madres pueden auto-renovarse (hacerse copia de ellas mismas) y diferenciarse (convertirse en células más especializadas), sin embargo, las células madres son muy variables en su comportamiento según las circunstancias biológicas (fig.22) (Kørbliing & Estrov 2003; Rosenthal 2003).

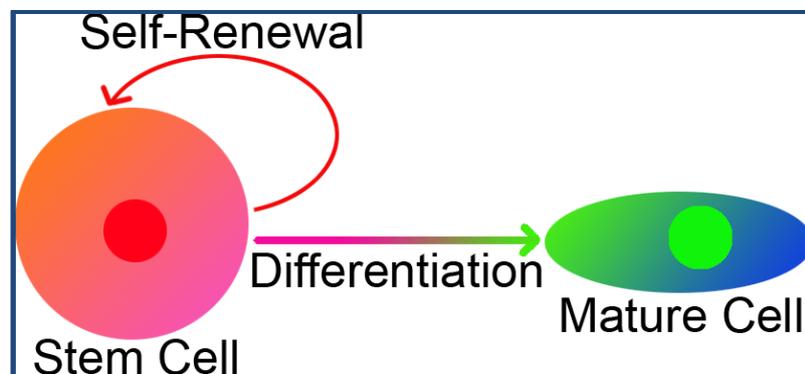


Figura 22.- Esquema que representa las características que definen a las células madre (International society for stem cell research (ISSCR)).

4.1. Tipos de células madres

Las células madres pueden clasificarse en tres grupos: células madres embrionarias (*embryonic stem cells*), células madres fetales y células madres adultas o progenitoras (*stem cells*).

1.-Las células madres embrionarias (ESC) son células indiferenciadas derivadas del embrión en fases muy tempranas del desarrollo, en concreto, en el estado de blastocito. Presentan una elevada plasticidad, esto significa que según el microambiente hormonal y según la acción de los factores de transcripción a los que estén expuestas, pueden dar lugar a cualquier célula de nuestro organismo (Thomson et al. 1998).

2.-Las células madres fetales se encuentran en todos los órganos y tejidos durante el desarrollo embrionario.

3.- Las células madres adultas o somáticas (SSC) son células poco diferenciadas que mantienen la capacidad de autorrenovarse y de originar todo tipo de células especializadas del tipo de tejido en el que se originaron, como por ejemplo las de la piel, la médula ósea o las gónadas masculinas (Verfaillie et al. 2002; Kørbling & Estrov 2003).

Las células madres también se clasifican dependiendo de su potencial de diferenciación, es decir, según los diferentes tipos celulares que sean capaces de producir (Weissman et al. 2001; Prósper & Verfaillie 2003).

Se denominan **totipotentes** cuando pueden crear cualquier célula del individuo, incluidas las que forman los tejidos extra-embriónicos como el corion, la bolsa amniótica y la placenta (fig.23).

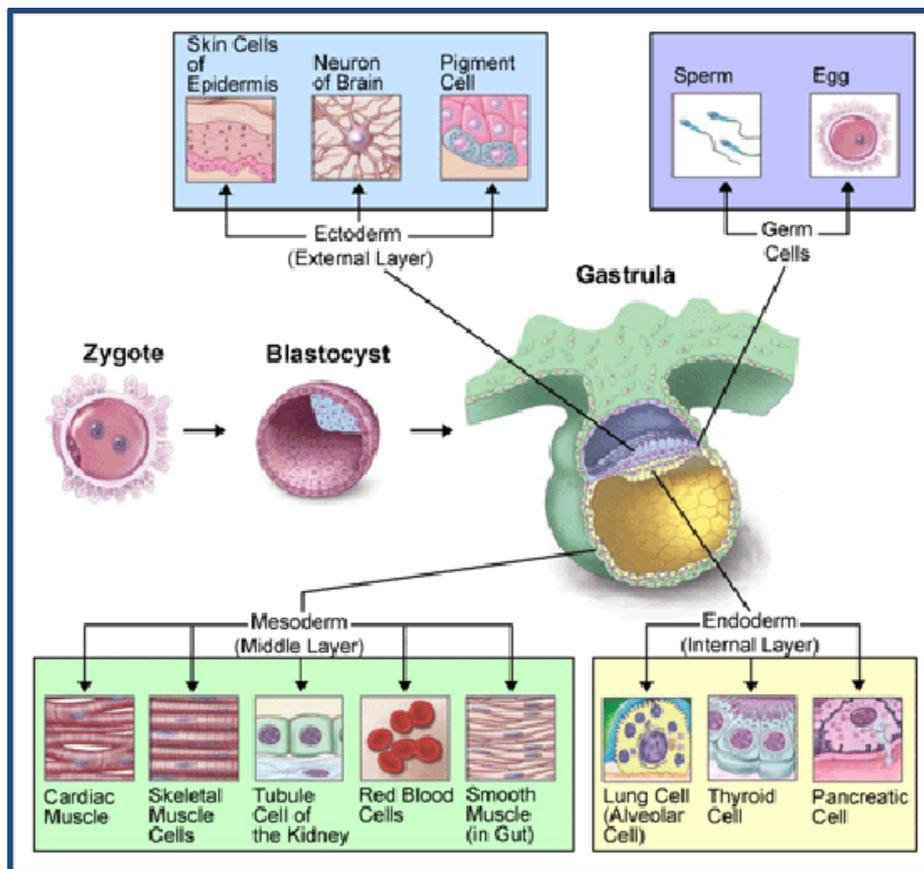


Figura 23.- Esquema que representa la capacidad de las células totipotentes para convertirse en cualquier célula del organismo (National Institute of health (NIH)).

Las células madres **pluripotentes** tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos que procedan de las tres capas embrionarias, aunque estas células por sí solas no puedan producir un individuo.

En la categoría siguiente están las células madres **multipotentes**, que pueden diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, lo que las capacitaría para la formación de tipos celulares diferentes, pero no de todos.

En un orden jerárquico inferior se situarían las **células madres unipotentes**, que son aquellas que sólo pueden diferenciarse en un tipo celular concreto, y que han sido clasificadas en algunos trabajos como células en tránsito, células progenitoras comprometidas, o células precursoras. Finalmente, se encuentran las células **diferenciadas**, que son las que han alcanzado una plena maduración y una actividad funcional específica (fig.24).

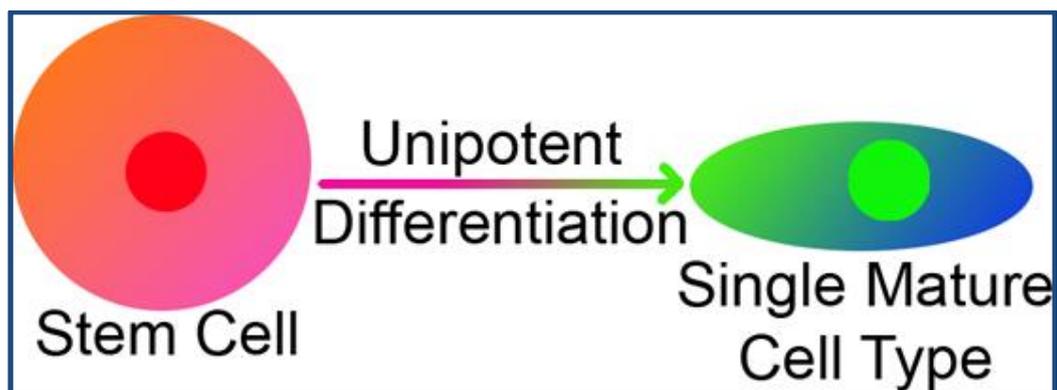


Figura 24.- La célula unipotente sólo da lugar a un tipo de célula madura (International society for stem cell research (ISSCR)).

4.2. Células madres en el tiroides

El tiroides es un órgano de baja proliferación y, a pesar de eso, mantiene un tamaño constante en condiciones fisiológicas normales. Esta capacidad de renovación de la glándula, puede justificarse a través de la presencia de una población de células madres que puedan responder a estímulos proliferativos. Situaciones de malnutrición, deficiencias de yodo, destrucción o necrosis de tejido tiroideo, pueden servir de estímulo fisiológico o patológico que conduzcan a la proliferación de las células madres del tiroides (Gibelli et al. 2009).

Las células madres del tiroides, han sido menos estudiadas en comparación con las de otros órganos, posiblemente, porque las enfermedades más comunes tiroideas, como el hipotiroidismo, se tratan adecuadamente con terapias estandarizadas. A pesar de esto, en los últimos años y animados por los resultados obtenidos en otros órganos, se han realizado distintas investigaciones sobre ellas.

Según dichos estudios, en el tiroides se pueden distinguir dos tipos de células madres, **las células madres embrionarias (ESC) y las células madres adultas o somáticas (SSC)**.

Son varias las investigaciones en las que se han logrado aislar ESC a partir de glándulas tiroideas de ratones, pero lo más relevante ha sido el hecho de conseguir generar tiroides funcional a partir de cultivos de células ESC.

Lin et al, en el año 2003 (Lin et al. 2003), sembraron ESC de ratones y tras dos semanas de tratamiento con TSH, consiguieron aislar células con características similares a los tirocitos, que expresaban marcadores de diferenciación tiroidea como son Tg, NIS, TPO, y TSH-R. Aún más concluyente fue la investigación realizada en 2012 por Antonica, en ratones, (Antonica et al. 2012), que le llevó a afirmar que **las ESC pueden dar lugar a células foliculares *in vitro* y generar tiroides funcional**. Los factores de transcripción TTF-1 y PAX-8 son suficientes para dirigir la diferenciación de las ESC en células organizadas en estructuras foliculares tridimensionales, cuando son tratadas con tirotropina. Estos folículos mostraron una significativa actividad para la organificación del yodo y, lo más importante, cuando se injertaron en ratones con una función tiroidea disminuida, se recuperaron los niveles plasmáticos de hormonas tiroideas, con la consecuente recuperación sintomática.

La investigación sobre las SSC, se desarrolló como alternativa a las ESC debido a los problemas éticos surgidos con éstas. Las SSC se detectaron hace algunos años en el tiroides por Dumont (Dumont et al. 1992), quien aisló **células madres en el tiroides adulto** y manifestó que se encontraban en una ratio 1:1000.

Las SSC del tiroides pueden ser de dos tipos, por un lado, están las **SSC universales**, que son células progenitoras derivadas de la médula ósea que acuden al tiroides atraídas por factores como las citocinas en respuesta a una lesión. Por otro lado, están las **SSC residentes**, también denominadas en algunos trabajos como células SP (*side population cells*).

Las SSC residentes se han aislado a partir de tiroides tanto humanos como de ratones. **En el hombre**, a partir de una muestra de bocio, se aislaron células adultas que expresaban marcadores de células madres (que se describen en el siguiente apartado) y marcadores de células derivadas del endodermo, como GATA-4 y HNF4- α , así como los factores de transcripción TTF-1 y PAX-8, por lo que estas células se consideraron las SSC del tiroides (Thomas et al. 2006). Lan et al, en 2007, consiguieron aislar SSC en cultivos derivados de bocio humano y diferenciarlas *in vitro* en células tiroideas que formaban tiroferas, mediante inducción con suero enriquecido con TSH. Estas células también expresaron mRNA para PAX8, Tg, NIS, TSH-R y TPO (Lan et al. 2007; Fierabracci et al. 2008).

En el ratón, igualmente, se han identificado SSC residentes del tiroides, concretamente se aislaron células con características de células madres en tiroides normales de ratones y, al sembrarlas en un gel tridimensional de colágeno, crecieron como tiroferas que expresaban marcadores de diferenciación terminal tiroidea (Hoshi et al. 2007).

También se han conseguido identificar células con características de células madres en cultivos de células cancerígenas de tiroides (Mitsutake et al. 2007). Estas células expresan marcadores de células madres, pero no llegan a expresar marcadores de diferenciación tiroidea. Se piensa que podrían ser una subpoblación de células madres adultas, a las que se denomina **“cáncer stem cells”**, y que podrían ser las responsables de iniciar la proliferación de las células tumorales y de la resistencia celular a la terapia contra el cáncer (Günes & Rudolph 2013).

Varios autores, basándose en estudios IHQ, **han propuesto a las células principales de los SCN o “main cells”, como la fuente de células madres residentes del tiroides adulto** (Reis-Filho et al. 2003; Rios Moreno et al. 2011).

Reis-Filho et al, en el año 2003, (Reis-Filho et al. 2003) y Burstein et al, en el año 2004, (Burstein et al. 2004), fueron los primeros en introducir la idea de que las “*main cells*” pueden poseer capacidad de autorrenovación y de diferenciación en más de un tipo celular e, incluso, de que pueden actuar como células madres cancerígenas. Esta afirmación la realizan basándose en la capacidad de las **células basales y parabasales de los SCN** para expresar **p63**, al igual que ocurre en otros epitelios, como en el epitelio bronquial, siendo sin embargo, negativas para marcadores de células diferenciadas tiroideas como Tg y CT. Posteriormente, otros autores también han apoyado esta idea (Preto et al. 2004; Cameselle-Teijeiro, Preto, et al. 2005).

4.3. Marcadores IHQ de las células madres tiroideas

Se conocen distintos marcadores cuya expresión se asocia con células que muestran fenotipo de células madres. Entre ellos, hay algunos que se han descrito en los SCN. A continuación, se nombran los marcadores más importantes y algunos de los estudios en los que se demostró su expresión a nivel de los SCN.

Ki-67: es un marcador de proliferación celular que se expresa en células madres y, también, lo expresan las células principales de los SCN (Preto et al. 2004).

OCT-4: es un marcador específico de “*stem cells*” que se expresa en las células SP (*side population*) aisladas del tiroides de ratón (Hoshi et al. 2007). Posteriormente, se demostró que, en algunos casos, las células principales de los SCN también eran positivas para OCT-4 (Rios Moreno et al. 2011).

bcl-2: es un marcador de células con alto potencial de diferenciación hacia células especializadas, su sobreexpresión también se ha asociado a las células con fenotipo de células madres. Las células principales de los SCN mostraron una fuerte reactividad citoplasmática para bcl-2 (Preto et al. 2004; Cameselle-Teijeiro, Abdulkader, et al. 2005; Rios Moreno et al. 2011).

Proteína 3 nucleolar: esta proteína se expresa en los nucléolos de las células madres adultas del SNC, células primitivas de la médula ósea, células madres embrionarias y en varias líneas celulares tumorales de tiroides (Preto et al. 2004).

Telomerasas: estas enzimas intervienen en el control de la integridad genómica y de la carcinogénesis (Preto et al. 2004; Günes & Rudolph 2013).

Citoqueratinas de alto peso molecular: en las últimas investigaciones se habla de un nuevo papel de los filamentos intermedios y, en concreto, de este tipo de citoqueratinas, relacionado con su intervención en la regulación de la síntesis proteica, siendo esenciales para el crecimiento celular y para la diferenciación de las células epiteliales (Kim et al. 2006). Algunas citoqueratinas también son un marcador importante de las células basales o indiferenciadas de los epitelios (Reis-Filho et al. 2003; Cameselle-Teijeiro et al. 1995; Rios Moreno et al. 2011).

p63: Juega un papel importante en la ruta de diferenciación de líneas celulares específicas y se expresa consistentemente en células madre de distintos epitelios. p63 induce la expresión de citoqueratinas y de otros genes asociados con la diferenciación epidérmica terminal. Por lo tanto, juega un papel importante en el mantenimiento de las poblaciones de células basales (Burstein et al. 2005; Cameselle-Teijeiro, Abdulkader, et al. 2005).

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

1.- Planteamiento del tema

Desde que Van Dyke, en 1944, describiera los FUB en el tiroides de la rata, distintos trabajos han analizado la morfología de estos restos embrionarios. Como se ha expuesto anteriormente, el más completo fue el que realizaron Wollman y Nevé en 1971 (Wollman & Nève 1971b), quienes describieron los FUB en ratas desde el nacimiento hasta el año de vida. Por los conocimientos adquiridos de los estudios publicados, se conoce la evolución que pueden presentar estos restos UB según la edad de la rata, pero el periodo de vida estudiado es insuficiente pues no cubre la segunda parte de la misma. Además, en estos trabajos, no se han estimado las medidas de los FUB en ninguna de sus formas de presentación, por lo que no se conoce cómo evolucionan en tamaño y, tampoco, la relación de su tamaño respecto a los folículos tiroideos normales.

En cuanto a la incidencia o frecuencia de presentación de los FUB a nivel del tiroides, no hay uniformidad de resultados entre los distintos trabajos, debido a que hay autores que afirmaron que los FUB se podían encontrar en todas las glándulas estudiadas (Wollman & Nève 1971a), otros que el porcentaje variaba según la edad de la rata (Van Dyke JH. 1944), y otros que decían que la incidencia de los FUB disminuía a medida que la rata crecía (Rao-Rupanagudi et al. 1992; Takaoka et al. 1995). Igualmente, son muy pocos los estudios que han valorado la incidencia de los FUB según el género, porque en casi todos se han empleado ratas macho.

Por otro lado, los estudios IHQ publicados sobre los FUB en ratas son casi inexistentes, sin embargo, tanto en el hombre como en otras especies de mamíferos, los restos UB han sido convenientemente caracterizados mediante IHQ (Ríos Moreno et al. 2011; Reis-Filho et al. 2003).

Además, debido a la dificultad para diferenciar los FUB del resto del parénquima tiroideo, es necesario identificar un marcador específico de éstos, sobre todo, para aquellos que aparecen como restos sólidos dispersos en el parénquima tiroideo.

Los restos embrionarios UB presentes en el tiroides humano (SCN) y en el de la rata (FUB), tienen un origen embriológico común. En ambas especies diversos estudios han demostrado que proceden del CUB. En humanos, Williams, Toyn y Harach en 1989, lo demostraron mediante el estudio de los derivados del CUB antes de su fusión con los lóbulos laterales en desarrollo (Williams et al. 1989); en ratas, Wollman y Neve en 1971, demostraron que las características ultraestructurales de las células del CUB antes de su fusión con la vesícula tiroidea, son las mismas que las que presentan las estructuras precursoras de los restos UB (Nève & Wollman 1971). Posteriormente, Wollman y Hilfer en 1978, confirmaron el origen UB mediante el trasplante, y posterior

seguimiento, de tejido tiroideo y del CUB embrionarios sobre la cápsula renal de ratones (Wollman & Hilfer 1978). Si bien los remanentes UB presentaban similitudes en cuanto a la frecuencia y la localización, también había diferencias en la apariencia de estos restos entre ambas especies.

Se sabe que el tiroides es un órgano de baja proliferación y, a pesar de eso, en el adulto mantiene un tamaño constante en condiciones fisiológicas. Esta capacidad de renovación de la glándula se debe, principalmente, a que tanto las células foliculares como las células C conservan la capacidad de dividirse por mitosis, no obstante, también puede justificarse a través de la presencia de una población de células madres que puedan responder a estímulos proliferativos. Son varios los autores que han propuesto a las células principales de los SCN, “main cells”, como las células madres residentes del tiroides adulto. Estos autores afirman que las “main cells” pueden poseer capacidad de autorrenovación y de diferenciación en más de un tipo celular e, incluso, que pueden actuar como células madres cancerígenas. Sin embargo, en el tiroides de la rata, no se sabe con certeza si existe una población equivalente de células indiferenciadas con las mismas capacidades que las “main cells” humanas.

2.- Objetivos

Por todo lo planteado anteriormente, los objetivos para este trabajo de investigación son los siguientes:

Objetivo I:

Objetivo general

Estudiar la evolución de los FUB a lo largo de toda la vida postnatal de la rata.

Objetivos específicos

- 1.- Confirmar la incidencia de los FUB en el tiroides de la rata.
- 2.- Describir los distintos patrones morfológicos que pueden presentar los FUB según la edad de la rata.
- 3.- Valorar el tamaño de los FUB y su relación respecto a los folículos tiroideos normales.
- 4.- Analizar la incidencia de los FUB según el género.

Objetivo 2:

Objetivo general

Caracterizar mediante IHQ e IF las distintas formas de FUB que se identifican en el tiroides a lo largo de la vida postnatal de la rata.

Objetivos específicos

- 1.- Encontrar un marcador específico de los restos UB en el tiroides de la rata, independientemente de su morfología y de la edad de la rata.
- 2.- Comprobar el perfil IHQ de los restos UB de la rata y su posible equivalencia con los SCN humanos, para sentar las bases que justifiquen la utilización de la rata como modelo de experimentación animal para el estudio de la patología tiroidea relacionada.

Objetivo 3:

Objetivo general

Estudiar la contribución de los derivados del CUB en la histogénesis tiroidea y su relación con posibles alteraciones patológicas.

Objetivos específicos

- 1.-Analizar el papel de los restos UB en la histogénesis de las células foliculares y de las células C.
- 2.-Analizar la posible relación de los FUB con el desarrollo de ciertas patologías tiroideas.
- 3.-Analizar el fenotipo de las células UB como células madres.

III.-MATERIAL Y MÉTODOS

III.-MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Animales experimentales

Se usaron 126 ratas Wistar de edades comprendidas entre 0-24 meses y de ambos sexos, proporcionadas por el animalario de la Facultad de Medicina. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de luz (12 horas de luz; 12 horas de oscuridad) y temperatura (25º), además tuvieron acceso al pienso y al agua de bebida *ab libitum*. En todo momento se respetaron las normas para el uso de animales de experimentación en laboratorios, propuestas en la declaración de Helsinki (<http://www.wma.net>) y en la normativa vigente sobre “protección de los animales para experimentación y otros fines científicos” (RD. 53/2013).

2.- Fijación y procesamiento de las muestras

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con una dosis específica, según el peso (mg/kg), de una mezcla de Ketamina/Diazepam, y sacrificados para la extracción de las glándulas tiroidea. Tras el sacrificio y disección de las ratas, los tiroides se procesaron mediante la siguiente metodología:

Se emplearon dos fijadores diferentes, así, unas muestras fueron fijadas en solución de Bouin (solución compuesta por ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial), durante 3 horas, y otras lo fueron en formaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M a pH 7.4, durante 18-24 horas a 4ºC.

Posteriormente, en el “procesador de tejidos automatizado” (MYR STP 120), se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- 1.- Deshidratación en soluciones crecientes de etanol (70%, 80%,90% y 100%), de 20 minutos cada una y con agitación.
- 2.- Aclaramiento en dos cambios de xilol, de 15 minutos cada uno.
- 3.- Inclusión en parafina a 58ºC.

3.- Análisis morfométrico

3.1. Material

Para el análisis morfométrico se seleccionaron 110 ratas Wistar de ambos sexos y de diferentes edades, divididas en tres grupos:

- 1.- **Ratas jóvenes:** 40 ratas de ambos sexos de 5, 10, 15 20, 25, 30, 60 y 90 días (n=5).
- 2.- **Ratas adultas:** 20 hembras y 20 machos, de 6, 9, 12 y 15 meses (n=5).
- 3.- **Ratas viejas:** 15 hembras y 15 machos, de 18, 21 y 24 meses (n=5).

3.2. Metodología

Las glándulas fueron seccionadas en su totalidad, desde el polo superior al inferior, mediante cortes seriados de 5 μm de grosor. En cada portaobjetos se montaron para su estudio 15 secciones correlativas.

Los primeros, últimos portaobjetos y, al menos, cinco niveles equidistantes fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E). En algunos casos, además, se realizó la técnica del PAS (ácido periódico-reactivo de Schiff). De esta forma, se analizaron al microscopio, al menos, 75 secciones tiroideas por animal para localizar los restos UB (fig.25). En cada sección se observaron ambos lóbulos tiroideos. En los casos en que no se identificó ningún FUB en dichas secciones, se procedió a la tinción de un nuevo portaobjeto con H-E. Además, en cuatro casos (1 rata hembra de 3 meses, 1 rata hembra de 6 meses y 2 ratas macho de 6 meses) se procedió a analizar completamente todos los cortes seriados tras su tinción con H-E.

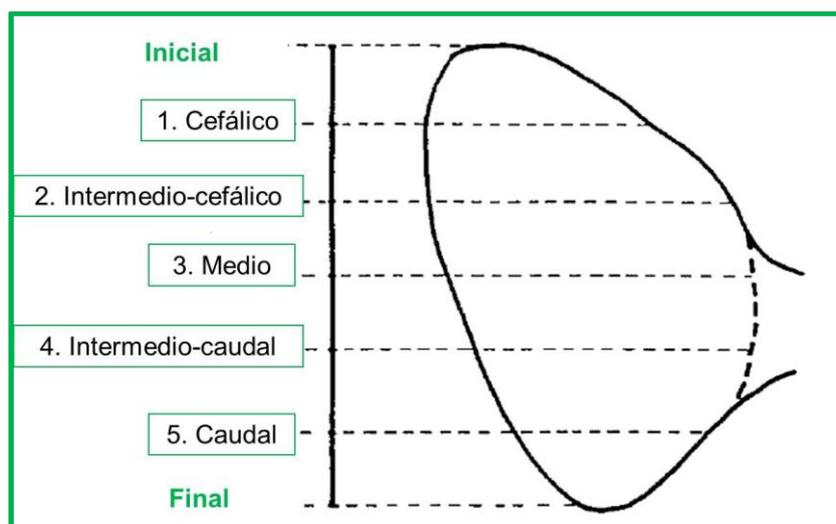


Figura 25.- Niveles de acotamiento de las glándulas tiroideas

Una vez que fueron localizados los FUB, se procedió a su análisis morfológico y a la medición de su área mediante un programa informático de procesamiento y análisis de imagen (Cell* Imaging).

Así mismo, se midieron todos los folículos tiroideos adyacentes a cada FUB identificado (al menos 10 folículos), y se calculó como valor promedio la media de sus áreas.

Los FUB se fotografiaron con una cámara Olympus C-3 SAD-4 Winding asociada al microscopio Olympus AHBT3 Vanox.

3.3. Análisis estadístico

Para comparar dos muestras independientes, tras contrastar la normalidad e igualdad de varianzas de los datos, se compararon las medidas obtenidas aplicando el Test “t” de Student. Los datos se representaron como la media \pm error estándar de la media (SEM) y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de valores de $p < 0,05$.

4.- Análisis inmunohistoquímico y de inmunofluorescencia

4.1.- Análisis inmunohistoquímico

4.1.1. Material

Para el análisis IHQ de los FUB, se seleccionaron distintos casos representativos del patrón morfológico presentado por los FUB en cada grupo de edad: ratas jóvenes, ratas adultas, ratas viejas y, además, se formó otro grupo con ratas maduras (adultas y viejas) en las que se identificaron unos FUB con una morfología peculiar.

En una primera etapa del presente estudio, se analizaron un total de **40 ratas de edades comprendidas entre 5 días y 24 meses** (Tabla 5). Se seleccionaron muestras fijadas tanto en formaldehído como en Bouin porque, según nuestra experiencia, el tipo de fijador interfiere en el resultado de la inmunotinción dependiendo de la naturaleza del antígeno estudiado.

Los anticuerpos empleados para el estudio IHQ se detallan en el siguiente apartado. En cada caso, la técnica IHQ fue realizada en los portaobjetos anterior y posterior al que se había localizado previamente el FUB mediante la tinción con H-E.

Tabla 5.- Población de estudio para el análisis IHQ.

GRUPOS	FIJADAS EN FORMOL	FIJADAS EN BOUIN
Ratas jóvenes	n = 5	n = 5
Ratas adultas	n = 5	n = 5
Ratas viejas	n = 5	n = 5
Cistoadenomas	n = 5	n = 5

Población de estudio = 40 ratas

En una **segunda etapa** de la presente investigación, debido a que el resultado obtenido para los anticuerpos con patrón de inmunotinción nuclear no fue el esperado en las muestras fijadas en Bouin, y a que las muestras de las ratas eran más escasas, se sacrificaron **16 ratas adicionales** de las siguientes edades: 0, 7, 14, 21, 28, 34, 41 y 46 días, habiendo dos ratas por edad, que se fijaron en formaldehído en las mismas condiciones anteriores.

Por la experiencia adquirida al realizar la técnica IHQ durante la primera etapa, se decidió, para estas segundas muestras de tiroides, distribuir los cortes seriados en un número menor por portaobjetos, para facilitar la aplicación de anticuerpos distintos en cortes consecutivos.

Así, en dos ratas, una recién nacida y otra de 7 días, se recogió una sola sección de tiroides por cada portaobjetos y, para el resto de muestras, se decidió recoger 6 cortes seriados consecutivos en cada portaobjetos (figura 26).

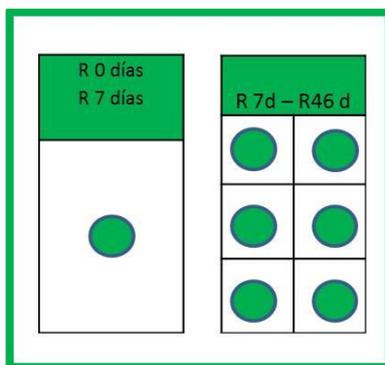


Figura 26.- Distribución de los cortes seriados de tiroides de ratas jóvenes en los portaobjetos para su análisis IHQ

Anticuerpos

Para la demostración de citoqueratinas (CK) se emplearon varios anticuerpos: dos tipos de anticuerpos monoclonales de ratón, que detectan CK de alto peso molecular, uno con referencia A-575 y el clon 34 β E12, que reacciona con las proteínas correspondientes a las CK 1, 5, 10 y 14; un anticuerpo policlonal de conejo con referencia Z-622, que detecta CK de una amplia gama de pesos moleculares, y otro anticuerpo monoclonal de ratón anti-CK AE1/AE3 que detecta un cocktail de CK, el clon AE1 reacciona con las CK de números 10, 14, 15, 16 y 19 y el clon AE3 reacciona con las CK de números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8. Para CT y Tg, se usaron anticuerpos policlonales de conejo anti-CT y anti-Tg, respectivamente; para p63, se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-p63, y para TTF-1, un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TTF-1 (tabla 6).

Tabla 6.- Lista de anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ y sus diluciones

Antígeno	Anticuerpo	Dilución
HMW CK	A-575 (polyclonal rabbit, Dako, Glostrup, Denmark)	1:500
HMW CK	34βE12 (monoclonal mouse, Dako, Glostrup, Denmark)	Prediluida
WSS CK	Z-622 (polyclonal rabbit, Dako, Glostrup, Denmark)	1:500
CK AE1/AE3	M 3515(monoclonal mouse, Dako, Glostrup, Denmark)	1:50
p63	4A4 (monoclonal mouse, Dako, Glostrup, Denmark)	1:500
PCNA	PC10 (monoclonal mouse, Dako, Glostrup, Denmark)	1:300
TTF-1	8G7G3(monoclonal mouse, Santa Cruz Biotechnology Inc)	1:100
CT	A0576 (polyclonal rabbit, Dako, Glostrup, Denmark)	1:4000
Tg	A0251 (polyclonal rabbit, Dako, Glostrup, Denmark)	1:400

HMW CK, CK de alto peso molecular (*high-molecular weight cytokeratin*); WSS CK, CK de amplio espectro (*wide spectrum screening cytokeratin*); CK AE1/AE3, cocktail de CK ; p63; PCNA, antígeno de proliferación celular (*proliferating cell nuclear antigen*); TTF-1; CT; Tg.

4.1.3. Método IHQ

El método IHQ empleado durante la **primera etapa** de nuestro estudio, ha consistido en una técnica inmunoenzimática basada en el uso de estreptavidina-biotina y revelado con DAB, siguiendo las recomendaciones de los prospectos de los anticuerpos y del equipo de visualización LSAB+ (Dako). El procedimiento seguido consistió en los siguientes pasos:

1.- Preparación de las muestras

La aplicación de esta técnica requiere la **desparafinación y rehidratación** de las muestras. Para la desparafinación, los portaobjetos con los cortes de parafina, se sumergieron en dos baños sucesivos con xilol durante 10-15 minutos cada uno. Posteriormente, se rehidrataron mediante inmersión en alcoholes de concentración decreciente durante 10 minutos cada uno (100%, 90%, 80%, 70%) y, por último, se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.

A continuación, se realizó un **pretratamiento** para desenmascarar el antígeno, de acuerdo con las recomendaciones indicadas en los prospectos. En nuestro caso, los pretratamientos desarrollados fueron diferentes según el tipo de antígeno. Así, para p63 y TTF-1, se requirió un tratamiento térmico, mientras que para las CK se hizo mediante digestión enzimática.

El tratamiento térmico se llevó a cabo en un equipo PTLINK (Dako). Las muestras se sumergieron en tampón EDTA a pH 9, precalentado a 65 °C, que se calentó hasta los 96

°C, manteniéndose a esa temperatura durante 20 minutos. Después se dejó enfriar y se continuó el ensayo IHQ.

El tratamiento enzimático fue común para todos los tipos de anticuerpos anti-CK. Las muestras se sumergieron en una solución de Cl_2Ca (0.01%) con tripsina (0.1%) (Sigma-Aldrich) a 37 °C durante 5 minutos, para después continuar con el ensayo.

Una vez realizado este paso, se procedió a **bloquear la actividad de la peroxidasa endógena** presente en las muestras, sumergiéndolas en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos.

2.- Ensayo inmunoenzimático

Para evitar el *background* o tinción inespecífica de fondo, se incubaron los cortes en una solución de suero normal de la especie donde se produjo el anticuerpo secundario, en nuestro caso, **el bloqueo de la tinción de fondo** se realizó con suero de burro a dilución 1:20, durante unos 20 minutos en cámara húmeda, a temperatura ambiente.

Tras el bloqueo, se procedió a **incubar con los respectivos anticuerpos específicos** o primarios (anti-CK: Z-622 y A-575; anticuerpos anti-p63; anti-TTF-1; anti-CT; anti-Tg y anti- PCNA) durante 18-24 h. a una temperatura de 2-8 °C, en cámara húmeda para evitar su secado. A continuación, se incubaron con el **anticuerpo secundario biotinado**, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron con el **complejo Estreptavidina-peroxidasa**, que se une específicamente a la biotina, durante 30 minutos a temperatura ambiente (fig. 27).

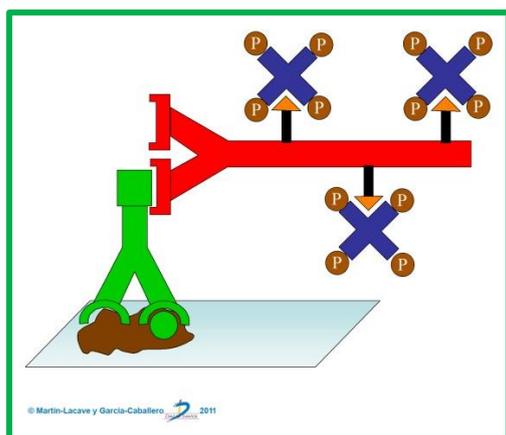
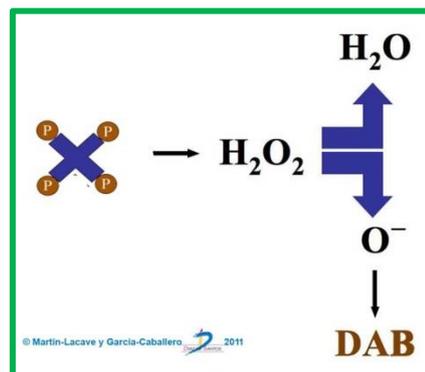


Figura 27.- Método LSAB. En este método el anticuerpo primario (verde) es reconocido por un anticuerpo secundario biotinado (rojo) al que se acopla, en una tercera etapa, una estreptavidina (azul) marcada con peroxidasa (marrón) (Martín-Lacave I; García-Caballero T, 2011).

3.- Revelado, contratinción y montaje

La inmunotinción se puso de manifiesto mediante incubación con peróxido de hidrógeno (250 μ l) y diaminobencidina (250 μ l) (Sigma-Aldrich) (un cromógeno que rinde un precipitado insoluble de color marrón oscuro en presencia de la peroxidasa). Este revelado se realizó bajo supervisión al microscopio óptico hasta alcanzar una señal óptima (fig.28).

Figura 28.- Revelado de la peroxidasa. Reacción histoquímica en la que la enzima peroxidasa actúa sobre el sustrato H_2O_2 , originando un producto de reacción O^- que hace precipitar a la diaminobencidina (DAB) (Martín-Lacave I; García-Caballero T, 2011).



Posteriormente, se procedió a la **contratinción y montaje de las secciones**. Los núcleos se tiñeron mediante inmersión durante 1 minuto en Hematoxilina de Harris diluida para, después, virar la tinción en una solución de carbonato de litio saturada. Antes de montar las muestras en resina sintética para su observación al microscopio, se deshidrataron mediante inmersión en una batería de alcoholes de concentración creciente hasta llegar al alcohol absoluto, seguido de xilol y montaje en resina sintética.

En una segunda etapa del ensayo IHQ, que se realizó sobre las 16 muestras de tiroides de ratas de edades comprendidas entre 0 y 46 días fijadas en formaldehído, de los anticuerpos ensayados anteriormente, se seleccionaron aquellos en los que era necesario completar la información del perfil IHQ obtenido para los FUB de las ratas jóvenes, o bien el resultado no había sido el esperado por interferencias con la fijación de las muestras en Bouin.

Para esta segunda etapa se utilizaron los anticuerpos que habían dado previamente mejores resultados. Concretamente, anti-CK: AE1/AE3 y 34 β E12; y los anticuerpos anti-p63, anti-TTF-1, anti-Tg y anti-CT, según la distribución que se indica en la figura 29 para cada portaobjeto.

EDTA/FLEX		EDTA/FLEX	
CK34 RTU 	CK34 RTU 	Tg 1:400 	Tg 1:400 
p63 1:500 	p63 1:500 	AE1/AE3 RTU 	AE1/AE3 RTU 
TTF-1 1:100 	TTF-1 1:100 	CT 1:4000 	CT 1:4000 

Figura 29.- Anticuerpos ensayados en la población de ratas jóvenes. Se especifica el pretratamiento y el sistema de detección utilizados.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se decidió realizar algunas modificaciones para mejorar el protocolo IHQ:

- A todas las muestras se les aplicó un pre-tratamiento térmico con tampón EDTA a pH 9, en el equipo PTLink de Dako.
- Se utilizó un sistema de detección más sensible, el sistema Flex EnVision. Una vez incubadas las muestras con el anticuerpo primario, y después de lavarlas con PBS, se cubren con el sistema de detección y se incuban durante 40 minutos en cámara húmeda (fig. 30).

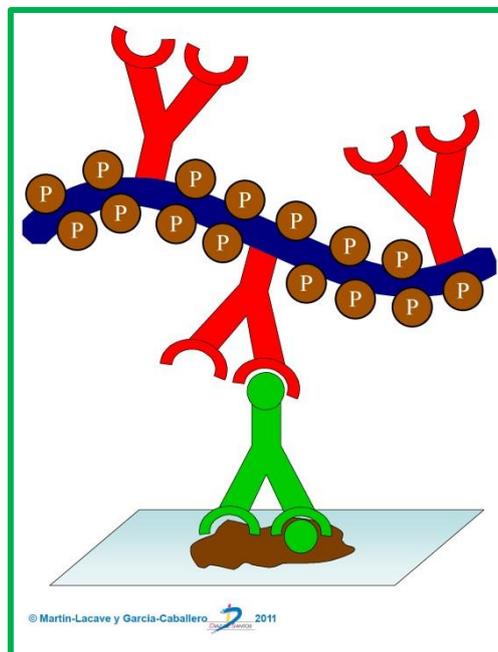


Figura 30.- Método EnVision. En una primera etapa, el antígeno es reconocido por el anticuerpo primario (verde) y en una segunda etapa, se une un anticuerpo secundario anti-especie (rojo) que va unido al polímero dextrano (azul) que, a su vez, lleva conjugadas moléculas de peroxidasa (marrón) (Martín-Lacave I; García-Caballero T, 2011).

4.2.- Doble marcaje mediante inmunohistoquímica

4.2.1. Material

En los portaobjetos anterior y posterior a aquellos en los que se habían identificado los FUB, se realizó un método de inmunotinción múltiple, mediante doble IHQ. Este método permite valorar si dos antígenos distintos coinciden en la misma célula (co-localización) o si, por el contrario, se presentan en distintas células o componentes tisulares.

Se utilizaron anticuerpos anti-p63, anti-Tg y anti-CT (tabla 7), de tal forma que, en unos portaobjetos se marcó p63 y CT y, en otros, p63 y Tg.

Tabla 7.- Anticuerpos ensayados en el doble marcaje IHQ y sus diluciones

Antígeno	Anticuerpo	Dilución
p63	4A4 (polyclonal mouse, Dako, Glostrup, Denmark)	1/500
CT	A0576 (polyclonal rabbit, Dako, Glostrup, Denmark)	1/2.000
Tg	A0251 (polyclonal rabbit, Dako, Glostrup, Denmark)	1/400

4.2.2. Metodología

Para realizar la doble inmunotinción se emplearon dos métodos inmunoenzimáticos semejantes, pero usando distintos cromógenos, por lo que la demostración fue de forma secuencial, intercalando entre ambos métodos un tratamiento térmico para desnaturalizar los anticuerpos de la primera serie de modo que no interfirieran en la demostración del segundo antígeno.

El primer método empleado fue una técnica inmunoenzimática basada en el uso de **estreptavidina-fosfatasa, revelada con Fast-Red** como cromógeno y LSAB+ (Dako) como equipo de visualización. Se seleccionaron, como primeros antígenos, **CT** en unas muestras y **Tg** en otras (fig. 31).

Una vez que las muestras estuvieron desparafinadas e hidratadas, y sin necesidad de realizar ni pretratamiento desenmascarante ni inhibición de la peroxidasa endógena, se procedió al **bloqueo de la tinción de fondo**, de la misma forma descrita en el apartado anterior.

Tras el bloqueo, se incubaron las secciones con los **anticuerpos anticuerpos específicos** o primarios (anti- CT o anti- Tg) durante 18-24 h, a una temperatura de 2-8 °C, en cámara húmeda. A continuación, se incubaron con el **anticuerpo secundario**

biotinado, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Y, finalmente, se incubaron con el complejo **Estreptavidina-fosfatasa (LSAB+)**, que se une específicamente a la biotina, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La inmunotinción se **reveló** mediante incubación con el cromógeno **Fast-Red** que produce un precipitado insoluble de color rojo. Este revelado se realizó bajo supervisión al microscopio óptico hasta alcanzar una señal óptima.

El segundo método empleado fue una técnica inmunoenzimática basada en el uso de **Estreptavidina-peroxidasa, con Flex En-Vision (Dako) como equipo de revelado y DAB** como cromógeno, para identificar p63 en las secciones de tiroides (fig.31).

A continuación, antes de iniciar la demostración del segundo antígeno, fue necesario anular la cadena de anticuerpos de la 1ª serie, mediante desnaturalización por calor con el tampón EDTA a pH 9.0, en el equipo PT-Link (Dako) a 96 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se hizo la inhibición de la peroxidasa endógena, según el protocolo descrito anteriormente.

Las muestras, se **incubaron con anti-p63** durante 18-24 h, a una temperatura de 2-8 °C, en cámara húmeda. A continuación, se incubaron con el sistema de detección Flex En-Vision, en cámara húmeda, durante 40 minutos a temperatura ambiente.

La inmunotinción se **reveló** mediante incubación con una solución de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina (Sigma-Aldrich), bajo supervisión al microscopio óptico hasta que se diferencia un precipitado de color marrón oscuro.

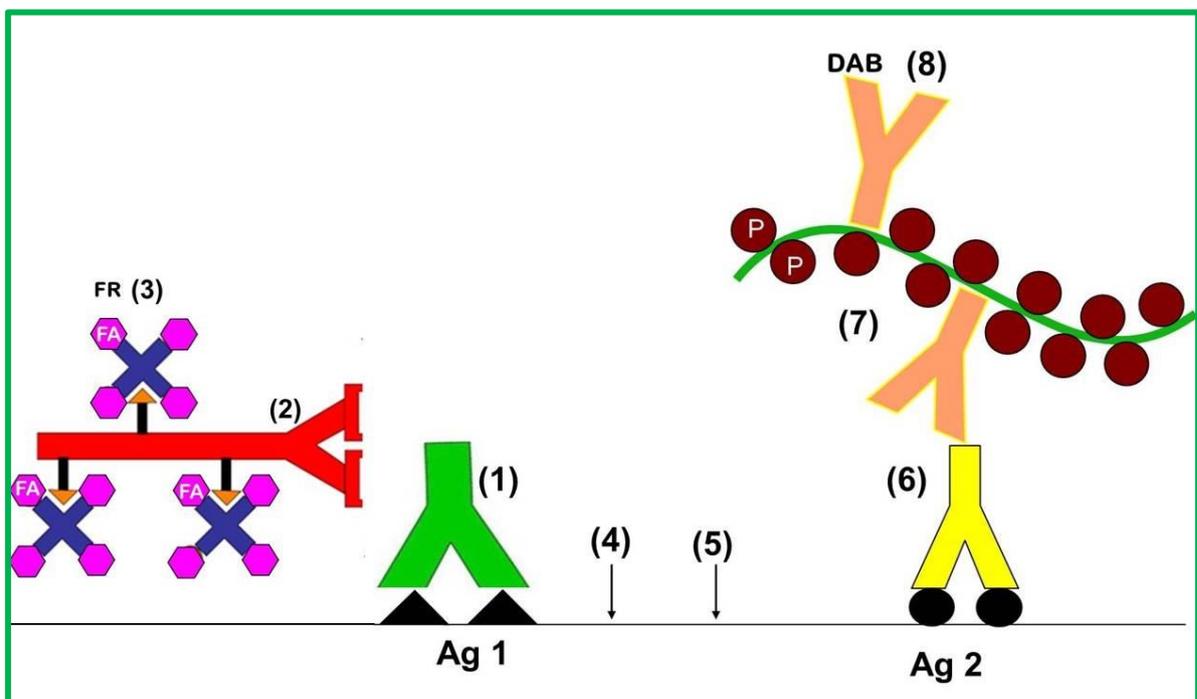


Figura 31.- Doble inmunotinción secuencial. 1) Ig de conejo anti-CT o anti-Tg. 2) Complejo LSAB: anticuerpo secundario biotinado acoplado con estreptavidina-fosfatasa ácida. 3) Cromógeno *Fast-Red* (precipitado rosa). 4) Desnaturalización por calor con tampón EDTA 5) Bloqueo de la peroxidasa endógena 6) Ig de ratón anti-p63. 5) Complejo Flex En-Vision anti Ig de ratón conjugada con peroxidasa. 6) Cromógeno DAB (precipitado marrón) (Martín-Lacave I; García-Caballero T, 2011).

Posteriormente, se procedió a la **contratinción** con Hematoxilina de Harris diluida y, tras virar el color, mediante una solución saturada de carbonato de litio, **se montaron** directamente en resina sintética.

4.3- Doble marcaje mediante inmunofluorescencia

Las técnicas de IF son idóneas para los estudios de inmunomarcaje múltiple, debido a que la resolución espacial que se obtiene es mayor que con las técnicas inmunoenzimáticas. Se basan en el empleo de marcadores fluorescentes (fluorocromos) que están unidos por medio de enlaces covalentes a una u otra de las distintas moléculas que se emplean durante el proceso de inmunotinción. En nuestro caso, hemos utilizado la combinación de dos técnicas de IF indirecta, mediante la unión de los distintos anticuerpos primarios, o específicos, a anticuerpos secundarios, o antiespecie, marcados con diferentes fluorocromos (fig. 32).

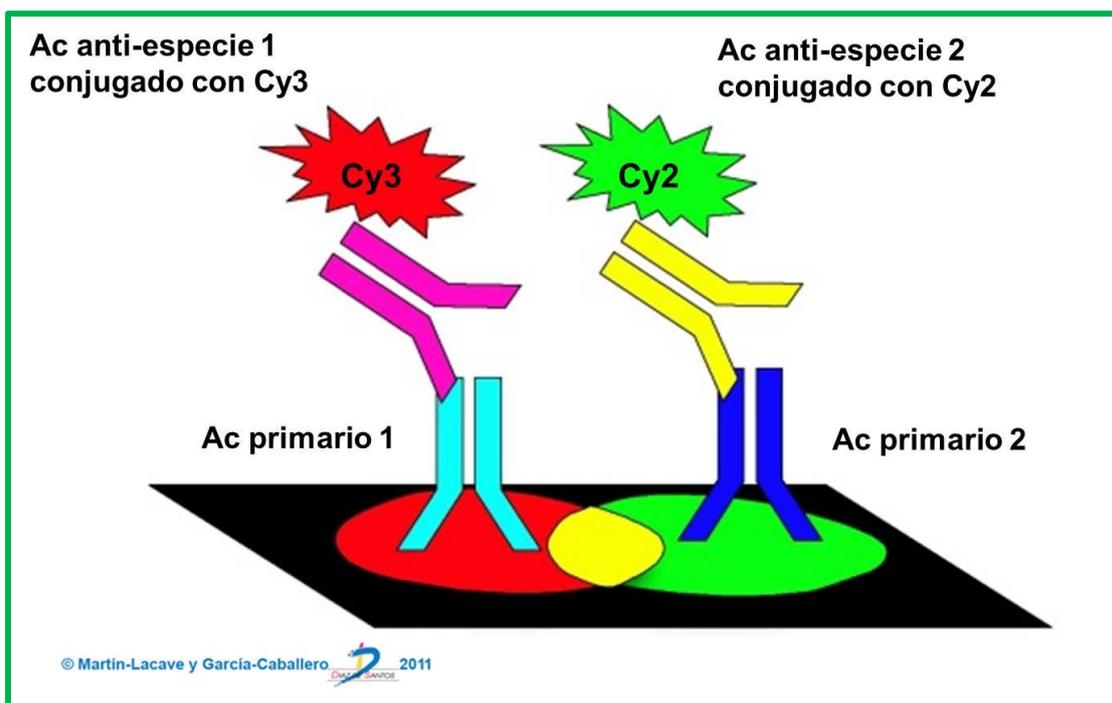


Figura 32.- Doble IF indirecta. A los anticuerpos primarios 1 (p63 o CK 34 β e12) se une el anticuerpo anti-ratón conjugado con Cy3 (fluorocromo rojo). A los segundos anticuerpos primarios 2 (CT o Tg) se une el anticuerpo anti-conejo conjugado con Cy2 (fluorocromo verde) (Martín-Lacave I; García-Caballero T. 2011).

4.3.1. Material

Las muestras sobre las que se realizó el doble marcaje mediante IF, fueron cortes de tiroides de ratas jóvenes, que fueron seleccionados de la misma forma que los que se utilizaron para el doble marcaje IHQ.

Los antígenos identificados fueron p63, CK 34 β e12, CT y Tg (Tabla 8), y las combinaciones de antígenos demostrados fueron las siguientes: p63 - CT; p63 - Tg; CK 34 β e12 - CT y CK 34 β e12 - Tg .

Tabla 8.- Anticuerpos utilizados para el doble marcaje mediante IF y sus diluciones.

Antígeno	Anticuerpo	Dilución
p63	4A4 (polyclonal mouse, Dako, Glostrup, Denmark)	1:100
CK 34 β e12	34 β e12 (monoclonal mouse, Dako, Glostrup, Denmark)	Prediluida
CT	A0576 (polyclonal rabbit, Dako, Glostrup, Denmark)	1:2.000
Tg	A0251 (polyclonal rabbit, Dako, Glostrup, Denmark)	1:400

4.3.2. Metodología

Las secciones se **desparafinaron y rehidrataron** siguiendo el protocolo descrito anteriormente, y se pretrataron mediante **tratamiento térmico** en el equipo PT-Link (Dako) con tampón **EDTA pH 9.0** a 96 $^{\circ}$ durante 20 minutos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

A continuación, se lavaron con tampón de lavado durante 5 minutos y, para conseguir el **bloqueo de la tinción de fondo**, se incubaron con suero normal de burro (Jackson, UK) a dilución 1:20, durante 15 minutos en cámara húmeda, a temperatura ambiente.

Realizados estos pasos, los cortes **se incubaron con el anticuerpo primario** (p63 o CK 34 β E12) en cámara húmeda, a temperatura ambiente durante 24h. Tras lavado en tampón PBS-T, se incubaron con el **anticuerpo secundario de ratón conjugado con Cy3**

(Jackson, UK) a dilución 1:100, que se verá en el microscopio de fluorescencia en el canal rojo, durante 30 minutos en cámara húmeda y en oscuridad (fig. 31).

Seguidamente, las muestras se incubaron con el **segundo anticuerpo específico** (CT o Tg), en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de lavar de nuevo con PBS-T, se incubaron con el segundo **anticuerpo secundario, una Ig de conejo conjugada con el fluorocromo Cy2** (Jackson, UK) a dilución 1:100, que se verá en el microscopio de fluorescencia en el canal verde, durante 30 minutos en cámara húmeda y en oscuridad (fig. 32)

Los núcleos se tiñeron con DAPI (dilución 1:100) durante 5 minutos, en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad, y se empleó Mowiol como medio de montaje. Los núcleos se visualizarán en el canal azul del microscopio de fluorescencia.

El análisis microscópico se realizó con el microscópico de fluorescencia Olympus BX50, empleando la cámara digital Hamamatsu ORCA-03G y el programa de procesamiento de imagen Image Pro-Plus 7.0.

IV.- RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1.- ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

1.1. Localización de los FUB en el tiroides

En todas las edades estudiadas, se identificaron FUB en uno o en los dos lóbulos tiroideos, bien como FUB aislados o como agrupaciones celulares. Se localizaron principalmente en la **zona central de cada lóbulo tiroideo**, íntimamente relacionados con el parénquima tiroideo adyacente y, frecuentemente, en contacto con el tejido conectivo perivascular. En dos de las ratas, sin embargo, se detectaron FUB en una posición inusual, concretamente, en el intersticio conectivo entre el cartílago traqueal y el lóbulo tiroideo, probablemente como resultado de un defecto de migración del CUB (fig.33).

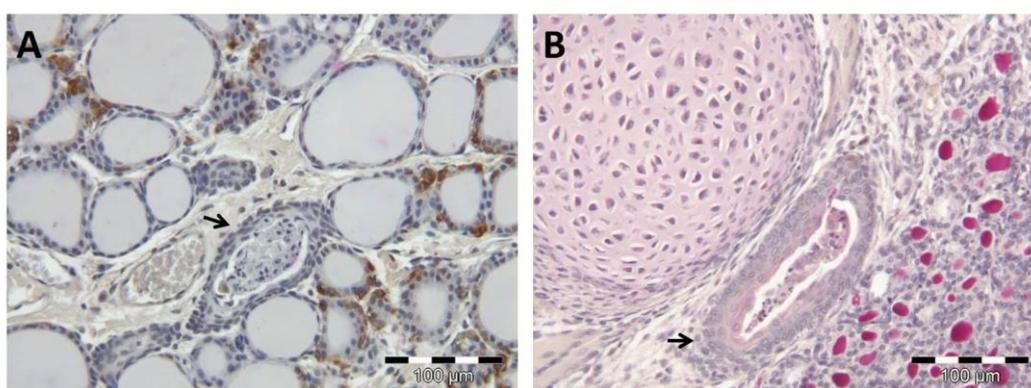


Figura 33.- Localización de los FUB en el lóbulo tiroideo. A) FUB situado en posición central, rodeado de tejido conectivo perivascular. B) FUB en posición inusual, entre el cartílago traqueal y el lóbulo tiroideo. Tinción: A) CT (IHQ): B) PAS (200x).

En todas las edades, en alguno de los lóbulos tiroideos estudiados, se encontró más de un FUB, que en la mayoría de los casos estaban muy cerca e incluso interconectados (Fig.34).

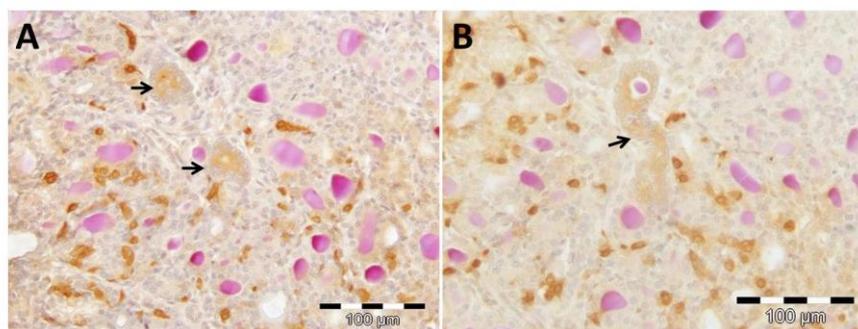


Figura 34.- FUB en una rata de 15 días, en dos secciones tiroideas próximas entre sí. A) Se observaron dos FUB cercanos en el mismo lóbulo tiroideo. B) Los dos FUB aparecen ya interconectados. Tinción: CT (IHQ) - PAS (200x).

1.2. Morfología de los FUB en las diferentes edades

1.- Ratas jóvenes (5-90 días):

En las **ratas muy jóvenes (5-30 días)**, se observaron remanentes UB de distinto tamaño, apariencia y contenido luminal, que por sus características fueron denominados “**nidos sólidos celulares**”. Estas estructuras evolucionan desde nidos celulares con formas redondeadas o alargadas, a estructuras tubulares en ratas de 5-10 días, pasando por estados intermedios en los que pueden aparecer como estructuras epiteliales en forma de perla (fig. 35).

El pequeño tamaño de estos nidos sólidos hace que, a menudo, su identificación presente dificultades y sea necesaria una gran habilidad y experiencia para diferenciarlos del tiroides adyacente.

En algunos casos, como en el que se muestra en la figura 35 en una rata de 30 días, se identificaron unos folículos en los que la pared de un FUB presentaba asociada parte de un folículo tiroideo. Al coexistir distintos tipos celulares en la pared de un mismo folículo se denominaron **folículos mixtos**. Los folículos mixtos, no suelen mostrar apariencia quística, sino que son más bien alargados. Su un contenido luminal es heterogéneo, y está constituido por restos celulares, núcleos picnóticos y trazas de material PAS+.

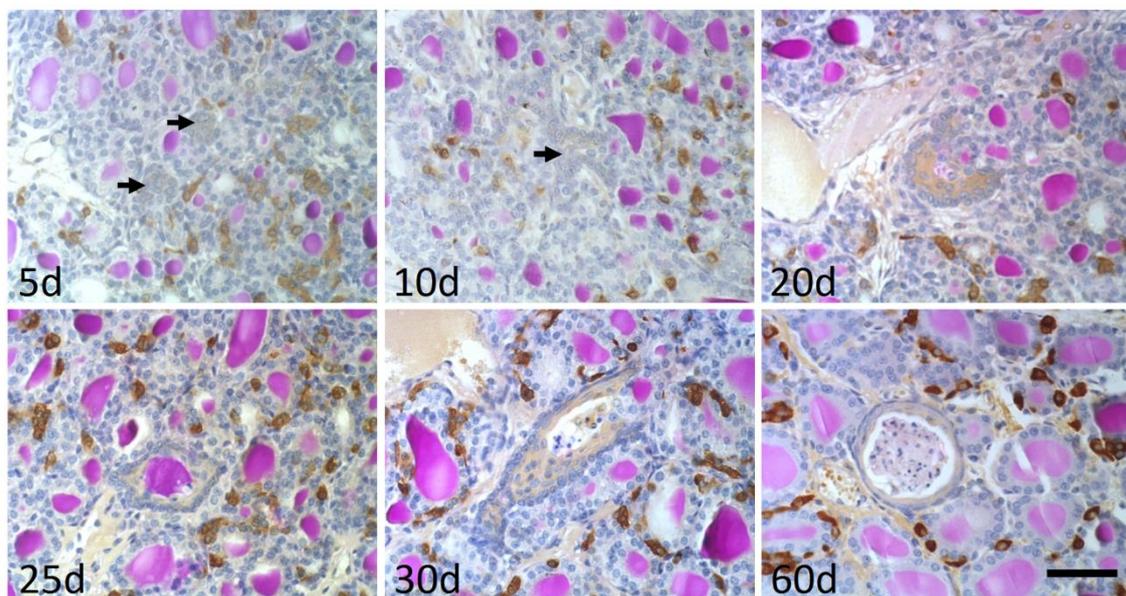


Figura 35.- Transición progresiva de los FUBs en la rata desde 5 a 60 días. Las formas inmaduras consisten en restos celulares sólidos (5d), restos alargados (10d), perlas epiteliales (20d), estructuras tubulares con contenido luminal (25d) y folículos mixtos (30d). Los FUB quísticos inmaduros son estructuras con pared estratificada y restos celulares en el lumen (60d). Tinción: CT (IHQ) - PAS (400x).

En ratas de **60 días o más**, muchos FUB presentaron **apariencia quística**, pudiéndose distinguir más de una capa celular en sus paredes. Las células periféricas eran cúbicas y tendían a aplanarse hacia la luz central donde, en general, se observaron algunos fragmentos celulares y sustancias de desecho. Estas estructuras se denominaron **“FUB inmaduros”** (fig.35).

En el grupo de ratas jóvenes, el área de los FUB fue superior a la de los folículos tiroideos normales, con valores de superficie media de $2874 \pm 970 \mu\text{m}^2$ frente a $1898 \pm 741 \mu\text{m}^2$, mostrando altos niveles de significación estadística ($p < 0.01$) (fig.36).

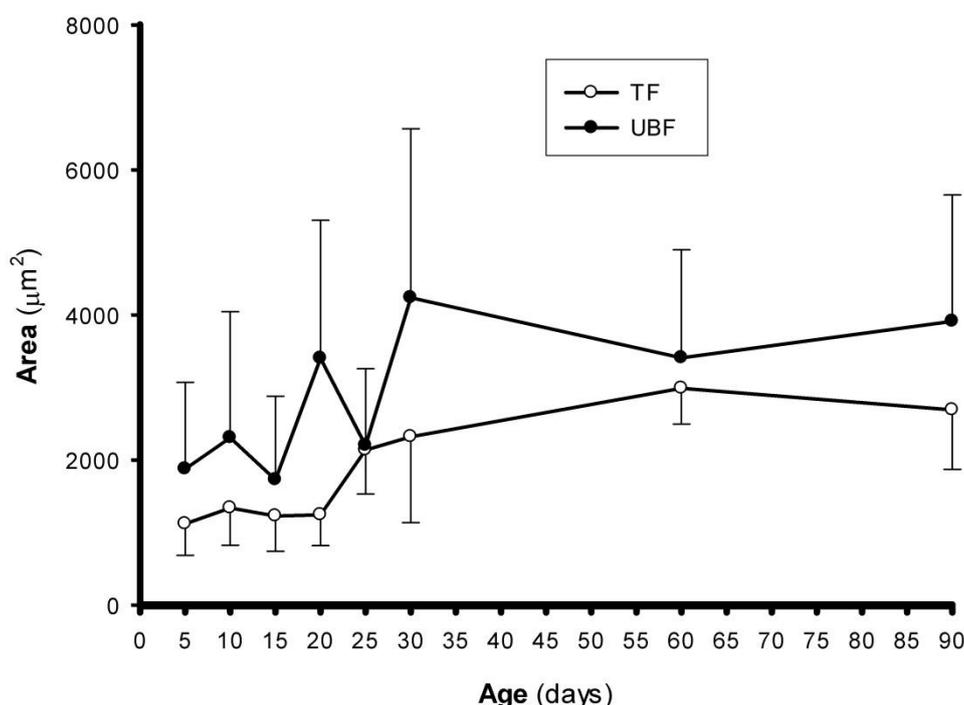


Figura 36.- Evolución del área de los FUB en comparación con el área de los folículos tiroideos normales (FT) en ratas jóvenes. Como se puede observar, los FUB son más grandes que los folículos tiroideos a todas las edades estudiadas.

2.- Ratas adultas (6-15 meses):

En este grupo predominaron unos folículos redondeados y con apariencia quística, que fueron denominados **“FUB maduros”**, aunque menos frecuentemente, y sobre todo en ratas macho, también pueden aparecer FUB inmaduros.

Los FUB maduros presentan en su pared células más aplanadas que las que aparecen en las formas inmaduras y en el contenido luminal, frecuentemente, se encuentran núcleos picnóticos, células descamativas y trazas de material PAS+ (fig.37).

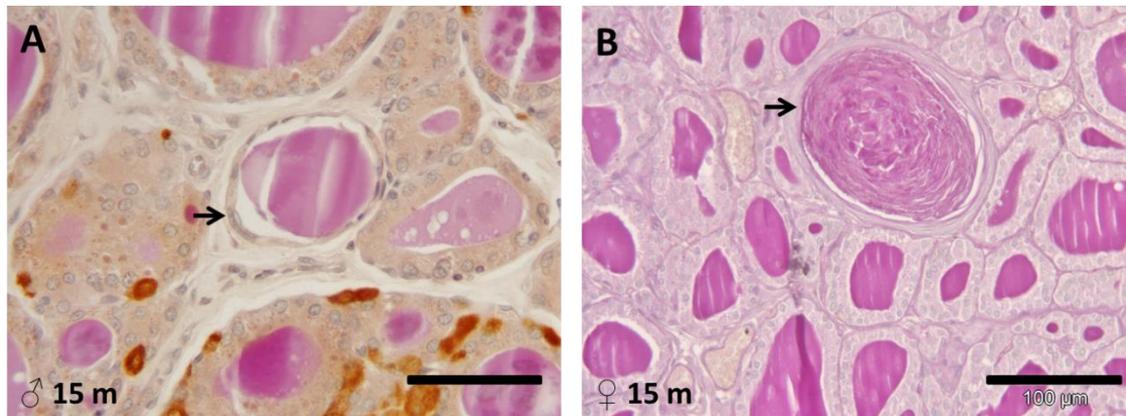


Figura 37.- “FUB maduros” en las ratas adultas. Normalmente, son folículos redondeados y de apariencia quística, que presentan células aplanadas en su pared. Tinción: A) CT (IHQ)-PAS; B) PAS (200x).

El tamaño de los FUB fue variando con respecto a la edad de la rata, en general, los FUB en las ratas hembra fueron ligeramente mayores que los de las ratas macho, con un área media de 6205 ± 1781 vs. $5199 \pm 2384 \mu\text{m}^2$ (fig.38).

Igualmente, los FUB en las ratas hembra fueron significativamente mayores que los folículos tiroideos normales, con un área media de 6205 ± 1781 vs. $3839 \pm 367 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.05$). Sin embargo, en las ratas macho, los FUB fueron mayores que los folículos tiroideos normales, con un área media de 5199 ± 2384 vs. $3581 \pm 470 \mu\text{m}^2$, pero sin valores de significación estadística. Además, aunque menos frecuentemente, en las ratas macho a cualquier edad, pueden aparecer FUB de dimensiones reducidas, con apariencias que recuerdan a las formas que se identificaron en las ratas jóvenes.

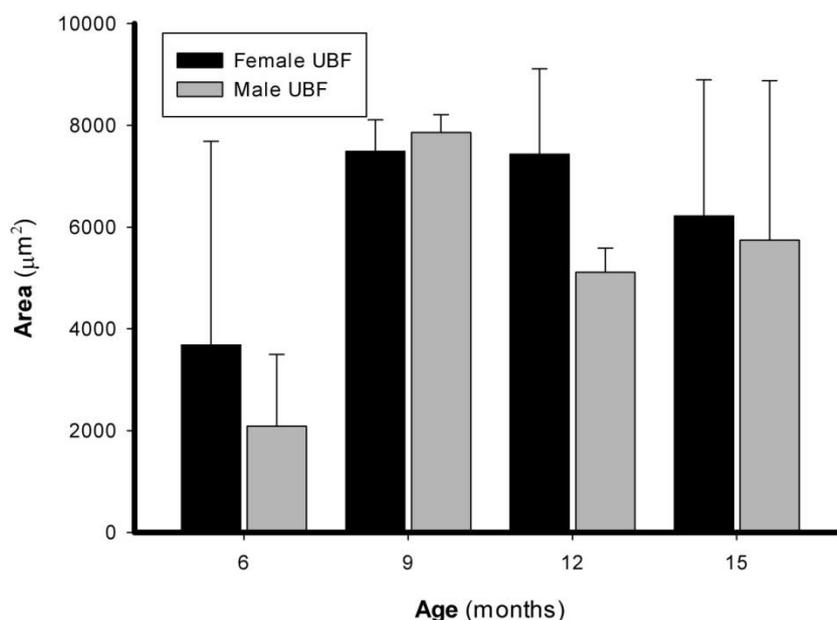


Figura 38.- Histograma que muestra la evolución del área de los FUB con la edad en las ratas adultas. Se observa una tendencia hacia un mayor tamaño en los FUB en las hembras frente a los machos.

3.- Ratas viejas (18-24 meses):

En el grupo de ratas viejas, al igual que en las ratas adultas, predominan los “FUB maduros” de aspecto quístico.

En ratas viejas hembra, se mantiene superior el valor del área de los FUB respecto a los folículos tiroideos normales (6624 ± 2347 vs. $4376 \pm 370 \mu\text{m}^2$), mientras que en los machos ocurre al contrario (2843 ± 786 vs. 4634 ± 447 , $p < 0.01$).

Cuando se considera el valor del área de los FUB en ratas adultas y viejas conjuntamente, el área de los FUB en hembras es mayor que la de los FUB en machos, con significación estadística (6385 ± 1864 vs. $4142 \pm 2116 \mu\text{m}^2$, $p < 0.01$). Este dato soporta la existencia de un dimorfismo sexual relacionado con la progresión del área de los FUB en la rata (fig. 39 y 40)

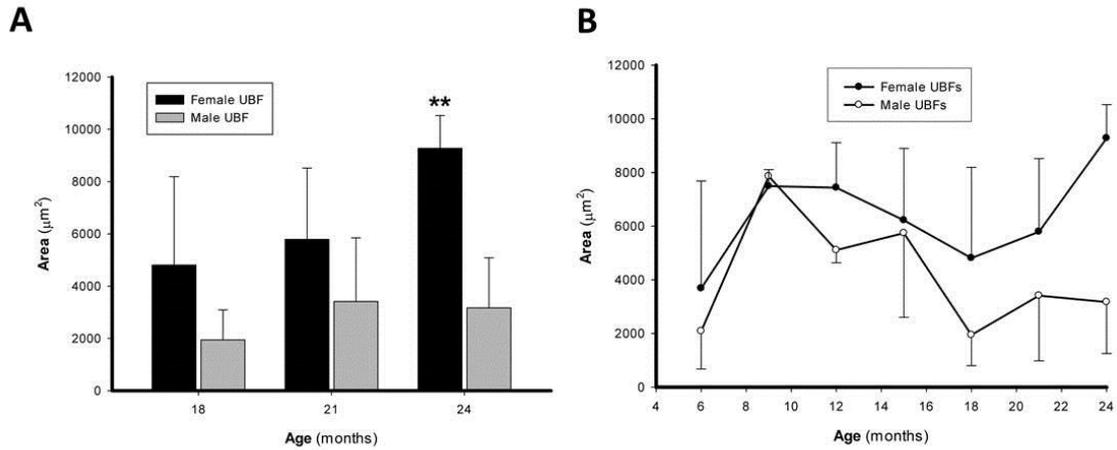


Figura 39.- Evolución del área de los FUB en relación con el género y la edad de la rata. A) En ratas viejas se observaron diferencias significativas entre el área de los FUB en hembras respecto a machos. B) Se observa un claro dimorfismo sexual en relación al tamaño.

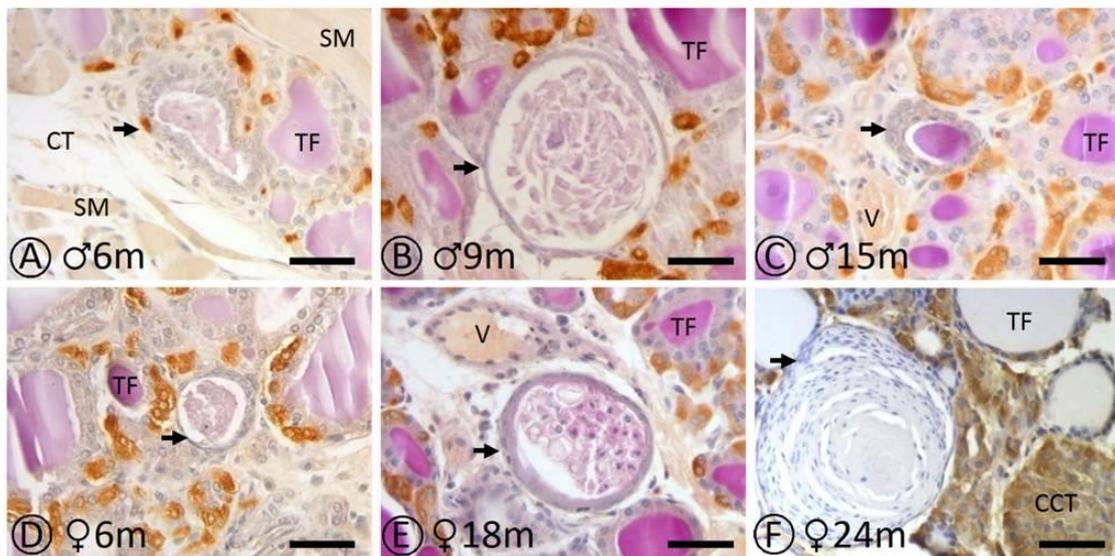


Figura 40.- Evolución de los FUB en ratas macho y hembra entre 6-24 meses de edad. En ratas macho, se observan indistintamente formas maduras e inmaduras, desde un FUB situado inusualmente (♂6m), una forma quística madura (♂9m), hasta un FUB quístico maduro (♂15m). En ratas hembra, se observan FUB maduros, que van aumentando de tamaño y que consisten en estructuras quísticas típicas de contenido luminal variable (6♀, 18♀, 24♀). Tinción: A-E CT (IHQ) – PAS; F) CT (IHQ) (400x).

4.- Cistoadenomas UB:

En ratas adultas y viejas, además de las formas inmaduras y maduras de FUB, hemos encontrado una tercera forma de remanente UB, a la que hemos denominado “**cistoadenoma UB**”. Debido a su peculiar morfología, estos restos probablemente representan una progresión inusual de las formas descritas anteriormente.

Se caracterizan por su gran tamaño y su apariencia quística, así como por el contenido luminal dispuesto en múltiples capas concéntricas que recuerdan a un bulbo de cebolla, formado por células descamadas, sin rastro de núcleos y escasamente vascularizados. Con frecuencia, muestran un aspecto poliquístico característico.

Estas estructuras comprimen el parénquima tiroideo adyacente, que suele mantener su integridad aunque, en algunos casos, como en el de una rata hembra de 12 meses, se observó discontinuidad en la pared e infiltración tisular, confiriéndole un aspecto patológico (fig.41). Además, en un par de casos, se encontraron cistoadenomas UB adyacentes a un tumor de células C.

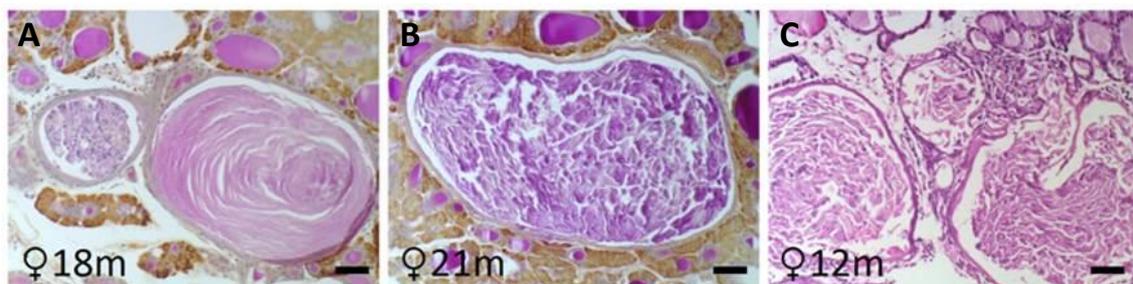


Figure 41. Apariencia característica de los cistoadenomas UB (18♀, 21♀). Como se puede observar, pueden tener apariencia poliquística (A,C) o constar de un solo quiste de gran tamaño (B). C) Se muestra un cistoadenoma en una rata de 12 meses (12♀), que presenta una morfología más agresiva porque invade el parénquima tiroideo adyacente. Tinción: H-E (100x).

El área de los cistoadenomas osciló entre 22.759 y 200.244 μm^2 , con una superficie media de $83.981 \pm 53.682 \mu\text{m}^2$, presentando un tamaño considerablemente superior al de los folículos tiroideos normales adyacentes ($3765 \pm 984 \mu\text{m}^2$, $p < 0,01$). Los cistoadenomas UB aparecen con más frecuencia en ratas hembra (ratio 3:1) y en éstas, además, son de mayor tamaño (tabla 9).

EDAD	HEMBRAS	MACHOS
9 meses (n=5; 5♂)	-	57,964 μm^2
12 meses (n=5♀; 5♂)	200,244 μm^2	32,817 μm^2
15 meses (n=5♀; 5♂)	103,404 μm^2	-
	22,759 μm^2	-
18 meses (n=5♀; 5♂)	-	70,112 μm^2
	34,238 μm^2	-
	88,004 μm^2	-
21 meses (n=5♀; 5♂)	128,828 μm^2	-
24 meses (n=5♀; 5♂)	101,443 μm^2	-
Media \pm SD	96,988 \pm 59,532 μm^2	53,631 \pm 19,021 μm^2
Media total \pm SD	83,981 \pm 53,682 μm^2	

Tabla 9.- Áreas específicas e incidencias de los cistoadenomas UB según el género y edad de la rata.

1.3. Relación de los FUB con las células endocrinas tiroideas

Alrededor de los FUB se encuentran folículos tiroideos de apariencia normal. Asociados a la pared de los FUB inmaduros pudieron observarse, ocasionalmente, algunas células C. Concretamente, se han observado células C y mitosis de células C en la pared de un FUB en posición anómala, previamente mencionado, pero no se han identificado en las paredes de los FUB maduros.

A pesar de que los FUB se localizan preferentemente en el interior del lóbulo tiroideo, en la región donde predominan las células C, denominada por ello “área de células C”, en ninguna de las edades estudiadas se han identificado células C concentradas alrededor de los FUB.

1.4. Incidencia de los FUB

Se ha considerado que una rata contiene restos UB, **si aparece al menos un FUB en uno de los lóbulos estudiados.**

Una vez analizadas todas las secciones tiroideas en los cinco niveles equidistantes seleccionados por animal (al menos 45 secciones por rata), se observó una incidencia de FUB en el grupo de ratas jóvenes (5-90 días) de un 77%, siendo este valor muy superior al que se halló en ratas adultas y viejas.

En el grupo de ratas hembra de 6-24 meses, el valor de incidencia, en un primer momento, fue de un 58%, y en el de machos de 6-24 meses fue tan sólo del 23%.

Sin embargo, cuando no se encontraron FUB en ninguno de los dos lóbulos tiroideos en los cinco niveles seleccionados, se procedió a analizar más secciones tiroideas de la misma rata y, de esta forma, se incrementaron los valores de incidencia. Incluso, en seis casos (3 hembras y 3 machos), se analizó completamente todo el tiroides seriado y, en todos ellos, finalmente se detectaron FUB.

Consecuentemente, podemos concluir que **todos los tiroides contienen FUB, independientemente de la edad y del género de la rata.**

2.- ANÁLISIS IHQ

2.1. Nidos sólidos celulares

El **marcaje para CK** permite distinguir con facilidad las formas inmaduras de restos UB del resto del parénquima tiroideo, especialmente con la **anti- 34βe12**, con la que se tiñeron exclusivamente los restos UB, mientras que las células C y las células foliculares resultaron negativas (fig. 42). Sin embargo, cuando se utilizó el anticuerpo **anti-CK AE1/AE3**, así como los anticuerpos con referencia **Z-622 y A-575**, aunque las células UB también resultaron positivas, las células foliculares y las células C mostraron una débil positividad, por lo que no destacaron con la misma nitidez los restos UB (fig. 41 y 42). En todos los casos, se obtuvo un patrón de inmunotinción citoplasmático.

Con el anticuerpo **anti-p63**, también se tiñeron de forma específica todos los restos UB, tanto los que se presentaron agrupados en forma de nidos sólidos celulares, como aquellos que aparecían dispersos entre los folículos tiroideos. Las células foliculares y las células C, por el contrario, fueron siempre negativas. Por ello, p63 también resultó un marcador exclusivo de las células UB en las formas celulares sólidas (fig. 41 y 42). Con p63 el patrón de inmunotinción observado fue nuclear.

En cambio, la inmunotinción para **TTF-1**, sólo fue positiva para las células foliculares y para las células C, mientras que apenas se tiñeron las células UB dispersas entre el parénquima tiroideo (fig. 42).

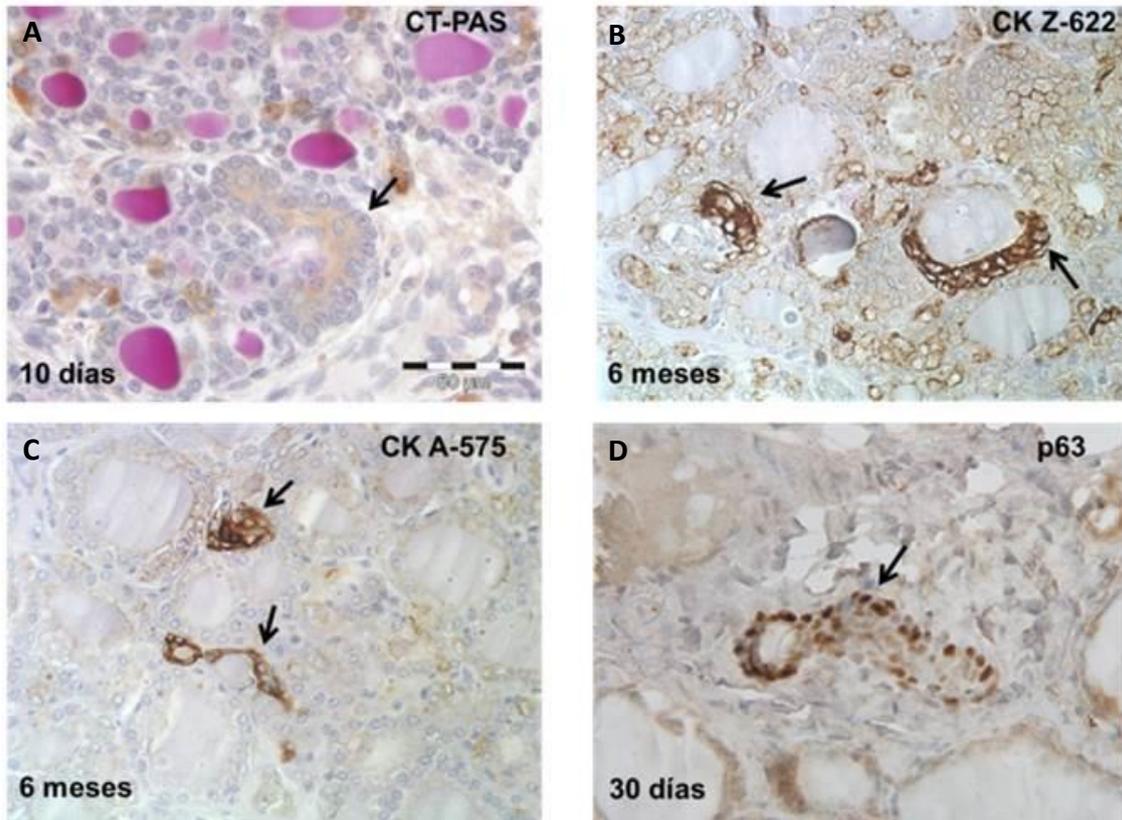


Figura 41.- Se observan “restos UB inmaduros” (flechas) que pueden presentarse como “nidios sólidos celulares” o como estructuras tubulares que se tiñen intensamente para las CK así como para p63 (400x).

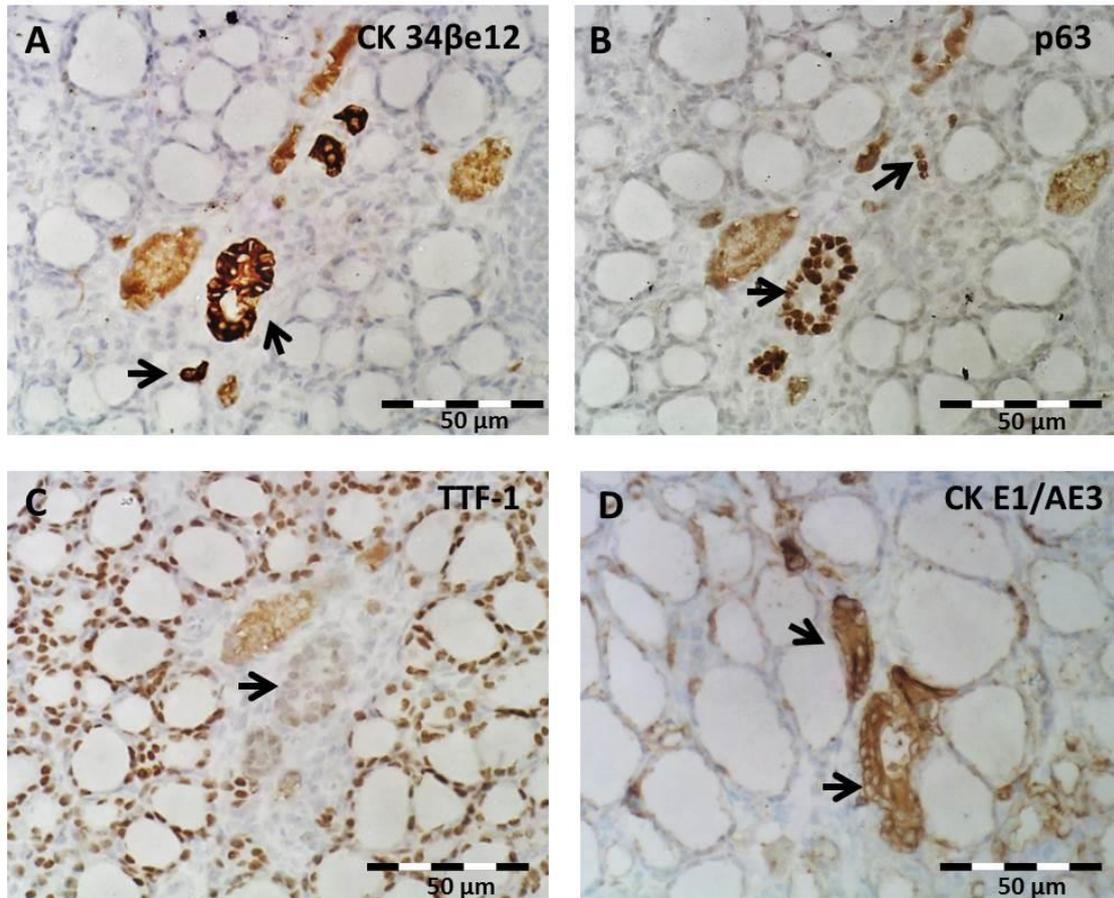


Figura 42.- Inmunotinción secuencial para distintos anticuerpos de los mismos restos UB sólidos. A) La inmunotinción para CK 34βe12 tiñe de forma exclusiva los restos UB y permite diferenciarlos con nitidez del parénquima tiroideo adyacente. B) La inmunotinción para p63 también permite diferenciar todas las células UB presentes en el tiroides, ya estén agrupadas o dispersas. C) Para TTF-1 son positivas las células foliculares y las células C, pero apenas se tiñen las células UB. D) En esta imagen se muestra la tinción de un nido celular sólido con AE1/AE3 y también se aprecia una tinción débil de las células foliculares y las células C (400x).

2.2. FUB inmaduros

Los resultados obtenidos en los “FUB inmaduros” con los anticuerpos con referencia Z-622, A-575, anti-AE1/AE3 y anti-34 β e12; los anticuerpos anti-p63, anti-TTF-1 y anti-CT, coinciden con los obtenidos para las formas sólidas celulares, tanto en la intensidad de tinción, como en el patrón de inmunotinción que exhiben los distintos anticuerpos (fig. 43 y 44).

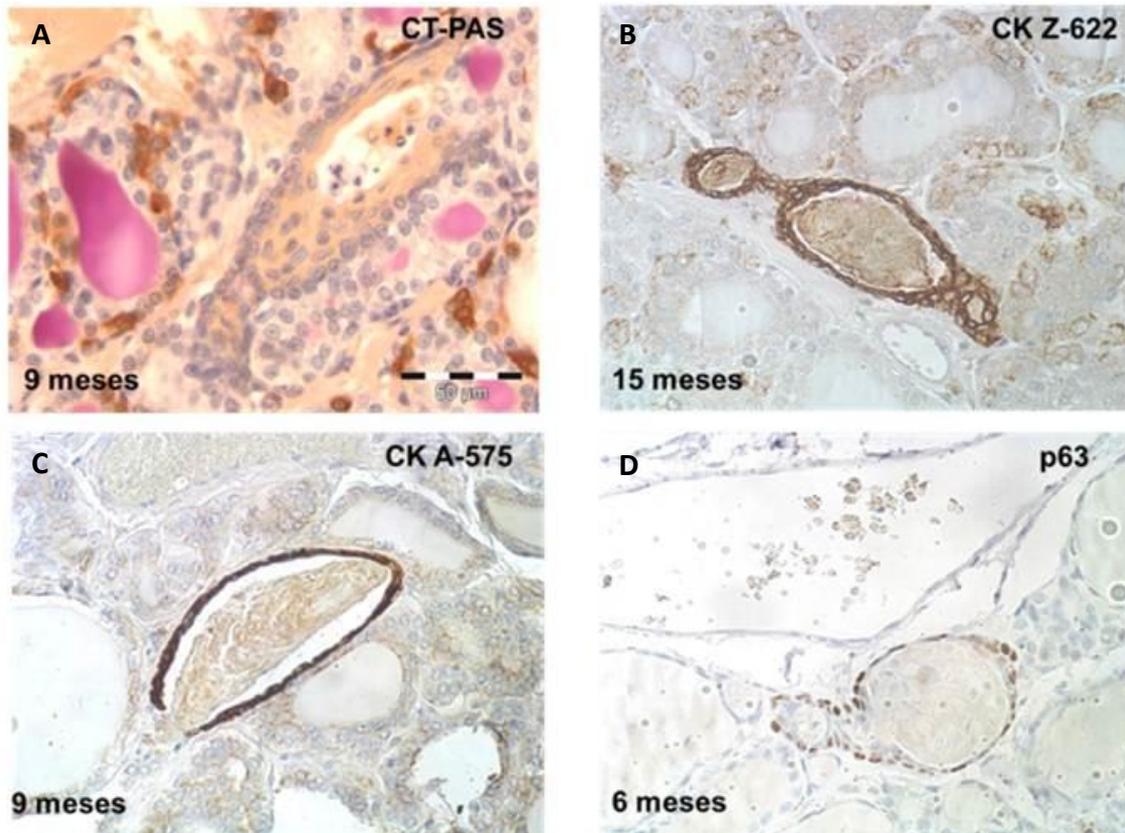


Figura 43.- “FUB quísticos inmaduros”: presentan en el lumen células con núcleos picnóticos y restos descamativos. Expresan tanto CK como p63 en su pared (400x).

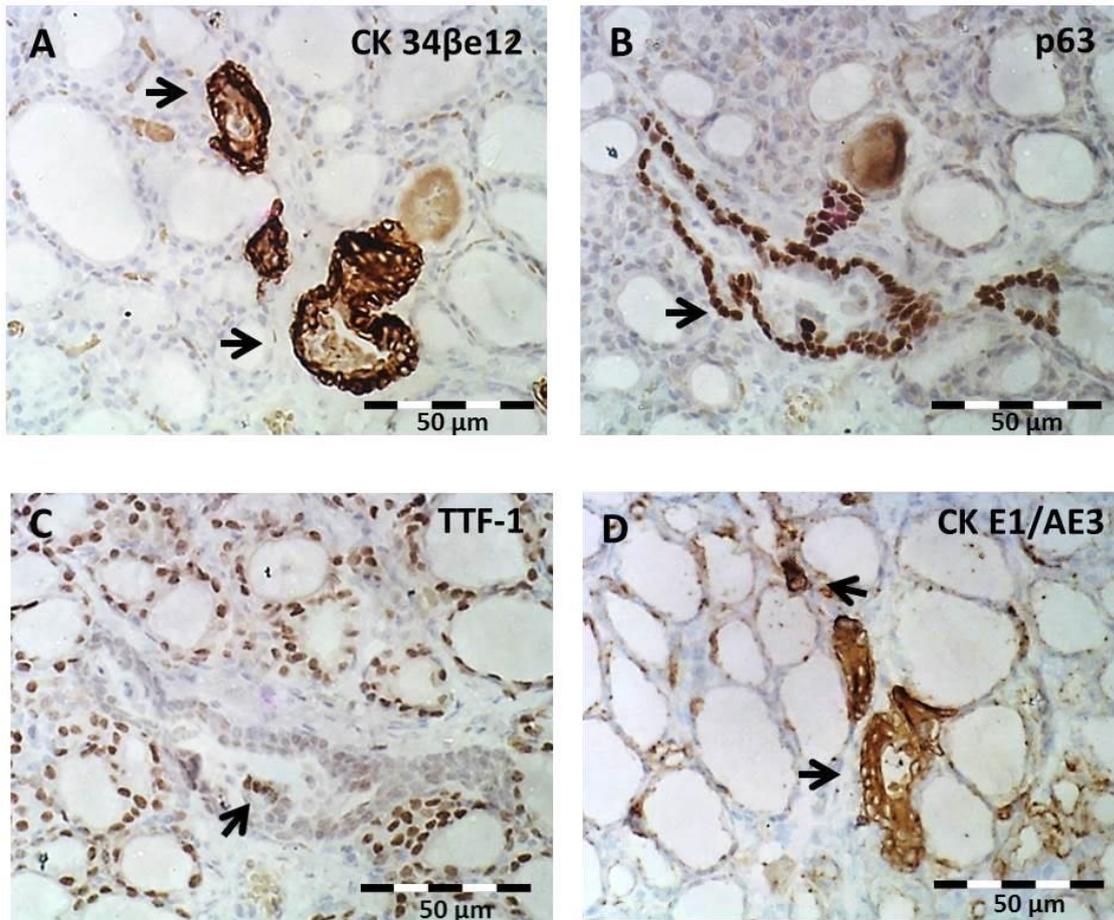


Figura 44.- Perfil IHQ de los “FUB inmaduros”. A) Las células UB son positivas para la CK 34βe12. B) La inmunotinción para p63 muestra un patrón nuclear restringido a las células más periféricas. C) Con TTF-1 no se tiñen las células UB, aunque sorprendentemente se aprecian algunos restos TTF-1 positivos en el lumen. D) Se observa un patrón citoplasmático en la inmunotinción con AE1/AE3, tanto en los restos UB, como en las restantes células endocrinas, especialmente en las células C (400x).

2.3. FUB maduros

La inmunotinción para CK de los “**FUB maduros**” resultó positiva de acuerdo a un patrón citoplasmático. En el caso de la **CK anti-34βe12**, la tinción fue mucho más intensa en las células del estrato basal de la pared, mientras que con el resto de CK se marcó todo el FUB, así como, los restos celulares presentes en el lumen (fig. 45 y 46).

Las células C se tiñeron intensamente con **CT** y se localizaron en posición parafolicular respecto a los folículos tiroideos. En general, no se encontraron células C (CT+) en la pared de los FUB (fig. 45).

En los FUB quísticos maduros, en los que se pueden diferenciar varios estratos celulares en la pared, la expresión de **p63** (fig.45 y 46) queda restringida a la capa basal o más periférica, mientras que con el anticuerpo **TTF-1**, normalmente, no se marca la pared de los FUB maduros (fig.46).

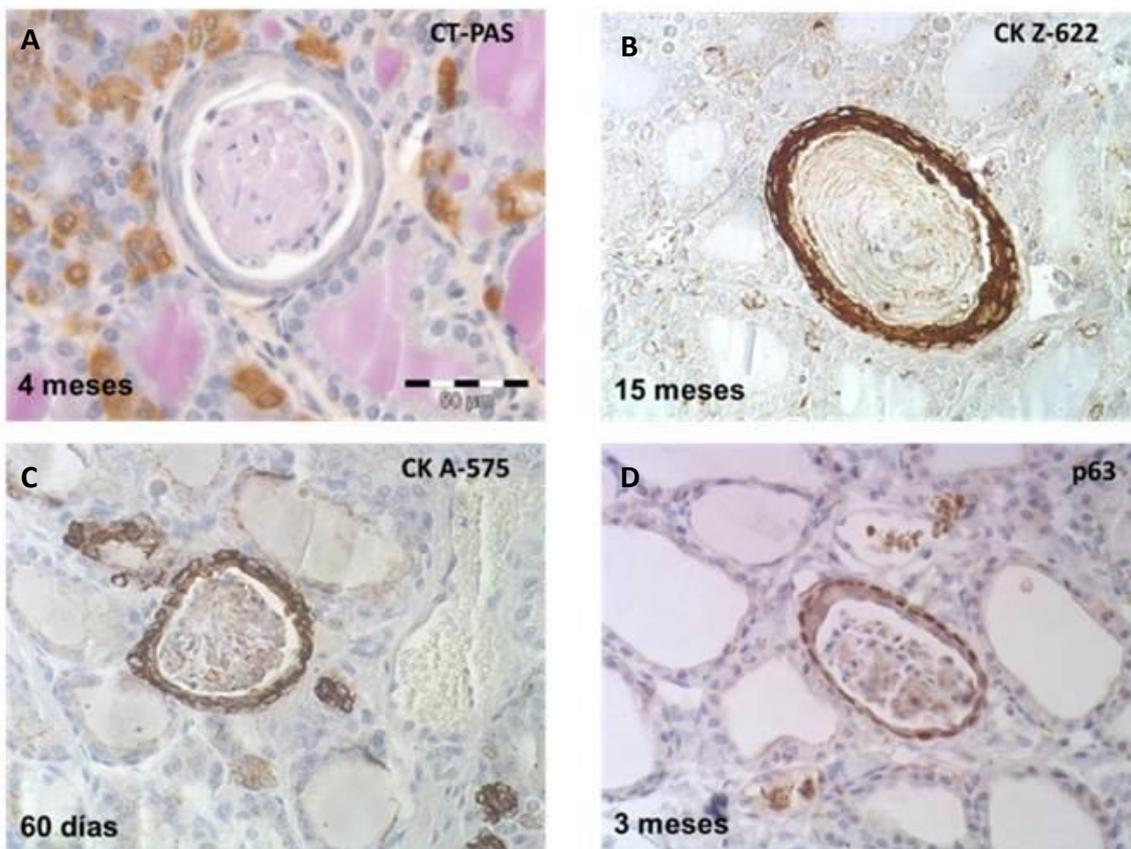


Figura 45.- “Folículos UB quísticos maduros”: presentan una pared muy inmunopositiva para CK mientras que la expresión para p63 queda restringida a las células más periféricas (400x).

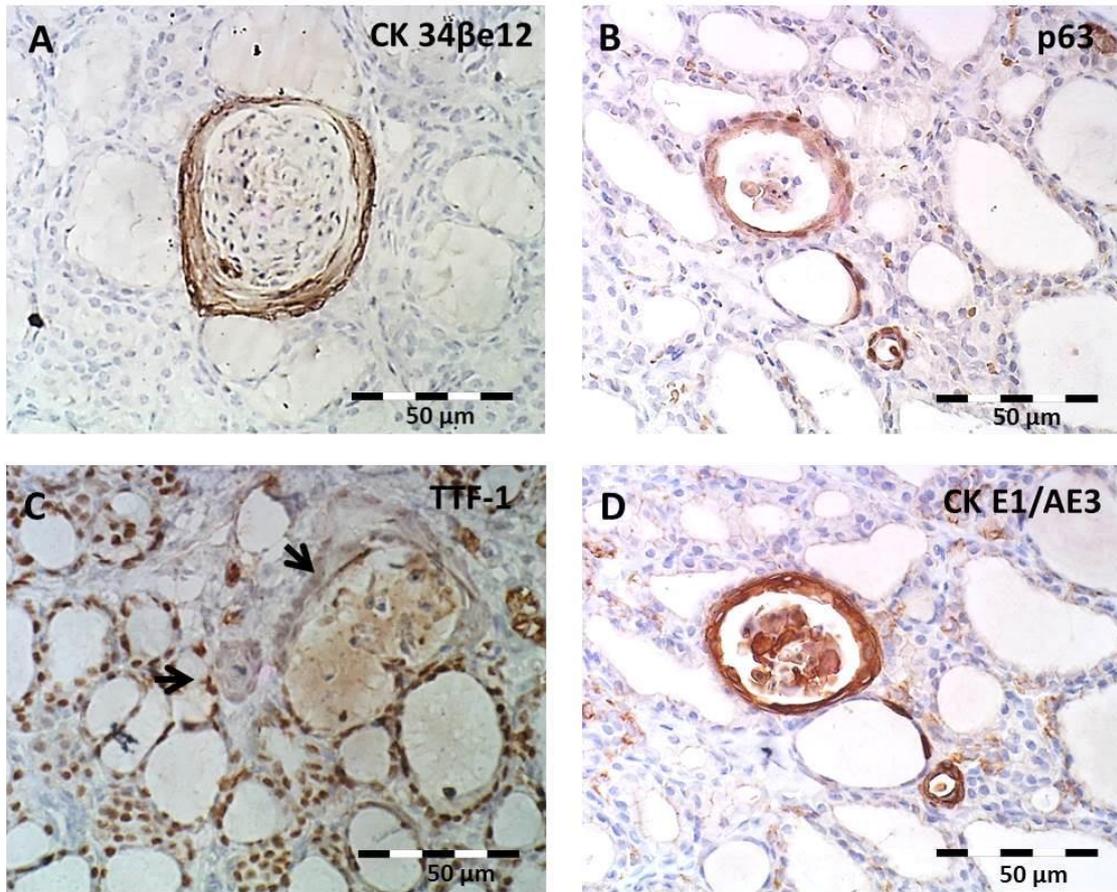


Figura 46.- Perfil IHQ de los “FUB maduros”. Presentan una inmunotinción positiva tanto para los anticuerpos anti-CK como para p63. Mientras que para la CK AE1-AE3 se marcó toda la pared del FUB, e incluso algunos restos celulares del lumen, en el caso de la detección de la CK 34βE12 y de p63, la tinción fue más intensa en el estrato basal o más periférico (400x).

2.4. Cistoadenomas UB

Con los anticuerpos anti-CK, la tinción de la pared de los cistoadenomas UB fue algo más débil que en el resto de patrones morfológicos de FUB, aunque con los anticuerpos **AE1/AE3** y **Z-622** además de las células de la pared se marcó también y de una forma intensa el contenido luminal (fig.47 y 48).

En la pared de los cistoadenomas se localizaron células inmunopositivas para **p63** y se observó que, al igual que ocurre en las formas quísticas maduras, sólo se marcan las células de la capa celular más periférica (fig.47).

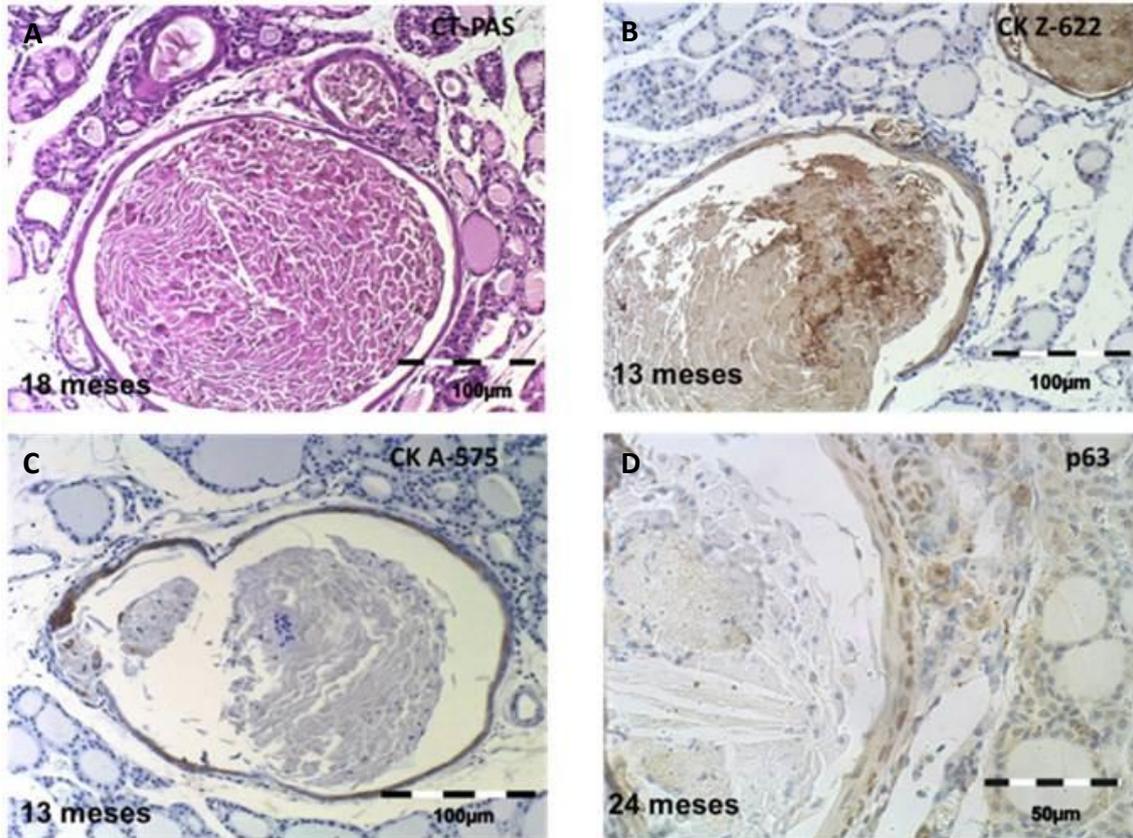


Figura 47.- “Cistoadenomas UB” a distintas edades. Se caracterizan por presentar aspecto típico en bulbo de cebolla así como por su gran tamaño. La inmunotinción para CK es más reducida que en las formas previas (A, B, C: 200x). Se puede observar un detalle a mayor aumento de la pared de un cistoadenoma en una rata de 24 meses, donde se aprecian células periféricas p63-positivas (D: 400x).

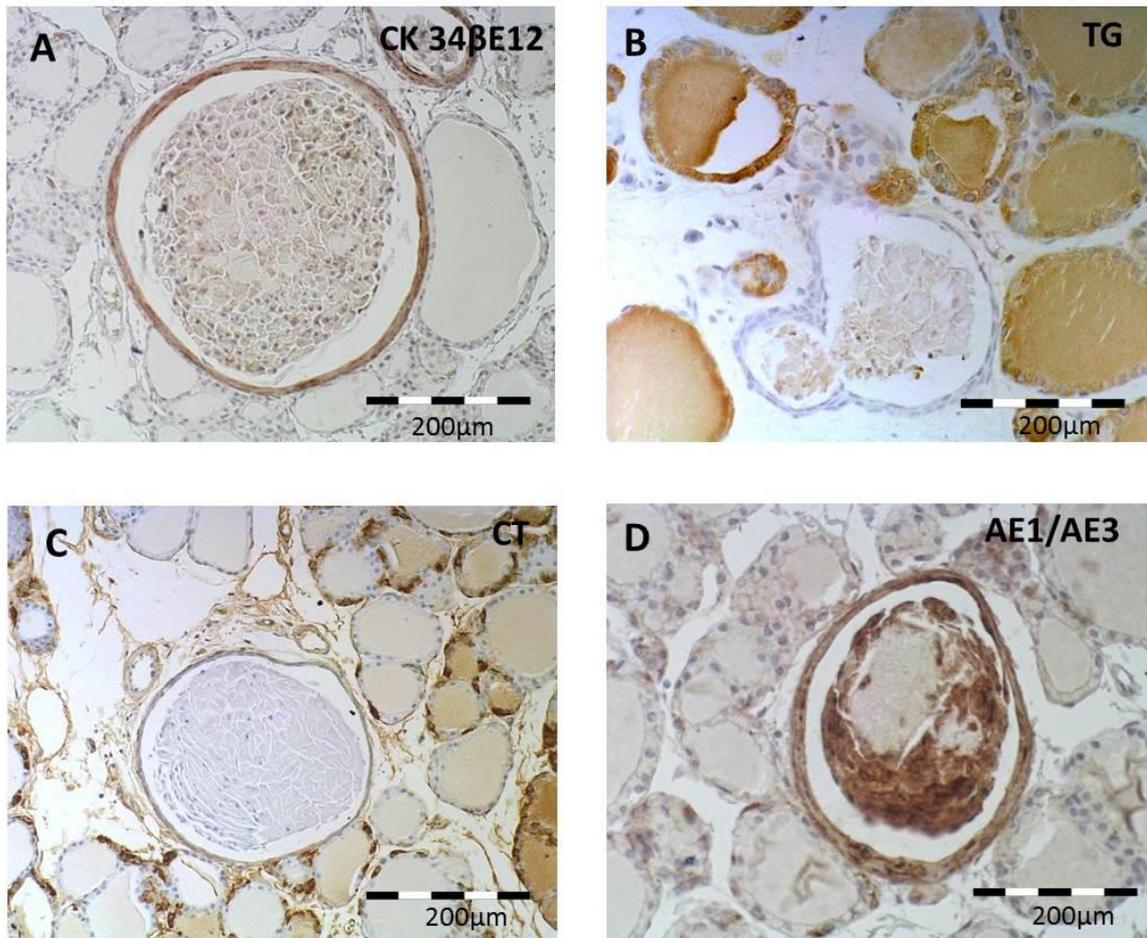


Figura 48.- Perfil IHQ de los cistoadenomas UB. Con CK 34βE12 se marcó de forma específica la pared de los cistoadenomas UB, apreciándose una tinción más intensa en la capa basal, de la misma forma que con p63 (A). Con Tg tan sólo se apreció una tinción inespecífica de los restos celulares presentes en el lumen de los cistoadenomas UB (B) y mediante la inmunotinción para CT no se identificaron células C en la pared de los restos UB (C). El marcaje con AE1/AE3 fue intenso tanto en la pared como en el contenido luminal de los cistoadenomas UB (D) (100x).

Como se ha comentado anteriormente, en una rata de 12 meses, localizamos un **cistoadenoma UB con una morfología más agresiva**, debido a que mostraba un gran tamaño, además de varias unidades quísticas que invadía el parénquima tiroideo adyacente, y que presentaban discontinuidades en sus paredes (fig. 49). Los resultados del estudio IHQ sobre este caso concreto, coinciden con los obtenidos para el perfil IHQ del resto de cistoadenomas UB (fig.49).

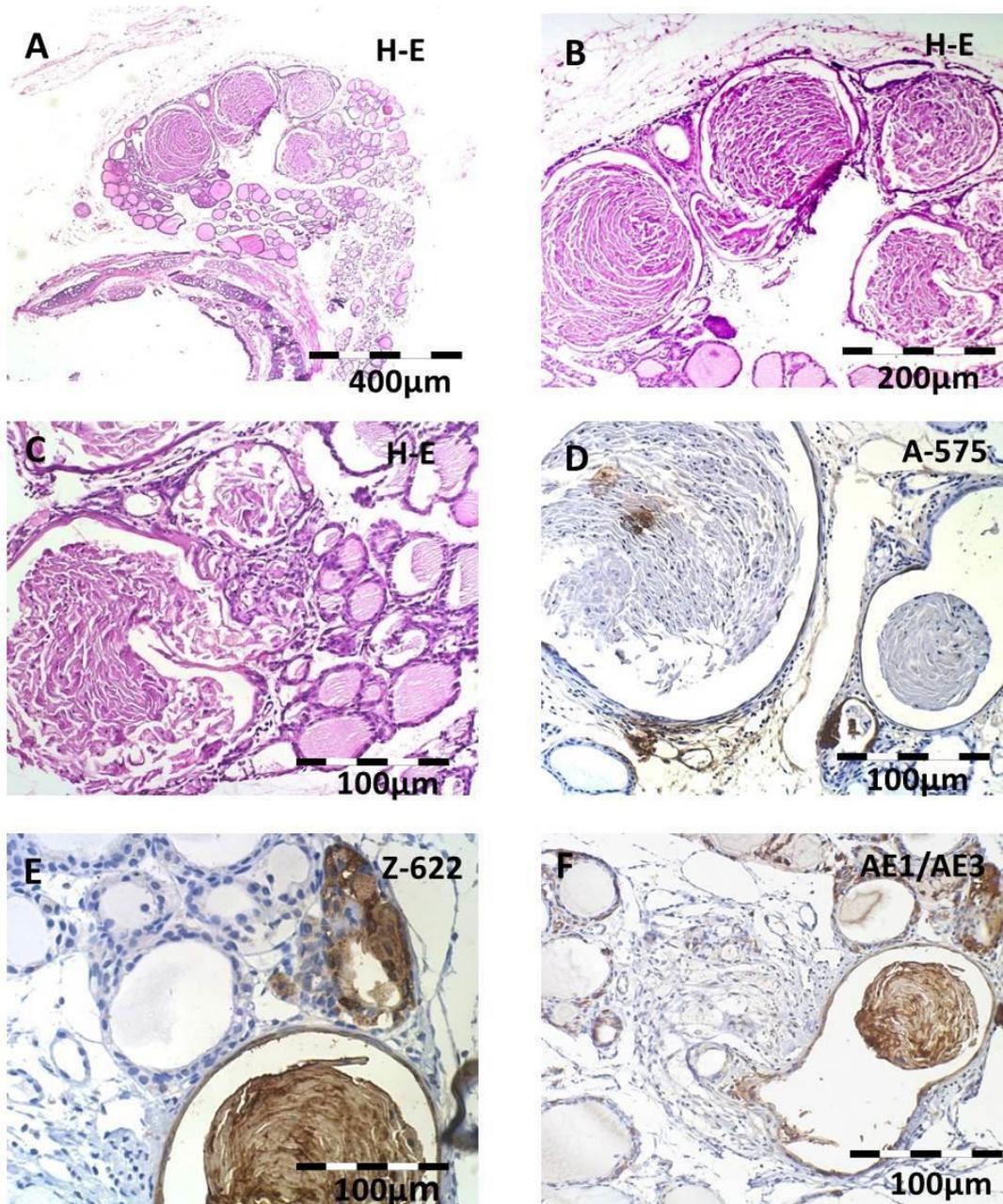


Figura 49.- Perfil IHQ de un cistoadenoma UB con una evolución inusual. En las imágenes A, B y C, se aprecia como el desarrollo morfológico de este cistoadenoma UB es anormal, ya que ocupa gran parte del lóbulo tiroideo y en algunos de sus quistes presenta discontinuidad en la pared, con invasión del parénquima tiroideo adyacente. Para las distintas CK, la inmunotinción fue más intensa con la CK Z-622 y con la CK AE1/AE3, con las que se marcó toda la pared y el contenido luminal, mientras que con la CK A-575 la tinción fue bastante más débil (D, E y F).

2.5. Identificación de células endocrinas en la pared de los FUB

En todos los patrones morfológicos la inmunotinción para Tg resultó positiva en las células foliculares y el coloide de los folículos tiroideos pero, en cambio, fue negativa para las células de la pared de los FUB, tan sólo se observaron algunos restos de coloide TG+ en el lumen, posiblemente artefacto del procesado (fig. 50).

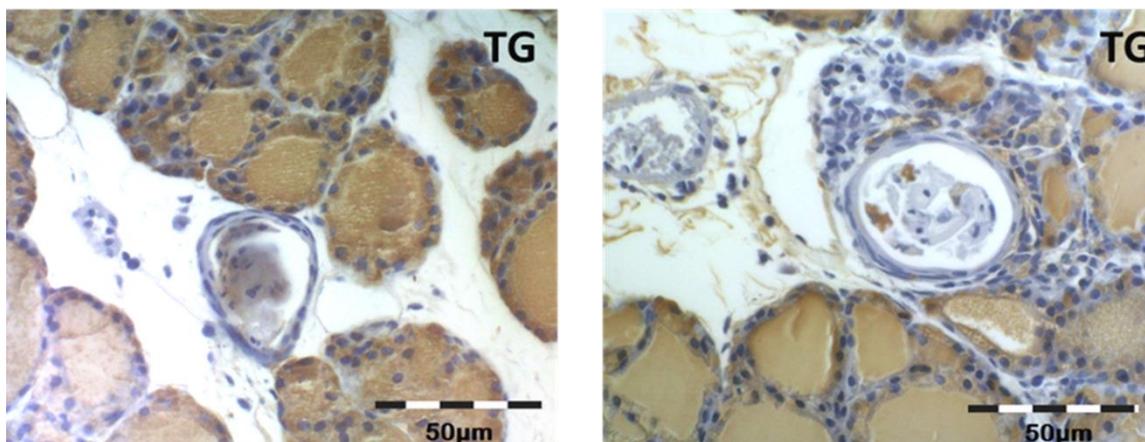


Figura 50.- Inmunotinción para Tg, que resultó positiva para las células foliculares y el coloide de los folículos tiroideos. En los FUB sólo se detectaron restos de tinción inespecífica en el lumen de los FUB (400x).

Ocasionalmente, en la pared de algunos FUB se observaron células positivas para CT o para Tg, en estos mismos folículos había restos de coloide inmunopositivos para Tg, **que también se tiñeron con PAS** (fig. 51). Los FUB que presentaban estas características eran similares a los denominado **folículos mixtos**, en los que parte de un folículo tiroideo normal está asociado a la pared de un FUB.

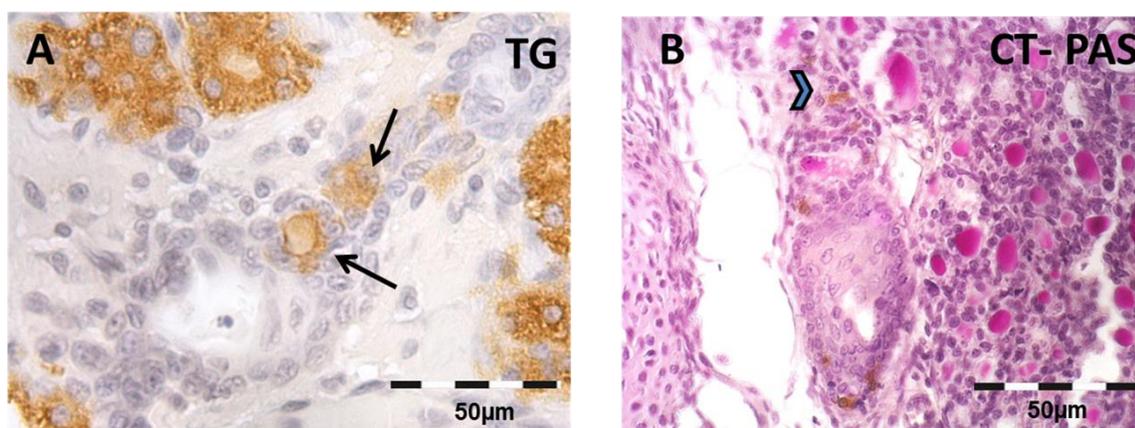


Figura 51.- A) Células foliculares y coloide positivo para Tg. Las células del FUB son Tg (-), pero se observan algunas células Tg (+) (flechas) asociadas a la pared. **B)** FUB con células C en su pared (punta de flecha) y coloide PAS + (400x).

Con el anticuerpo **anti-TTF-1** se marcaron tanto las células foliculares como las células C, mientras que los FUB resultaron negativos, si bien, en algunos casos se observó una tinción muy débil en las células más periféricas (fig.52).

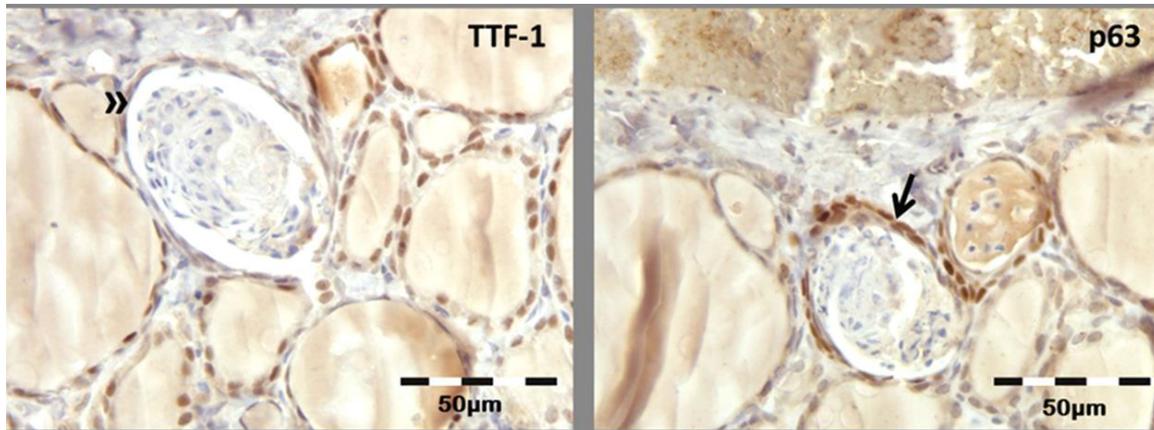


Figura 52.- Inmunotinción para TTF-1 y para p63 de un mismo FUB quístico maduro. Con TTF-1 se marcan las células foliculares y, débilmente, algunas células periféricas de la pared del FUB (»), mientras que con p63 aparece sólo inmunotinción en los FUB, concretamente en la capa de células periféricas o estrato basal (→) (400x).

2.6. Anomalías en el desarrollo del CUB

Durante el desarrollo embrionario del tiroides, el CUB se separa del último par de bolsas faríngeas y se acerca a la vesícula tiroidea con la que se fusiona y, posteriormente, se dispersa en el tiroides dando lugar a las células C (7ª-8ª semana de gestación en humanos; E13-14 en el ratón). En algunas ocasiones, se producen defectos en el desarrollo embrionario que impiden la fusión normal del CUB con el tiroides y, como consecuencia, el CUB puede permanecer en la vida adulta como una masa celular en posición atípica.

En una de las ratas, hemos encontrado un FUB totalmente atípico. Presentaba apariencia quística, gran tamaño y estaba situado en una posición anómala entre el cartílago traqueal y el tiroides. Además, en estrecha proximidad tenía asociado abundante tejido linfático, probablemente de naturaleza tímica. Posiblemente, este FUB atípico sea consecuencia de una alteración en el desarrollo embrionario del CUB.

Tras analizar el perfil IHQ, pudimos comprobar que era el mismo que para el resto de FUB situados en posición intratiroidea, con la particularidad de que mediante inmunotinción para CT se localizaron numerosas células C dispersas en su pared (fig. 53).

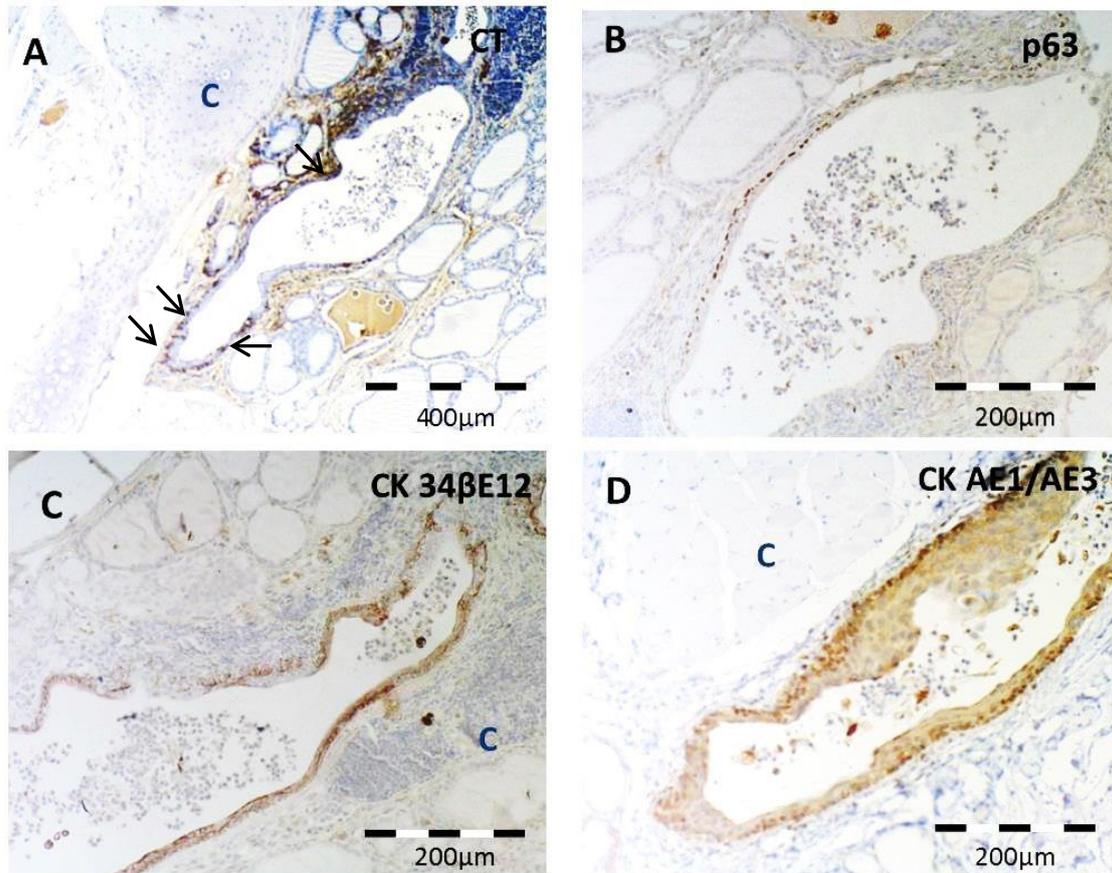


Figura 53.- Perfil IHQ de un FUB en una posición anómala. La micrografía A corresponde a una inmunotinción para CT. Además de ser evidente el gran tamaño de este FUB, su situación anómala junto al cartílago traqueal y la presencia de tejido linfóide asociado al mismo (C), es posible identificar numerosas células C en su pared (→). Con p63 sólo se marcaron las células basales del epitelio del FUB, al igual que con la CK 34βE12, mientras que con CK AE1/AE3 la tinción fue intensa en todo el FUB.

3.- DOBLE INMUNOHISTOQUÍMICA

Una vez realizados los ensayos IHQ cuyos resultados se han expuesto anteriormente, era necesario estudiar la presencia de más de un antígeno en la misma muestra, con la finalidad de aclarar si sus localizaciones coinciden en un mismo FUB. Para ello se realizó la combinación de dos métodos inmunoenzimáticos indirectos de forma secuencial.

3.1. Doble IHQ para p63 y CT

Para la demostración de los antígenos **p63 y CT**, en una misma sección tiroidea, se marcaron en una primera etapa las células inmunopositivas para CT, mediante una

técnica inmunoenzimática en la que se empleó el equipo de visualización LSAB y como cromógeno Fast-Red, de forma que se tiñeron de color rosa todas las células C presentes en la muestra. Posteriormente, se aplicó una segunda técnica inmunoenzimática para la localización de los FUB, que como hemos visto se marcan específicamente con p63. En este caso, se empleó el método EnVision y DAB como cromógeno, por lo que los núcleos de las células de los FUB se pudieron ver de color marrón intenso.

La combinación de estos dos métodos inmunoenzimáticos para la demostración de CT y de p63, confirmó la localización de los FUB en el centro del lóbulo tiroideo, justo en el “área de células C”, ya que los FUB ya sea en forma de nidos sólidos celulares, como FUB inmaduros o como FUB maduros quísticos, siempre aparecen rodeados de células positivas para la CT, pero sin que se aprecie una particular acumulación en su proximidad (fig. 54). Normalmente, no se identifican células C en las paredes de los FUB, sin embargo, como se muestra en la figura 43, en algunos FUB inmaduros, si se localizaron varias células inmunopositivas para CT entre las células p63+ de la pared del FUB (fig.55).

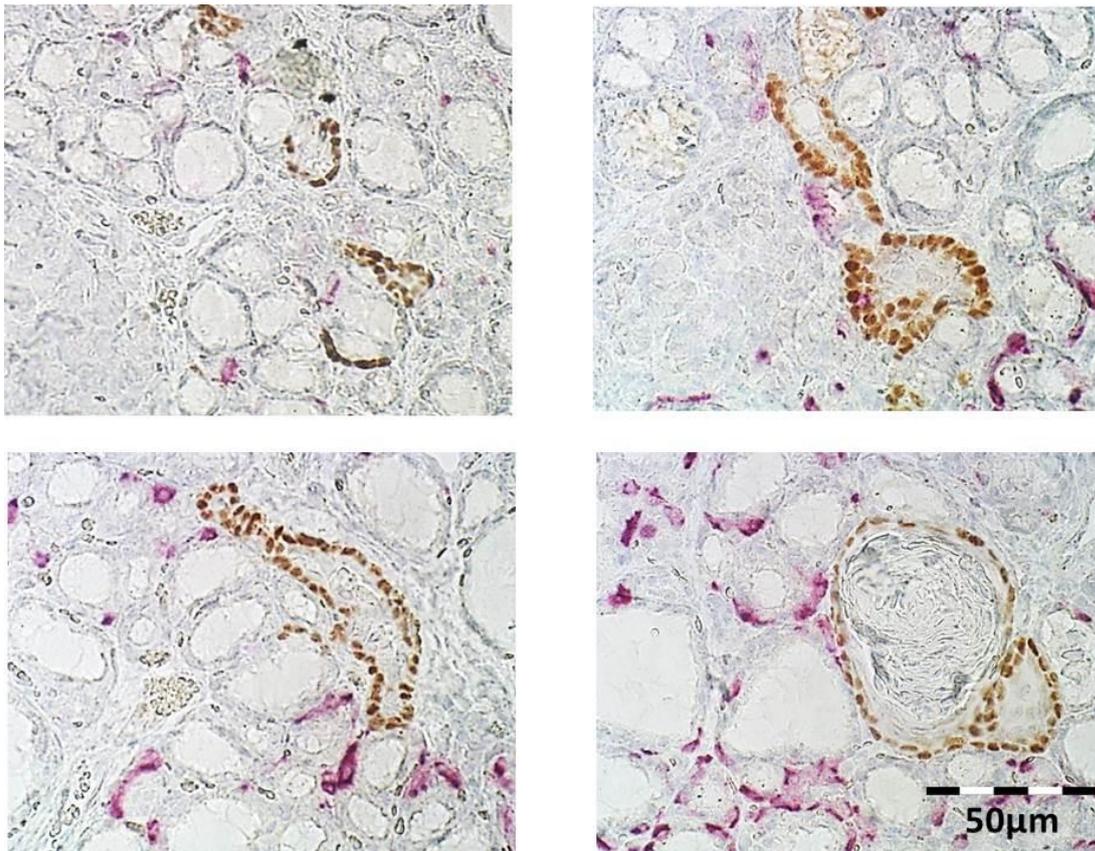


Figura 54.- Doble IHQ para p63 y CT. Todas las formas de FUB (marrones) se encuentran en la proximidad de células C (CT+) (rosas), que no se acumulan especialmente en torno suyo (400x).

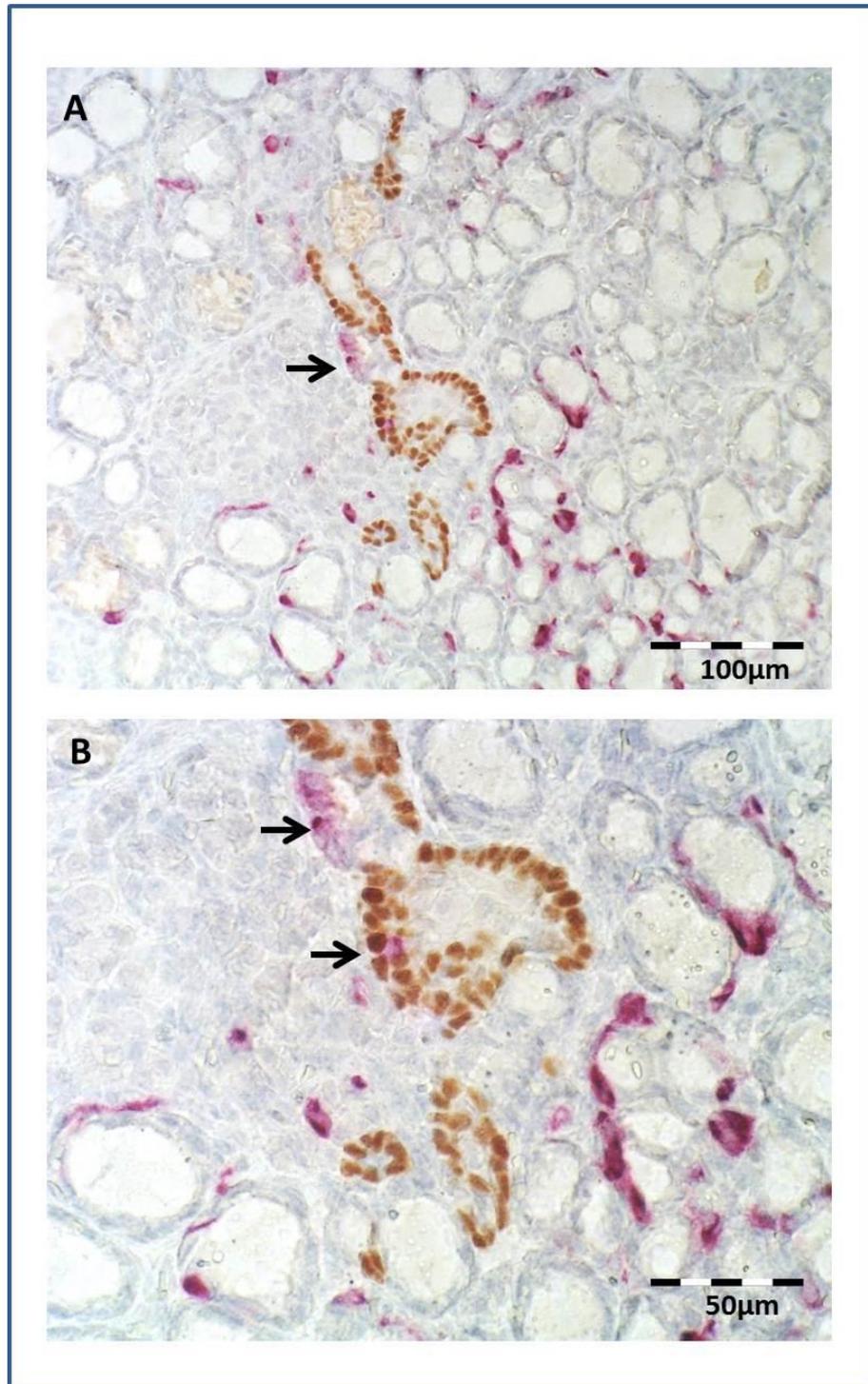


Figura 55.- Doble IHQ para p63 y CT en un FUB inmaduro. A) Área central del tiroides (200x). B) Con más aumento se pueden observar varias células C (flechas) en la zona periférica de la pared del FUB (400x).

3.2. Doble IHQ para p63 y Tg

Para aclarar si las células de los FUB tienen capacidad de sintetizar hormonas tiroideas, o bien, si es posible localizar células foliculares incluidas en la pared de los FUB, se realizó una doble inmunotinción para **p63 y Tg**. En algunas muestras se siguió el mismo método de demostración de los dos antígenos que empleamos para CT y p63, por lo tanto, la Tg se marcó de color rosa con Fast-Red y los FUB de color marrón con DAB. En otros casos la técnica inmunoenzimática fue la misma, pero los cromógenos fueron distintos, de forma que la Tg se marcó marrón con DAB y los núcleos de las células de los FUB se tiñeron de azul con DAB cobalto (fig.56 B y C)).

Los nidos celulares sólidos se marcaron de forma específica con p63 y sólo se identificó Tg en el coloide de los folículos tiroideos adyacentes (fig.56 A).

En algunos casos, se observó Tg en la luz de los FUB inmaduros, mezclada con los restos celulares y el material de (fig. 56 D), por lo que parece demostrado que las células UB, al menos en estas formas inmaduras, tienen la capacidad de diferenciarse en células productoras de Tg.

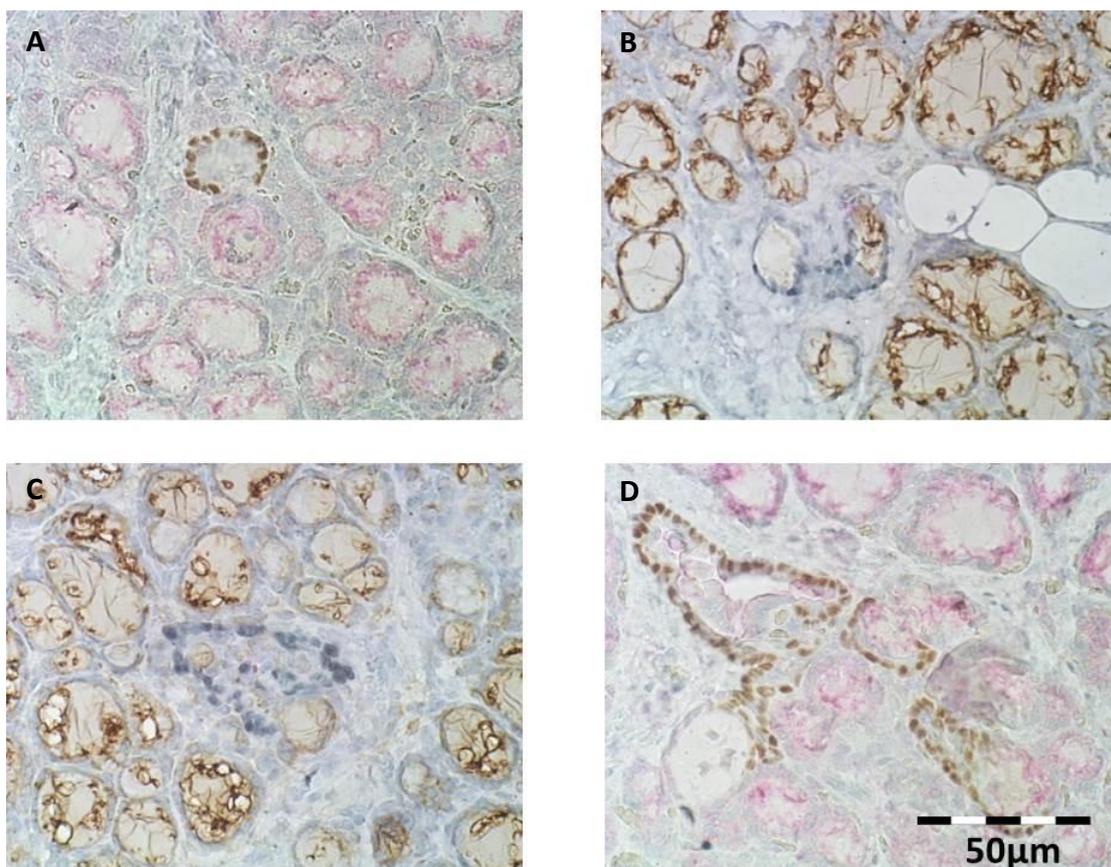


Figura 56.- Doble IHQ para p63 y Tg en distintos patrones de FUB inmaduros (400x).

En la figura 57, se muestran con más aumento dos de las formas de FUB inmaduros en las que se ha detectado Tg en el contenido luminal. Esta Tg debe de haber sido sintetizada por células foliculares diferenciadas a partir de las células UB, o bien, en algunos casos, podría producirse por células foliculares que se encuentren aún en la pared de los FUB. Además, en la microfotografía B, parece que del FUB emerge un folículo tiroideo con coloide positivo para Tg, por lo que que podría tratarse de un folículo mixto como los ya descritos.

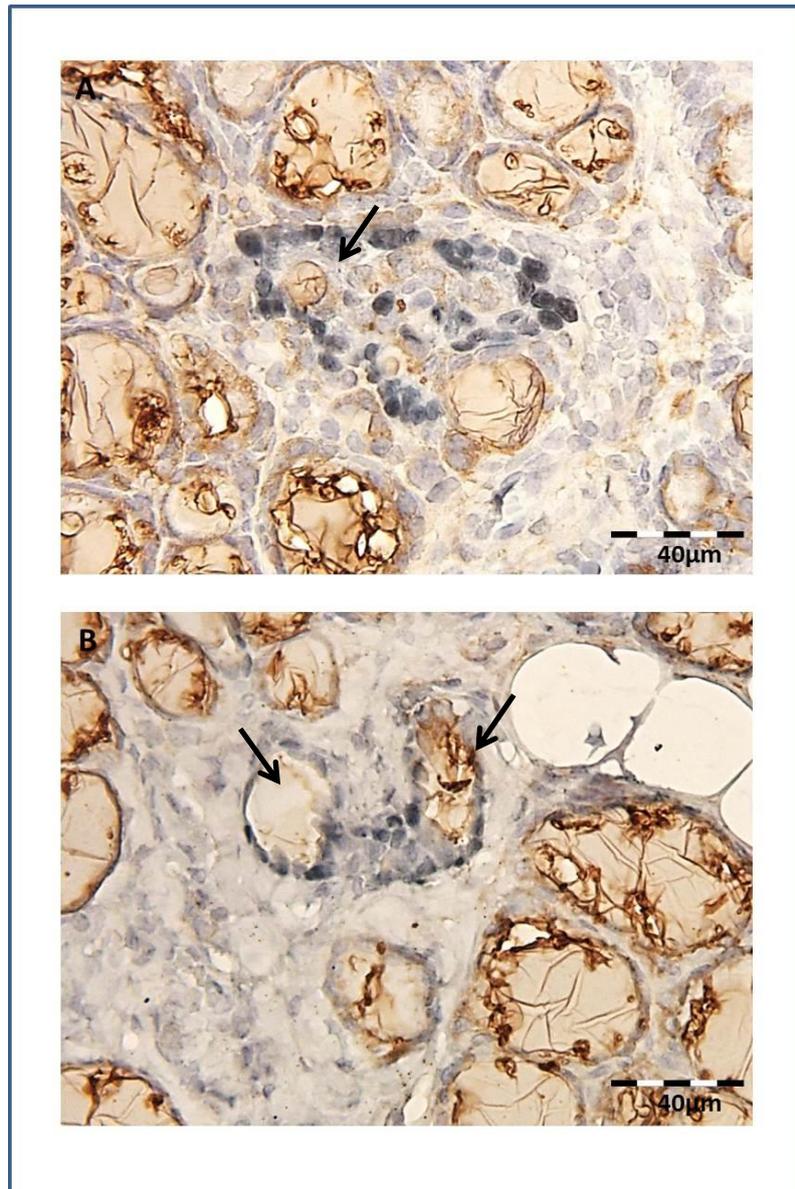


Figura 57.- Doble IHQ para p63 y Tg en dos FUB inmaduros. En estos casos la Tg se marca de color marrón con DAB y los FUB p63+ de color azul intenso con el cromógeno DAB cobalto. Asociado a las células p63+, se observa material positivo para Tg en forma de coloide (flechas) (400x).

4.-DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA

Al igual que con la doble IHQ, mediante la técnica de doble IF pudimos demostrar simultáneamente, en la misma sección tiroidea, la presencia de remanentes UB, así como de las dos poblaciones celulares endocrinas presentes en el tiroides.

En nuestro caso, los restos UB se identificaron mediante IF indirecta con los anticuerpos anti-p63 o anti-CK34βE12 que, tras incubar las muestras con el antisuero secundario de ratón marcado con el fluorocromo Cy3 conjugado, se visualizaron en el canal rojo del microscopio de fluorescencia.

Para la demostración de CT y de Tg, se aplicó la misma técnica, esta vez usando un secundario marcado con el fluorocromo Cy2, y se visualizaron en el canal verde del microscopio de fluorescencia.

Los núcleos, marcados con DAPI, se visualizaron en el canal azul del microscopio de fluorescencia.

Una de las ventajas que mostró la técnica de IF respecto a la de IHQ, fue que al ser un método muy sensible, se pudieron obtener rápidos resultados, ya que esta técnica permite el acortamiento de los tiempos de incubación con los distintos anticuerpos. Sin embargo, presentó la desventaja de que, a lo largo del tiempo, fue disminuyendo la intensidad de la fluorescencia, especialmente en la visualización del DAPI.

La determinación mediante IF de p63, confirmó el patrón de inmunotinción nuclear para este anticuerpo, ya que al solaparse en una misma célula la fluorescencia de los núcleos (azul) con la fluorescencia que corresponde al anticuerpo p63 (roja), las células UB se vieron de color rosa. Asimismo, a través de la técnica de IF pudimos observar de forma precisa el patrón citoplasmático tras el marcaje de la CK34βE12, ya que en las células marcadas con este anticuerpo se observaron los núcleos azules y en la periferia, la fluorescencia roja correspondiente a la CK (fig. 58, 59 y 60).

En general, no se localizaron células C asociadas a los remanentes UB, en ninguno de los patrones morfológicos que presentan los FUB a lo largo de la vida de la rata (fig. 58 y 59). Como ya se pudo comprobar mediante doble IHQ, los FUB se situaron en la zona central del lóbulo tiroideo y, aunque se marcaron las células C de los folículos tiroideos adyacentes, no se apreció una mayor densidad de células CT+ alrededor de los FUB. No obstante, en el caso descrito anteriormente, en el que un FUB ocupaba una posición inusual fuera del tiroides, si se identificaron células C (CT+) entre las células UB de su pared, marcadas tanto con p63 como con CK34βE12 (fig. 60).

La doble IF para p63 o CK34βE12 junto con Tg, resultó ser una forma muy esclarecedora de comprobar la presencia o no de esta molécula en los restos UB. Entre los remanentes UB sólidos, de las ratas muy jóvenes, no se detectó Tg en ningún caso (fig. 58), sin embargo, en el contenido luminal de los FUB, tanto inmaduros como maduros, que se encuentran en ratas de más edad, se localizaron distintas cantidades de Tg (fig. 60).

4.1. Doble IF en los restos UB sólidos

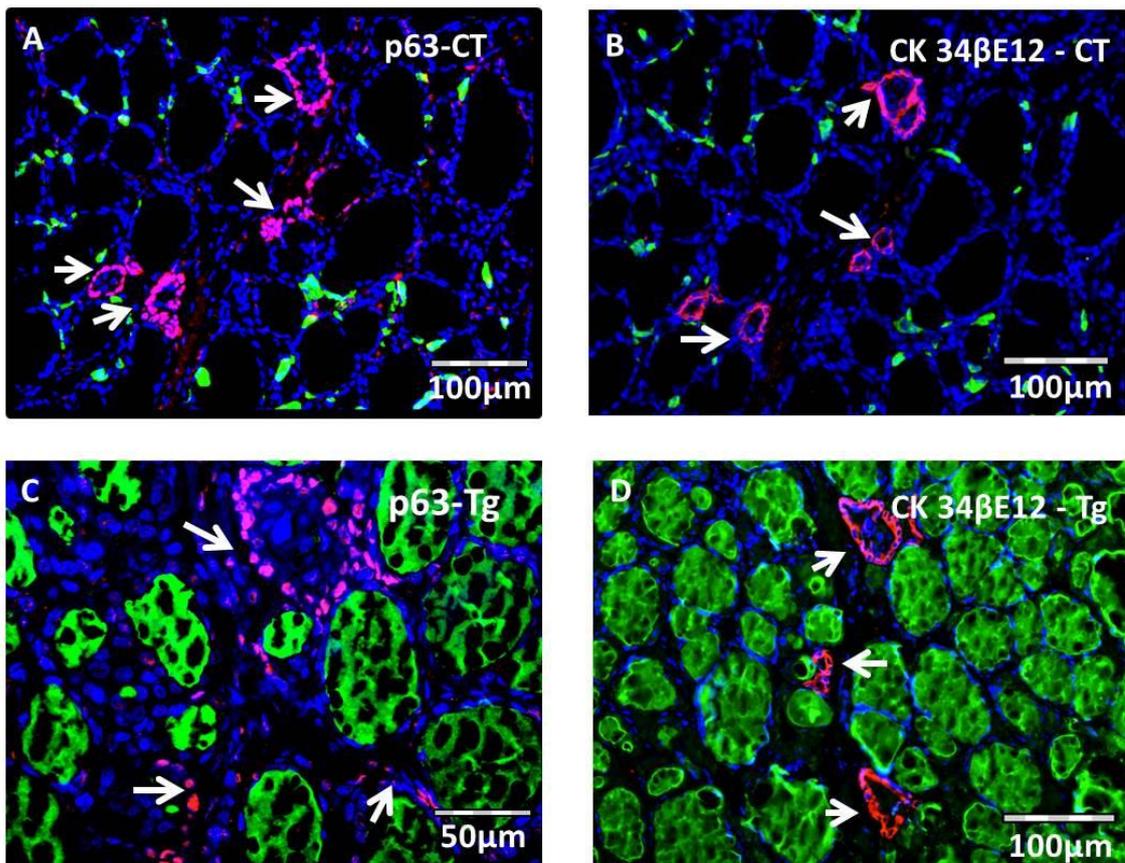


Figure 58.- Doble IF en los restos UB sólidos. Asociadas a los restos UB sólidos, no se observaron células positivas para CT (canal verde) (A y B), de la misma forma que en las ratas jóvenes, no se identificó Tg asociada a los nidos sólidos celulares dispersos entre los folículos tiroideos, marcados de forma específica con p63 o con CK 34βe12 (canal rojo) (C y D). Ratas jóvenes de 7 y 14 días (200x, 400x).

4.2. Doble IF en los “FUB inmaduros”

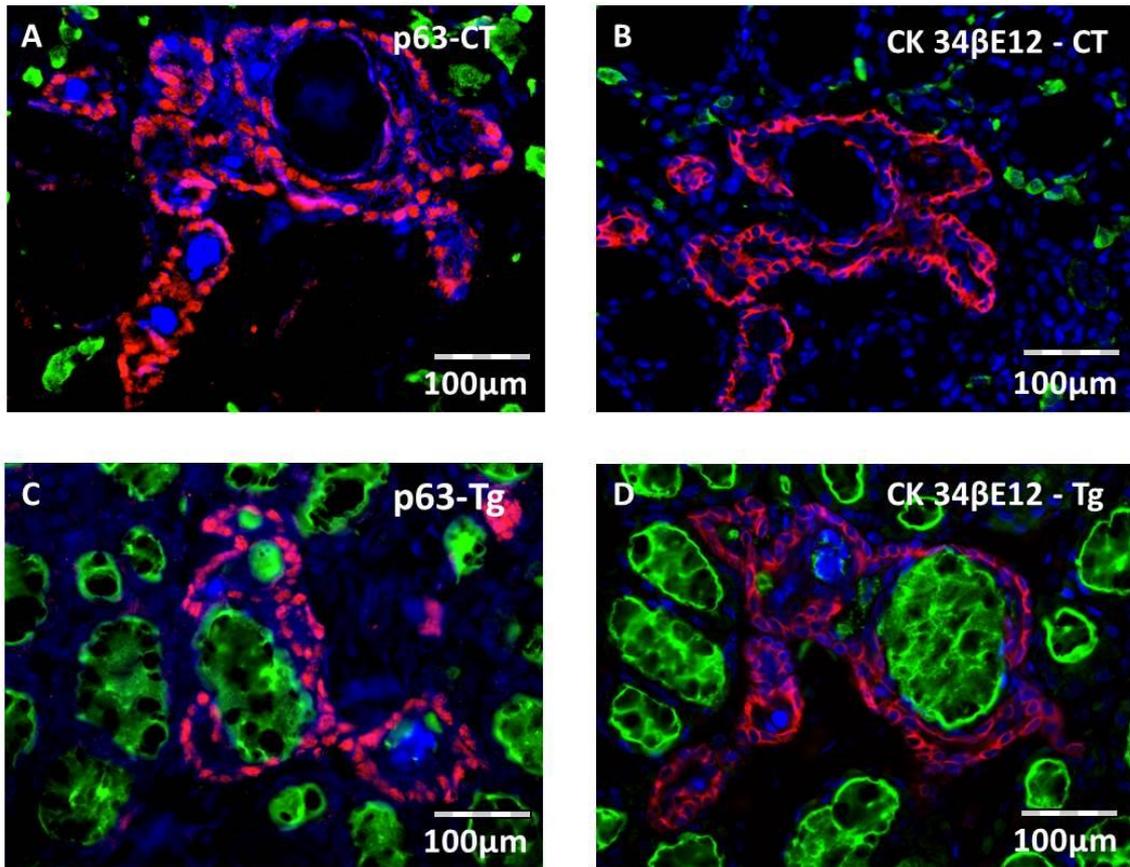


Figure 59.- Doble IF en los “FUB inmaduros”. Los remanentes UB inmaduros se marcaron intensamente con p63, siguiendo un patrón nuclear (rosa) (A y B), y con CK 34βE12 siguiendo un patrón citoplasmático (rojo) (C y D). No se identificaron células C en la pared de los FUB inmaduros, sin embargo, se localizó una abundante cantidad de Tg entre el contenido luminal de estos restos UB (C y D, verde). Rata de 41 días de edad (200x).

4.3. Doble IF en los “FUB maduros”

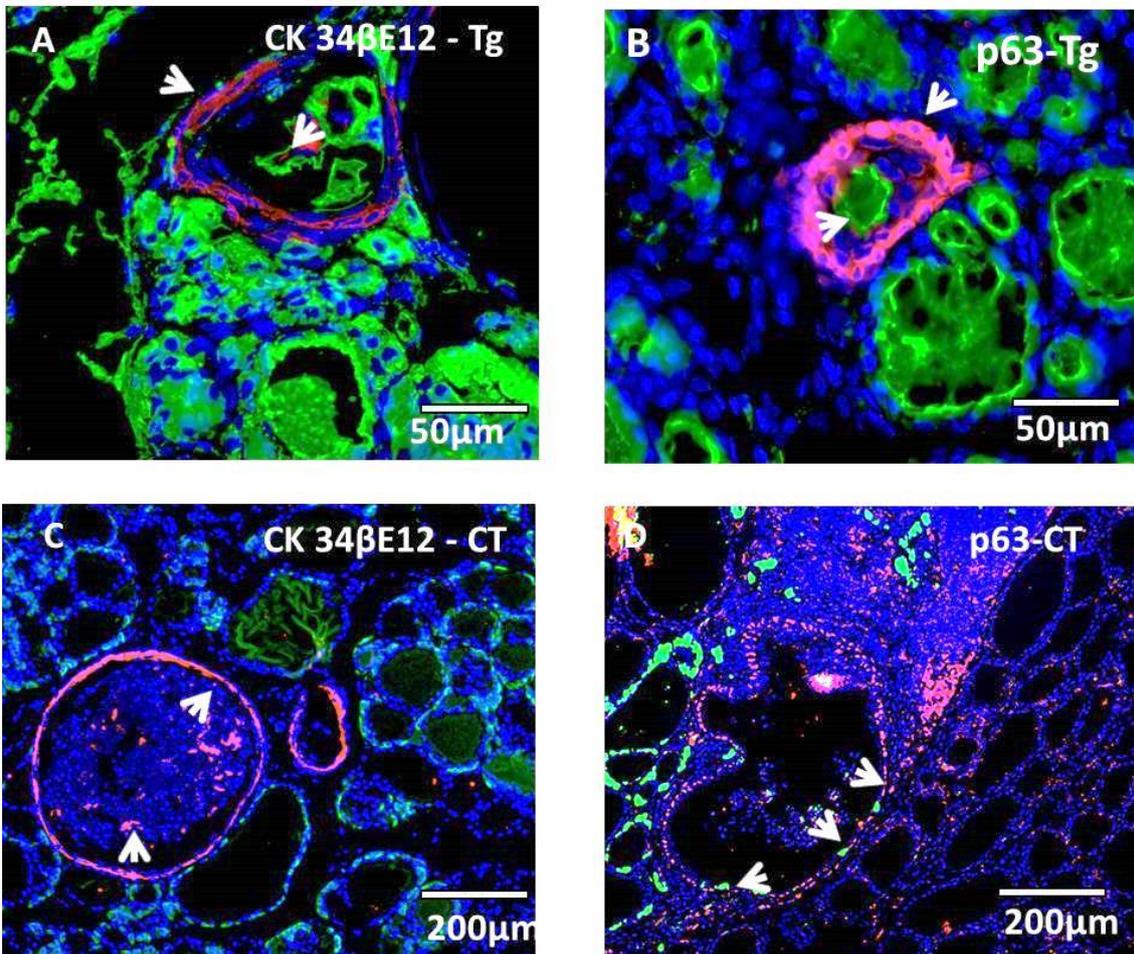


Figura 60.- Doble IF en los “FUB maduros” y en un FUB atípico. Las células de la capa periférica de los remanentes UB quísticos se tiñeron intensamente con p63 (rosa) y con CK 34βE12 (rojo). Normalmente, no se localizaron células positivas para la CT (verde) en la pared de los FUB quísticos (C), sin embargo, se identificaron células C en un FUB atípico, situado en una posición inusual (D). Como se observa en las imágenes A y B, mediante IF se identificó, claramente, la presencia de Tg (verde) asociada a los FUB maduros. Edad de las ratas: A, B y C 12 meses; A 2 meses (100x, 400x).

V.- DISCUSIÓN

V.- DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación trata sobre el estudio de los remanentes embrionarios del CUB, que permanecen en el tiroides a lo largo de toda la vida postnatal de la rata. Se ha analizado tanto la progresión en su desarrollo como su perfil IHQ, con el fin de comprobar la equivalencia de los restos UB de la rata a los existentes en humanos, la contribución de los remanentes UB en la histogénesis tiroidea y, de esta forma, progresar en el estudio del origen de algunas patologías tiroideas de etiología desconocida.

Como ya se ha expuesto, el desarrollo embrionario de la región faríngea presenta una gran complejidad, debido a que de esta región derivan diversos tejidos y órganos, entre los que se encuentran el timo, las paratiroides y la glándula tiroidea. Esta última glándula tiene la peculiaridad de poseer un triple origen embrionario, resultante de la fusión de la vesícula tiroidea, que se origina en la base de la lengua, con los dos CUB que proceden del último par de bolsas faríngeas.

Las investigaciones realizadas sobre los factores de transcripción tiroideos, han permitido mejorar el conocimiento de la embriogénesis del tiroides mediano y del CUB y, de esta forma, comprender la regulación en el desarrollo de esta glándula endocrina, creando una posible vía de estudio para el diagnóstico y posterior tratamiento de ciertas patologías tiroideas.

Los mecanismos moleculares que conducen a la organogénesis e histogénesis del tiroides y del CUB, se basan en una acción cooperativa de distintas vías de señalización y de factores de transcripción específicos para esta glándula, como son TTF-1; Foxe-1 y Pax8, que forman una compleja red reguladora de las células progenitoras del tiroides mediante interacciones recíprocas (Trueba et al. 2005). Pero además de estos factores, se han descubierto otros mecanismos moleculares externos al tiroides que, de alguna forma, también, desempeñan un papel en su desarrollo, como son los factores de crecimiento de los fibroblastos (FGFs) expresados por los derivados mesenquimales de las CN, y las señales inductivas de las células endoteliales de los vasos embrionarios (Varga, Pospíšilová, Gmitterová, et al. 2008; Kameda et al. 2009; Serls et al. 2005; Hick et al. 2013).

Los restos embrionarios UB, han sido descritos en el tiroides de prácticamente todas las especies, incluida la humana, y también muestran características diferenciales interespecíficas, así como distintas denominaciones. En **perros**, se denominan **“complejos de células C”** (Kameda et al. 1980; Leblanc et al. 1990); en **zorros**, **“folículos inusuales** (Srivastav & Swarup 1982); en **toros**, **“remanentes UB”** (Ljungberg & Nilsson 1985; Harmon & Kelley 2001b); en el **bisonte**, **“FUB”** (Sawicki B 1991) y en la **cobaya**, **“S follicles”** (Juhl 1981a).

En el **hombre**, aparecen como estructuras celulares sólidas a las que se les denomina **“Solid Cell Nests (SCN)”**, que han sido estudiadas extensamente por diversos autores (Harach 1988; Mizukami et al. 1994; Cameselle-Teijeiro et al. 1994). Los SCN son formaciones irregulares que consisten en pequeñas agrupaciones de células poligonales con disposición sólida estratificada compuestas por unas células principales o “main cells” y por células C. Ocasionalmente, los SCN adoptan el aspecto de formaciones quísticas con un epitelio estratificado integrado por distintos tipos celulares y, también, se pueden encontrar los llamados **folículos mixtos**, que son estructuras compuestas por epitelio folicular en íntimo contacto con las células principales de los SCN.

En **roedores**, se les han dado distintas denominaciones, pero la más utilizada es la de **folículo UB (FUB)** (Wollman & Nève 1971a; Wollman & Nève 1971b; Nève & Wollman 1971; Martin-Lacave, Conde, Moreno, et al. 1992). Aunque hay estudios que han analizado la morfología de los FUB, lo han hecho de una forma incompleta, porque se han limitado a describir su estructura microscópica en ratas de hasta un año de edad, como máximo, sin que en ningún caso, se hayan valorado las dimensiones de los mismos.

Actualmente, se acepta que tanto los SCN como los FUB son remanentes embrionarios del CUB y que, por lo tanto, tienen un origen UB común (Wollman&Hilfer 1977;Wollman & Hilfer 1978;Beckner et al. 1990; Bellevicine et al. 2012) pero, a pesar de este origen común, existen diferencias en cuanto a su apariencia y evolución en la vida postnatal de ambas especies. De ahí que fuera **necesario realizar un estudio histológico y morfométrico de la evolución de los FUB en el tiroides de la rata**, desde el nacimiento hasta el final de su vida.

Analizando los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se puede afirmar que **los FUB se localizan en la región central de cada lóbulo tiroideo**, íntimamente relacionados con el parénquima tiroideo adyacente y, con frecuencia, en contacto con el tejido conectivo perivascular. Es posible identificar más de un FUB en un mismo lóbulo que, en la mayoría de los casos, están muy próximos e incluso interconectados.

Hemos detectado que los FUB presentan diferencias morfológicas relacionadas con la edad y también diferencias de tamaño según el género.

Según nuestros resultados, **en ratas muy jóvenes (0-60 días)** hay una gran variedad en cuanto a la apariencia, tamaño y contenido luminal de los FUB, pues evolucionan desde **“nidos sólidos celulares”** a pequeñas estructuras quísticas, pudiendo aparecer en algunos casos con forma tubular o de perla. El área de los FUB en este grupo de edad es superior a la de los folículos tiroideos normales adyacentes.

En ratas jóvenes de más de 60 días de edad, la mayoría de los FUB presentan ya aspecto quístico, y en su pared se puede distinguir más de una capa celular, denominándoles **“FUB inmaduros”**. En la periferia muestran células cúbicas que tienden a aplanarse hacia el lumen donde, en general, se pueden observar restos celulares y material de desecho.

En ratas adultas (6-15 meses) predominan los **“FUB maduros”**, con aspecto quístico en la mayoría de los casos, aunque menos frecuentemente, y sobre todo en ratas macho, también pueden aparecer FUB inmaduros. Los FUB maduros presentan en su pared células más aplanadas que las que aparecen en las formas inmaduras. En el contenido luminal se distinguen núcleos picnóticos, células descamativas y material PAS (+).

En general, hemos comprobado que en ratas hembra los FUB son ligeramente mayores que en ratas macho, al igual que el área de los FUB es mayor que la de los folículos tiroideos normales, mientras que en los machos, los FUB son mayores que los folículos tiroideos adyacentes, pero sin significación estadística.

En ratas viejas (18-24 meses), también predominan los FUB maduros de aspecto quístico. En hembras el área de los FUB es mayor en relación a la de los folículos tiroideos normales, mientras que en los machos ocurre justo lo contrario.

Cuando se considera el valor del área de los FUB en ratas adultas y viejas conjuntamente, el área de los FUB en hembras es mayor que la de los FUB en machos, con significación estadística.

En ratas adultas y viejas, además de las formas inmaduras y maduras de FUB, se puede encontrar otra forma de remanente UB a la que hemos denominado en base a su apariencia **“cistoadenoma UB”**, que se caracteriza por su gran tamaño y su aspecto quístico, así como por el contenido luminal dispuesto en múltiples capas concéntricas formadas por células descamadas, sin rastros de núcleos, aparte de poseer una vascularización escasa en su proximidad. Se encuentran más frecuentemente en ratas hembra y, además, en éstas son de mayor tamaño que en las ratas macho. En ambos casos, el tamaño de los cistoadenomas UB es siempre mayor que el de los folículos tiroideos adyacentes.

En relación con la **frecuencia** de los FUB en las ratas Wistar, estas estructuras se han observado en prácticamente todas las glándulas. Estos resultados difieren de los descritos por Van Dyke para ratas Sprague-Dawley que, en los mismos tramos de edad, describieron distintas frecuencias de FUB con ratios del 15%, 34,5%, 61,9%, siendo más frecuentes en ratas hembra (Van Dyke JH. 1944). Rao-Rupanagudi en 1992, encontró quistes UB en un tercio de las ratas estudiadas y, al igual que Takaoka en 1995, informó que el número de FUB disminuía con la edad de la rata (Rao-Rupanagudi et al. 1992; Takaoka et al. 1995).

Una posible explicación de esta controversia puede ser el número de secciones observadas por glándula por los distintos autores. De acuerdo con nuestra experiencia, cuando no se observa ningún FUB en una rata, tras estudiar los niveles de tiroides seleccionados, y se procede a teñir secciones adicionales de la misma glándula, se incrementa progresivamente la posibilidad de detectar FUB. Por eso, podemos afirmar que **los FUB están presentes en ambos lóbulos tiroideos y en todas las ratas, independientemente de la edad y del género.**

En relación con la mayor incidencia de FUB detectada en hembras respecto a machos, algo que otros autores habían descrito con anterioridad (Rao-Rupanagudi et al. 1992; Van Dyke JH. 1944), una posible explicación podría ser el tamaño significativamente mayor de los FUB en las ratas hembra respecto a las macho lo que, consecuentemente, aumentaría las posibilidades de localizar FUB en las secciones seleccionadas de ratas hembra, junto con una mayor facilidad para diferenciarlos de los folículos tiroideos normales.

Atendiendo a nuestros resultados, ésta sería la primera vez que se describe la existencia de un **dimorfismo sexual relacionado con los restos UB de la glándula tiroidea en rata**, ya que, hasta ahora, prácticamente todos los estudios se habían realizado sobre ratas macho.

En cuanto a humanos, tampoco hay resultados concluyentes respecto a la frecuencia relativa de los SCN en relación al sexo. De acuerdo con los resultados descritos por Cameselle et al. (Cameselle-Teijeiro et al. 1994), el ratio hombre: mujer de SCN es de 1:6, sin embargo, otros autores refieren SCN en un 16% de hombres respecto al 8% de mujeres (Martin et al. 2000).

El dimorfismo sexual descrito en este trabajo, es coincidente con lo publicado respecto a la frecuencia de desórdenes proliferativos con origen en las células C, como son la hiperplasia de células C y los tumores de células C, ya que presentan una mayor incidencia en las ratas hembra respecto a las ratas macho (Martin-Lacave et al. 1999).

En relación con la incidencia de tumores espontáneos derivados de las células foliculares en ratas, los datos varían según la estirpe y el grupo de investigación. Específicamente, algunos investigadores describen una mayor frecuencia en las hembras que en los machos (Baum et al. 1995; Kaspereit-Rittinghausen et al. 1990), pero otros, no obstante, informan de resultados opuestos (Goodman et al. 1979; Goodman et al. 1980).

En humanos, sin embargo, las neoplasias derivadas de las células foliculares (adenoma folicular, carcinoma folicular, carcinoma papilar de tiroides y carcinoma anaplásico de tiroides), así como de las células C (carcinoma medular de tiroides), son más comunes

en mujeres que en hombres (Dionigi et al. 2007), aunque las razones de este dimorfismo sexual en la patología tiroidea aún no se han descrito.

Las investigaciones sobre el desarrollo del tiroides, en general, se han llevado a cabo sobre distintos **modelos animales** como son las aves, los roedores y, recientemente, los peces. El tejido tiroideo se organiza de diferente forma entre estas especies, por ejemplo, en los peces óseos los folículos tiroideos aparecen dispersos en numerosos grupos de pequeño tamaño a lo largo de la aorta ventral, las arterias branquiales, el corazón, el bazo y los riñones (Fagman & Nilsson 2011). Una característica común a todos los vertebrados no mamíferos (aves, peces, anfibios y reptiles) es la ausencia de células C intratiroideas ya que presentan dos glándulas UB, que provienen del último par de bolsas faríngeas y que en estas especies no se fusionan con el tiroides, sino que permanecen como estructuras independientes y, aunque morfológicamente su aspecto es variable entre las distintas especies, en todas coinciden en sintetizar la hormona CT (Varga, Pospíšilová, Gmitterová, et al. 2008).

No obstante, el tiroides no es la única glándula endocrina en la que se aprecian diferencias estructurales importantes entre los mamíferos y los no mamíferos (Elvira Estrada Flores 2002). Por ejemplo:

- **La glándula adrenal** en los vertebrados inferiores aparece como dos glándulas independientes, una es de tejido esteroidogénico y la otra de tejido cromafín, distintos tanto por su origen embrionario como por su histología. En anfibios, aparecen como islotes de distribución variable sobre la superficie ventral del riñón y en reptiles, son estructuras pareadas, independientes y encapsuladas. En los vertebrados más desarrollados, estas dos estructuras se unen y forman asociaciones morfológicas cada vez más complejas.

- **El páncreas endocrino**, en los peces, aparece en forma de agrupaciones celulares dispersas en el mesenterio intestinal. En las aves, los islotes están más diferenciados, pudiendo identificarse algunos en los que predomina un único tipo de célula pancreática endocrina, e incluso, en algunos géneros pueden formar una masa única y voluminosa.

- **Las paratiroides** están vinculadas con la glándula tiroidea tanto anatómica como embriológicamente. Derivan de los sacos faríngeos III-IV y se sitúan en las proximidades del tiroides o incorporadas a éste. En aves, anfibios y reptiles, se conocen de uno a tres pares de paratiroides. En aves son relativamente voluminosas, probablemente por la actividad metabólica del calcio para formar el cascarón de los huevos, y se localizan en situación inferior al tiroides, aunque en algunas especies se fusionan.

En el caso concreto del tiroides, la diferencia que existe entre vertebrados mamíferos y no mamíferos en cuanto a la fusión del par de cuerpos UB con la vesícula tiroidea, podría ser justificada desde el punto de vista de los distintos requerimientos metabólicos en ambos grupos de vertebrados. Por un lado, todos los vertebrados no mamíferos, excepto las aves, son animales ectotérmicos, término que se aplica a aquellos animales cuya temperatura corporal no depende de sus propios mecanismos fisiológicos, sino del calor del ambiente en el que viven. Por otro lado, en las aves y en otros animales ovíparos, la actividad de la glándula UB varía según la madurez sexual, siendo especialmente activa antes de alcanzarla, posiblemente debido al mayor requerimiento de calcio para la futura formación del huevo, lo que indica su relación con la modalidad de reproducción de estas especies (Elvira Estrada Flores, 2002). En cuanto a los peces, cobra una mayor importancia, si cabe, la existencia de una glándula UB productora de CT pues están inmersos en un medio acuático con concentraciones salina muy altas ante las que tienen que mantener su propio medio interno hipotónico.

En mamíferos, sin embargo, la fusión del CUB con el tiroides en desarrollo y la incorporación de las células C a esta glándula en posición parafolicular, es decir, en íntimo contacto con el epitelio folicular, debe representar un logro filogenético de este grupo sobre los vertebrados no mamíferos. De hecho, nuestro equipo de investigación ha demostrado la existencia de una interrelación funcional entre las células C y las células foliculares, estando ambas poblaciones celulares endocrinas reguladas por la TSH y existiendo una regulación paracrina de las células C sobre las células foliculares, mediada por los diferentes péptidos reguladores secretados por las células C (Utrilla et al. 2013; Morillo-Bernal et al. 2009).

Por todo ello, entre los distintos **modelos de experimentación animal**, parece que **es la rata uno de los que presenta una mayor similitud con el hombre para el estudio del tiroides**, ya que posee características estructurales semejantes y un desarrollo embrionario común.

A pesar de esto, como los SCN humanos y los FUB de la rata presentan diferencias en cuanto a su apariencia y evolución, era necesaria una **caracterización IHQ** de las distintas formas de FUB que aparecen a lo largo de la vida de la rata, **con el fin de comprobar, también, si existe una equivalencia entre el perfil IHQ de los restos UB en ratas respecto al existente en humanos y, consecuentemente, de las poblaciones celulares que los integran.**

Son numerosos los **estudios IHQ** que se han realizado sobre los SCN en tiroides humanos (Harach & Wasenius 1987; Autelitano et al. 1987; Reis-Filho et al. 2003; Cameselle-Teijeiro et al. 2005; Rios Moreno et al. 2011;). Al analizar los resultados de estos estudios se puede afirmar que las células principales o “main cells” de los SCN son inmunorreactivas para algunas CK, CEA, p-63, bcl-2 y ki67. Sin embargo,

carecen de inmunorreactividad TTF-1. En cuanto al comportamiento de los FUB frente a estos mismos anticuerpos, apenas hay información, ya que son muy escasos los estudios IHQ en ratas y los pocos que se han realizado son incompletos, pues sólo demuestran la presencia de CT y Tg en algunas formas de FUB (Moreno et al. 1989; Conde et al. 1992; Martín-Lacave, et al. 1992)(I et al. 1999; Martín-Lacave et al. 1992). Por lo tanto, al no haberse realizado hasta la fecha ningún análisis IHQ sobre las distintas presentaciones que adoptan los FUB a lo largo de la vida postnatal de la rata, era de gran interés realizar este estudio IHQ. Tras analizar los resultados, podemos concluir que **el comportamiento, de los FUB en ratas y de los SCN en humanos, frente a los anticuerpos empleados es similar.**

Todas las formas de FUB son inmunopositivas para las distintas CK estudiadas, aunque con ligeras diferencias. Cuando se emplearon los anticuerpos anti-CK con referencia A-575 y Z-622, así como el anticuerpo AE1/AE3, las células UB resultaron positivas pero, también, las células foliculares y las células C mostraron una débil positividad. Sin embargo, el marcaje para la CK 34 β E12, se restringió a los restos UB, permitiendo distinguirlos con gran facilidad del parénquima tiroideo adyacente.

Este resultado es fundamental para la identificación de las formas inmaduras, ya que su localización con H-E, o con la técnica del PAS, resultaba especialmente complicada por la imposibilidad de diferenciarlas de su entorno. El análisis microscópico de las muestras teñidas para CK, nos ha permitido comprobar que las formas inmaduras (restos sólidos) no sólo se encuentran en las ratas jóvenes, sino que también pueden aparecer en ratas de mayor edad, distribuidas por el parénquima tiroideo o alrededor de los FUB quísticos.

La inmunotinción para CK de los FUB quísticos (maduros e inmaduros) también resultó positiva e intensa, marcándose tanto la pared como los restos descamativos del lumen. En el caso de los cistoadenomas UB, la tinción también fue positiva, aunque menos intensa que en las formas anteriores, lo que puede indicar que son derivados con paredes envejecidas y con menos capacidad de renovación.

En todos los casos, la especificidad de la tinción y su intensidad hacen que los restos UB se distingan perfectamente del parénquima tiroideo adyacente, independientemente de su morfología y tamaño, así como de la edad de la rata y, de esta manera, ningún resto UB pasa desapercibido. Por esta razón, **las CK y, en especial la CK 34 β E12, pueden considerarse un marcador específico de los FUB a nivel del tiroides.**

Como se ha comentado anteriormente, **el factor de transcripción nuclear p63**, juega un importante papel en la ruta de diferenciación de líneas celulares específicas, ya que actúa regulando la progresión del ciclo celular, manteniendo la capacidad proliferativa o induciendo apoptosis, en función del estímulo ambiental recibido por la célula, por lo

que es considerado un marcador de células indiferenciadas.(Burstein et al. 2004; Nekulova et al. 2011).

La expresión de p63 ha resultado positiva en las distintas formas de FUB, de acuerdo a un patrón de inmunotinción nuclear y, a medida que aumenta la edad de la rata, la expresión de p63 se restringe a las células más periféricas, lo que sugiere que a partir de ellas se podría ir renovando la pared del FUB, y perdiendo capacidad de renovación con la edad. En la pared de los cistoadenomas UB también las células periféricas muestran positividad para p63, aunque algo menos intensa.

Todas las formas de FUB, incluso las formas inmaduras dispersas entre el parénquima tiroideo, se marcan específicamente para p63, por lo que **junto con la CK 34βE12, la p63 se considera un marcador específico de los FUB.**

Por otro lado, **TTF-1** que es un factor de transcripción tiroidea que se expresa en células diferenciadas, marcó tanto las células foliculares como las células C. Generalmente, las células que componen la pared de los FUB no expresaron TTF-1 aunque, en algunos casos, se pudieron apreciar células aisladas inmunopositivas para TTF-1. Este hecho sugiere la posibilidad de que a partir de las células indiferenciadas de los FUB se puedan generar ambas poblaciones endocrinas.

Diversos autores han señalado la posible implicación de los FUB y de los SCN en la **histogénesis tanto de las células foliculares como de las células C**(Moreno et al. 1989; Martin-Lacave, et al. 1992; Conde et al. 1992; Ríos Moreno et al. 2011; Cameselle-Teijeiro et al. 2005). Eso implicaría la presencia de células precursoras en su pared, que serían positivas para algunos marcadores de células indiferenciadas. Como ya se ha dicho, en los SCN esas células indiferenciadas son conocidas como “main cells” y expresan tanto p63 como CK 34βE12. Según nuestros resultados, los FUB también muestran células inmunopositivas para p63 y para CK de alto peso molecular, marcándose todas las células que integran las formas inmaduras de FUB y sólo las capas basales periféricas de las formas quísticas de FUB, por lo que podríamos concluir que **en los FUB se encuentra una población abundante de células indiferenciadas.**

Además, para comprobar si los FUB contribuyen en la vida postnatal de la rata a la formación de alguna o de ambas poblaciones endocrinas, se ha realizado una **doble inmunotinción para p63 junto con CT o bien con Tg.** Mediante la **doble IHQ para p63 - CT**, se ha comprobado que en la pared de algunos FUB inmaduros pueden aparecer escasas células C. También hemos hallado colocalización de células C en la pared de un FUB inusual que, por un defecto en el desarrollo embrionario, aparecía en posición atípica entre el tiroides y el cartílago traqueal. Este hallazgo es de gran importancia, ya que además de apoyar la teoría que muchos autores han lanzado sobre la histogénesis de células C a partir de los restos UB, aporta información para poder clarificar la

controversia sobre el origen embrionario de las células C, aspecto que será tratado más adelante.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante la **doble inmunotinción para p63 -Tg** hemos comprobado que en algunas formas de FUB, sobre todo en las formas quísticas, aparece Tg en algunas células aisladas y, también, en el lumen. La Tg es la forma de almacenamiento de las hormonas tiroideas producidas por las células foliculares, lo que supone que en algún momento de la evolución de los FUB, las células indiferenciadas, podrían sufrir una diferenciación hacia células capaces de sintetizar Tg, que es un marcador de diferenciación terminal de las células foliculares tiroideas. También en algunos casos, y gracias a esta técnica IHQ, se ha podido apreciar cómo de un FUB, normalmente inmaduro parece que emerge un folículo tiroideo con Tg en su luz. Este hallazgo podría tener una doble explicación, por un lado, si en los FUB hay células precursoras tiroideas, como hemos comprobado anteriormente, el FUB sería capaz de generar un folículo tiroideo, que podría separarse totalmente del FUB cuando esté completamente formado. No obstante, también habría que contemplar la posibilidad de que el FUB inmerso en el parénquima tiroideo, al crecer paulatinamente podría fundirse con algún folículo tiroideo próximo, dando lugar a los folículos de apariencia mixta descritos en tiroides humano y de otras especies animales.

A conclusiones similares llegamos mediante la aplicación de doble IF. Nuevamente, con la finalidad de comprobar si en las paredes de los FUB había células C, se realizó una **doble IF para p63 - CT, así como para CK 34βE12 - CT**. Estos ensayos no aportaron resultados diferentes a los obtenidos mediante IHQ, si bien las imágenes son especialmente ilustrativas.

Algo similar ocurrió cuando se utilizó la **doble IF para p63 - Tg, y para CK 34βE12 - Tg**, aunque en este caso los resultados eran más esclarecedores que en aquellos en los que se empleó CT, ya que permitieron comprobar, en cada caso, la presencia de Tg en el lumen del FUB. Normalmente, cuanto más maduro es el FUB, mayor es la cantidad de Tg en el contenido luminal, llegando a ocupar todo el lumen de los FUB quísticos maduros, lo que nos indica que a medida que evoluciona el FUB, las células de su pared van sufriendo diferenciación hacia células foliculares capaces de sintetizar moléculas precursoras de las hormonas tiroideas, lo que lleva a sugerir que los FUB maduros podrían llegar a ser folículos funcionales.

Estos hallazgos nos llevan a plantearnos si algunas de las células que componen los FUB son células con **fenotipo de “stem cells”**. Según su definición, las “stem cells” son células que presentan capacidad para la autorrenovación y potencial de diferenciación a uno o más tipos de células especializadas.

Varios autores, basándose en estudios IHQ, han informado de la existencia de una población de células madre en el tiroides humano adulto (Burstein et al. 2004; Burstein

et al. 2005; Gibelli et al. 2009). Las características IHQ que se describen para estas células son: inmunorreactividad con marcadores de proliferación celular, como OCT-4, bcl2 y Ki67 (Preto et al. 2004); expresión de proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular, como son las telomerasas o la proteína 3 nucleolar (Preto et al. 2004), y expresión de marcadores de células indiferenciadas, como son p63 y algunas CK de alto peso molecular (Di Como et al. 2002).

Las células madre del tiroides adulto pueden ser de dos tipos, por un lado están las células madre universales, que desde la médula ósea acuden al tiroides en respuesta a determinados estímulos y, por otro lado, están las células madre residentes o somáticas, con capacidad de autorrenovación y de diferenciación en más de un tipo celular (Dumont et al. 1992). Las células madre residentes también se conocen como *Side Population Cells* (SPC) y, además de expresar los marcadores de células madre descritos anteriormente, también expresan marcadores de derivados del endodermo como GATA-4 y HNF4 α , marcadores específicos tiroideos como TTF-1 y PAX8, y son capaces de expresar marcadores de células tiroideas diferenciadas como TPO y Tg (Lan et al. 2007). Hoshi et al, en 2007, también describieron en el tiroides de ratón, una población celular que exhibía características de células madre, y que expresaba ABCG2 y marcadores de *stem cells* como nucleostemina y OCT4. Esta población residía en el espacio interfolicular de la glándula tiroidea y expresaba niveles limitados de marcadores de diferenciación tiroidea, como son TPO, Tg y TTF-1. (Hoshi et al. 2007).

Esta población de SPC se ha relacionado con las células principales o “main cells” de los SCN (Cameselle-Teijeiro et al. 1995; Preto et al. 2004), debido a que las células basales y para basales de los SCN expresan p63. Según nuestros resultados, al haber demostrado la equivalencia entre los SCN y los FUB, también podríamos relacionar las SPC con los restos UB del tiroides de la rata. Además, como se ha descrito anteriormente, los remanentes UB también expresan CK 34 β E12, que según las últimas investigaciones se considera esencial para el crecimiento celular y la diferenciación de las células epiteliales.

Por lo tanto, en los FUB presentes en el tiroides de la rata, puede residir una población de células madre adultas. Este dato podría ser muy relevante, debido al alto potencial terapéutico de las células madre, ya que una vez que se demostrara que esta población de células fuese capaz de autorrenovarse y de diferenciarse hacia células foliculares y células C, podrían realizarse ensayos con trasplantes de éstas en animales experimentales con alguna patología tiroidea, para comprobar si, efectivamente, podrían participar de forma activa en la regeneración del tiroides.

La principal aportación, en este sentido, de este trabajo de investigación, es que **en los FUB hay siempre células indiferenciadas**, independientemente de su patrón morfológico, encargadas de renovar la pared de los mismos y a partir de las cuales

pueden generarse tanto células foliculares como células C. No obstante, para confirmar que se trata verdaderamente de una población de células madre, sería necesario comprobar si además de expresar p63 y CK 34 β E12, expresarían otros marcadores más específicos de células madre, como OCT-4 o las telomerasas.

Otro de los objetivos específicos de esta investigación ha sido analizar la posible **relación de los FUB con el desarrollo de ciertas patologías tiroideas**. Los SCN se han relacionado con distintas patologías tiroideas, no sólo por la dificultad para diferenciarlos de ellas (Harach 1988; Cameselle-Teijeiro et al. 1994), sino también porque, según algunos autores, los SCN podrían ser el origen de patologías como el carcinoma papilar de tiroides (CPT), el carcinoma medular de tiroides (CMT) o la tiroiditis de Hashimoto (Burstein et al. 2004).

Desde que Harach, en 1988, y Cameselle, en 1994, describieron la **dificultad para diferenciar mediante análisis microscópico los SCN de algunas patologías tiroideas**, se han buscado criterios diagnósticos diferenciales, tanto para la forma de presentación más común de los SCN, los nidos celulares sólidos, como para los casos en que los SCN muestran apariencia quística con coloide y material mucínico en su interior.

Para no confundir los SCN con la hiperplasia de células C y con el CMT, bastaría con realizar una inmunotinción para CT, CGRP o cromogranina, marcadores característicos de las células C. Para diferenciarlos de los remanentes del conducto tirogloso, se recurre a la inmunotinción con CK de alto peso molecular y CK epidérmica, ya que ambas CK sólo se expresan en los SCN. En cuanto al diagnóstico diferencial con casos de carcinoma y microcarcinoma papilares, en los que la apariencia microscópica con H-E es muy similar a los SCN, debido a que el núcleo de las “main cells” tiene características similares a los del carcinoma papilar, con hendiduras nucleares y aspecto esmerilado (Beckner et al. 1990), el criterio diferencial es la expresión generalizada de Tg en el carcinoma papilar (Baloch et al. 2008).

Además, en dichos casos, aparte de la valoración morfológica y del perfil IHQ característico de cada patología, se propone a p63 como marcador diferencial de los SCN, ya que no se expresa en las células foliculares ni en las células C, así como tampoco en el carcinoma papilar ni medular de tiroides. Sin embargo, no serviría para diferenciar los casos de metaplasia escamosa de tiroides que se muestran positivos para p63 (Reis-Filho et al. 2003; Bellecine et al. 2012).

El CMT es un tumor maligno que tiene su origen en las células C y que, en algunas ocasiones, puede aparecer acompañado de un tumor derivado de las células foliculares, a pesar de que se creía hasta ahora que ambas células tenían un origen embrionario distinto. Esta variedad de tumor se conoce como **carcinoma mixto medular-folicular de tiroides** y hay cierta controversia en cuanto a su origen. La

presentación del carcinoma mixto de tiroides puede ser de tres tipos: 1) concurrente y sincrónica, en la que se diferenciarían los dos tipos de tumores como entidades independientes; 2) tumor de colisión, en el que los carcinomas papilar y medular están fusionados entre sí; 3) carcinoma mixto verdadero, en el que las células de ambos tumores están entremezcladas (Ueki et al. 2011). El aumento de los niveles séricos de CT y Tg es un marcador utilizado para el diagnóstico de este tumor (Yokota et al. 2013; Tohidi et al. 2013).

En las publicaciones científicas, se contemplan dos hipótesis que explicarían su origen, una sería que en el tiroides se producirían cambios oncogénicos que afectarían tanto a las células foliculares como a las células C (Papotti et al. 1997; Zhang et al. 2006); la otra hipótesis sería que el carcinoma mixto de tiroides, sería una nueva entidad clínico patológica que se originaría a partir de células madre comunes presentes en el tiroides (Mizukami et al. 1996; Holm et al. 1987).

Volante et al, en 1999, argumentaron la primera hipótesis de acuerdo a su **“teoría del rehén”**. Según estos autores, la transformación neoplásica de las células C que conduce al desarrollo del CMT, cursa con atrapamiento de los folículos tiroideos normales entre las células cancerosas. El microambiente proporcionado por las células cancerígenas, sería capaz de estimular la proliferación de las células foliculares atrapadas entre ellos, confiriéndoles características de un carcinoma papilar asociado (Volante et al. 1999). Un aspecto importante que sustentaría esta hipótesis es la confirmación de existencia de una íntima relación entre las células foliculares y las células C, basada en la regulación paracrina de las células foliculares mediante la secreción de los péptidos reguladores sintetizados por las células C (Morillo-Bernal et al. 2009; Utrilla et al. 2013), así como el control de ambos tipos celulares por la TSH, por lo que cambios proliferativos en cualquiera de los dos tipos celulares podrían conducir a alteraciones de las células endocrinas adyacentes (Martín-Lacave et al. 2009).

En la línea del origen del carcinoma mixto a partir de una única población de células madre presentes en el tiroides, Burstein et al, en 2004, propusieron una hipótesis sobre la oncogénesis de algunos tumores y de la tiroiditis de Hashimoto. Afirmaron que las células p63 positivas de los SCN, podrían sufrir un proceso de diferenciación pudiendo generar células foliculares y células C, o bien, sufrir cambios oncogénicos que deriven en un carcinoma e, incluso, sufrir una infiltración linfocítica que conduzca a la tiroiditis de Hashimoto (Burstein et al. 2004).

Como se ha discutido anteriormente, en los SCN se identifican células indiferenciadas con la capacidad de proliferar hacia células foliculares y hacia células C. Se ha demostrado que en estos restos se pueden localizar células positivas para CT, al igual que para Tg en los folículos de apariencia mixta (Mizukami et al. 1994), por lo que las

células indiferenciadas presentes en los SCN podrían ser las células madre comunes a partir de las que se desarrollaran patologías como el carcinoma mixto tiroideo (Kato R et al. 1990). Son necesarias nuevas investigaciones para aclarar si, verdaderamente, las células madre adultas del tiroides pueden sufrir cambios oncogénicos que deriven en neoplasias tiroideas, o si como sucede en otros tipos de tumores, como leucemias, cáncer de mama, de pulmón, de páncreas o de próstata (Mitsutake et al. 2007; Thomas et al. 2008), hay una subpoblación de células madre cancerígenas, responsables de desencadenar tumores de diversos fenotipos y con distintos potenciales de proliferación, causar recidivas tumorales y aumentar las resistencias terapéuticas.

Esta teoría ha sido rebatida para otros tumores tiroideos, como es el caso del CPT, que supone el 80% de las neoplasias del tiroides, ya que parece más lógico que derive del componente mayoritario del tiroides, que son las células foliculares, y para el carcinoma mucoepidermoide que representa una variante metaplásica, escamosa o mucosecretora de dicha patología (Viciano et al. 1996).

En varias especies animales, los restos UB también pueden evolucionar hacia formas que se consideran patológicas. El caso más llamativo es el de los remanentes UB en el toro, que aparecen como restos sólidos y como estructuras foliculares que, en algunos casos, pueden sufrir cambios proliferativos y evolucionar hasta dar lugar a neoplasias denominadas “**tumores UB**”. Los tumores UB se caracterizan por presentar en su pared un elevado número de células indiferenciadas, al igual que algunas células positivas para CT y para Tg (Ljungberg & Nilsson 1985). Por eso se ha propuesto al toro, y en concreto a sus remanentes UB, como un modelo animal para el estudio de aquellas neoplasias tiroideas humanas difíciles de etiquetar (Capen & Black 1974).

Según nuestros resultados, los restos UB de la rata también presentan células que pueden sufrir diferenciación hacia células foliculares y hacia células C. De hecho, mediante IHQ e IF, hemos comprobado que, en algunos casos, se pueden localizar células C en la pared de los FUB, entre las células indiferenciadas positivas tanto para p63 como para CK 34βE12, y que en la luz de las formas maduras e inmaduras de los FUB, también se identifica Tg. Por lo que siguiendo la teoría de Burstein, las células indiferenciadas de los FUB podrían también sufrir alteraciones patológicas.

En el presente trabajo de investigación se ha descrito una forma de progresión inusual de los FUB, que sólo se observa en las ratas adultas y viejas, y **a la que hemos denominado cistoadenoma UB**. Normalmente, los cistoadenomas UB se encuentran en el interior del lóbulo tiroideo, y no comprimen el parénquima tiroideo adyacente. No obstante, en algunas ocasiones, se puede observar cómo los cistoadenomas UB se presentan como varias unidades quísticas asociadas, con discontinuidad en sus paredes, a partir de las cuales se produce una verdadera invasión intratiroidea. Dicha

evolución patológica de los FUB confirma, de nuevo, la capacidad proliferativa de estos restos embrionarios y su implicación tanto en la histogénesis del tiroides, como en el desarrollo de patologías tiroideas.

Otro aspecto a discutir es si los resultados de esta investigación aportan algún dato que ayude a clarificar la controversia que existe sobre el **origen embrionario de las células C**. Clásicamente, se ha afirmado que células procedentes de las CN invaden y se mezclan con las células endodérmicas del CUB, desde el cual migran hacia el tiroides y se funden con éste dando lugar a las células C. No obstante, estudios posteriores realizados sobre ratones transgénicos mutados para alguno de los factores de transcripción tiroideos, han lanzado nuevas teorías contrarias al origen neural de las células C.

En este sentido, las investigaciones realizadas por el grupo de Yoko Kameda, han aportado una nueva visión sobre el origen embrionario de las células C, al rebatir el **origen neural de estas células y defender su procedencia endodérmica**.

El origen de las células C a partir de las CN se ha aceptado tradicionalmente en base a dos supuestos:

1.- Origen común para todas las células de la serie APUD:

Pearse, en 1969, incluyó a las células C en la **serie APUD**, que englobaba a un grupo de células de origen neuroectodérmico cuya principal función era la secreción de péptidos endocrinos (Pearse 1966). Posteriormente, para referirse a las células neuroendocrinas que sintetizan péptidos reguladores comunes al sistema nervioso y endocrino, el término APUD fue reemplazado por el término **“sistema neuroendocrino difuso” (SNED)**, porque se vio que no todas las células de la serie APUD sintetizaban precursores aminos y, además, se comprobó que algunas células, como las células endocrinas pancreáticas o las digestivas, tenían un origen endodérmico y no en las CN, circunstancia que planteó la posibilidad de que pudiera ocurrir lo mismo con algunas otras de las células de la serie APUD (Andrew 1974; Andrew et al. 1998).

2.- Pruebas experimentales:

Las primeras investigaciones que aportaron resultados concluyentes sobre el origen de las células C en las CN, fueron las realizadas por Le Douarin and Le Lièvre en 1970 y, a pesar de que se desarrollaron sobre embriones de pollos, sus conclusiones se trasladaron sin mayor fundamento a todos los vertebrados, mamíferos y no mamíferos (Le Douarin et al. 1974).

Como se ha expuesto anteriormente, **existen diferencias relevantes entre el tiroides de los mamíferos y de los no mamíferos**. En los vertebrados no mamíferos el último par de bolsas faríngeas no se fusiona con el tiroides, sino que permanece como una

estructura independiente, que se denomina **glándula UB**. Pero esta diferencia anatómica no justificaría, por sí misma, el distinto origen embrionario de las células C entre los dos grupos de vertebrados.

Según la investigadora Y. Kameda, la diferencia en el origen de las células C, podría justificarse en base a las **propiedades nerviosas** que muestran estas células en las aves y en otros vertebrados no mamíferos. La glándula UB está inervada por fibras nerviosas que proceden de los nervios laríngeos y por ramas vagales directas. En 1995, Kameda et al, afirmaron que las células C en las aves, proceden de células del ganglio distal vagal, que colonizan la glándula UB en fases tempranas de su desarrollo embrionario. Además, mediante estudio IHQ, demostraron que, el esbozo UB es invadido por células nerviosas que expresan Tubulina (TuJ-1); HNK-1, que es un marcador de células nerviosas; encefalina y tiroxina hidroxilasa, enzima involucrada en la síntesis de catecolaminas que se expresa en células derivadas de las CN (Kameda, 1995). En 1988, este mismo grupo de investigadores realizó un estudio mediante IHQ para neurofilamentos, en el que observaron una gran abundancia de fibras nerviosas colinérgicas en contacto con los vasos sanguíneos y, también, identificaron mediante microscopía electrónica, numerosos axones en contacto con la superficie de las células C que, en cultivos, presentan prolongaciones similares a las neuronas (Kameda et al. 1988).

El hecho de que las características nerviosas de las células C en aves no se hayan demostrado en otros grupos de vertebrados, no excluye su origen neural, pero sí parece evidenciar que las células C en vertebrados mamíferos y no mamíferos no son totalmente equivalentes. Hay que tener en cuenta que, aunque en mamíferos, las células C *in situ* no muestran un fenotipo nervioso, en cultivos y en presencia de factores de crecimiento nerviosos (beta-NGF), pueden expresar CGRP, serotonina y emitir prolongaciones neuronales (Barasch, Mackey, et al. 1987; Barasch, Tamir, et al. 1987).

No obstante, entre los argumentos contrarios al origen neural de las células C de mamíferos que Y. Kameda alegó, obvió que **Pearse, en 1971**, realizó una investigación sobre embriones de ratones en la que, mediante IF, demostró que **las células C en mamíferos también se originaban a partir de células de las CN**. Convendría tener en cuenta que Pearse et al, identificaron células de las CN marcadas mediante IF en la parte anterior de la cuarta bolsa faríngea, pero no continuaron su seguimiento hasta el momento en el que el CUB se funde completamente sobre el tiroides (Pearse & Polak 1971). Actualmente, con las técnicas de marcaje y seguimiento de estirpes celulares concretas, y a la luz del conocimiento de nuevas moléculas y factores de transcripción, se cree que las células de las CN originarían el mesénquima de los arcos faríngeos e invadirían las hendiduras faríngeas, pero no llegarían a penetrar en el interior de las bolsas faríngeas de donde proceden los CUB (Jiang et al. 2000; Varga et al. 2008).

De este modo, para demostrar el origen endodérmico de las células C, Kameda et al, marcaron las células de las CN en embriones de ratones transgénicos y les realizaron un seguimiento con objeto de comprobar si se detectaban primero en el CUB, antes de su fusión con el tiroides y, posteriormente, diseminadas en la glándula en posición parafolicular, obteniendo resultados negativos en ambas localizaciones. Asimismo, analizaron el destino de los derivados neurales a largo plazo, sin encontrar células endocrinas procedentes de las CN en el tiroides (Kameda et al. 2007a; Kameda et al. 2007b; Kameda et al. 2013).

También se basaron en la expresión de algunos factores de transcripción y de proteínas específicas:

1.- En el CUB, antes de su fusión con el tiroides, se identifican células que expresan **Isl1**. Isl1 es un factor de transcripción implicado en el desarrollo de algunos derivados endodérmicos, como las células endocrinas pancreáticas. Isl1 se expresa tanto en el CUB como en el primordio tiroideo pero, una vez que ambas estructuras se fusionan, la expresión de Isl1 en las células foliculares disminuye y sólo se localizan células Isl1 + en el “área de células C” (Kameda, Nishimaki, Chisaka, et al. 2007).

No obstante, la expresión de Isl1 no es exclusiva de derivados del endodermo, pues Isl1 también se requiere para la diferenciación y supervivencia de las neuronas simpáticas y, además, parece jugar un papel fundamental en el desarrollo de los derivados neuroendocrinos, como son las células cromafines (Huber et al. 2013).

2.- Mediante la expresión de **cadherina-E**, demostraron el fenotipo epitelial de las células C. La cadherina-E es una proteína transmembrana cuya función es mantener la cohesión celular en los distintos epitelios. Con anticuerpos anti-cadherina-E se marcan las células del CUB, las células foliculares y las células C. Sin embargo, la cadherina-E no es exclusiva de los epitelios de origen endodérmico, sino que también la expresan las células epiteliales de origen ectodérmico.

Estos resultados, por lo tanto, aunque parecen demostrar que las células C no proceden de las CN, no aportan datos concluyentes que confirmen su origen endodérmico.

Otra cuestión a discutir es como se explicaría el **fenotipo neuroendocrino de las células C** sin que éstas procedan de las CN. Este asunto ha sido abordado por varios investigadores, quienes sostienen que existen vías de señalización que dotan a las células C de sus propiedades neuroendocrinas. De estas vías de señalización se indican como las más importantes las reguladas por los factores de transcripción Mash-1 e Isl1.

Mash-1, juega un importante papel en el desarrollo de derivados neuronales comprometidos o no con las CN, y es imprescindible para la supervivencia de las células C. Se expresa en el CUB antes de su migración y fusión con la vesícula tiroidea y

cuando el CUB se dispersa en el tiroides, se identifican células Mash-1 (+) en el “área de células C”, que dejan de identificarse en el momento en el que las células C comienzan a sintetizar CT (Lanigan et al. 1998; Kameda, et al. 2007).

Isl1 es un factor de transcripción que desempeña una función importante en el desarrollo de distintas poblaciones celulares de tipo nervioso, y no nervioso. No se requiere para la diferenciación inicial de las células simpático adrenérgicas, pero sí para su posterior desarrollo y funcionamiento (Huber et al. 2013). La expresión de Isl1, está relacionada con el desarrollo embrionario de la vesícula tiroidea y del CUB, siendo imprescindible tanto para que ambas estructura se fusionen, como para que las células C sean funcionales. Su expresión en las células foliculares desaparece cuando el tiroides ocupa su posición definitiva, mientras que se siguen identificando células Isl-1 (+) dispersas en la glándula hasta que las células C comienzan a sintetizar CT (Westerlund et al. 2008).

Por lo tanto, Mash-1 e Isl1 se postulan como los responsables de dotar a las células endocrinas de características nerviosas.

Otra teoría que se ha formulado es la del **origen ectodérmico de las células C**. Según esta teoría, el CUB es colonizado por material celular ectodérmico derivado del margen posterior del cuarto arco faríngeo, dando lugar a las células C. Los investigadores que defienden esta teoría se basan en la expresión de factores de transcripción, como Pax8, que se localizan en la superficie ectodérmica del cuarto arco faríngeo y, posteriormente, en el interior del CUB(Trueba et al. 2005), pero tampoco son resultados concluyentes.

Independientemente de si las células C se originan a partir de las CN, está demostrado, aunque parezca paradójico, que las CN son indispensables para el correcto desarrollo morfológico, estructural y funcional de la glándula tiroidea, debido a la relación entre el desarrollo temprano del tiroides y la participación de la vía Tbx1-Fgf8(Lania et al. 2009). **El ectomesénquima de los arcos faríngeos, que deriva de las CN**, expresa el factor de crecimiento de fibroblastos FGF-8. Se ha comprobado que son necesarias **interacciones recíprocas entre FGF-8**, regulado por el gen Tbx-1,**y los factores de crecimiento tiroideosTTF-1, Pax-8 y Hhex** (Fagman & Nilsson 2011). Además, las células derivadas de las CN constituyen el tejido conectivo intersticial del tiroides y del resto de órganos derivados de las bolsas faríngeas, de ahí las malformaciones que sufren los pacientes con síndrome de Di George, del que trataremos más adelante(Varga, Pospíšilová, Gmitterová, et al. 2008).

Si se demostrara que las células C proceden del endodermo, supondría que **tendrían un origen común con las células foliculares.**

Mediante IHQ, hemos demostrado que, en algunas formas de restos UB, se pueden identificar tanto células foliculares como células C. En las formas UB inmaduras se identificaron esporádicamente algunas células C y, con más frecuencia, pequeños folículos tiroideos asociados a la pared de los FUB. También se localizaron ambas poblaciones endocrinas en un FUB localizado en una posición inusual entre el tiroides y el cartílago traqueal, probablemente resultante de un defecto en la embriogénesis del CUB.

Este hallazgo, se debe, posiblemente, a distintos tipos de **alteraciones en el desarrollo del CUB**. En este sentido, Kusakabe et al, en 2006, demostraron por medio de **ratones** modificados genéticamente, la vía de señalización necesaria para el correcto desarrollo y fusión del CUB con el tiroides. En una de las mutaciones estudiadas, en concreto en ratones heterocigóticos para T/ebp/NKX2.1, no se produjo la incorporación del CUB al tiroides en desarrollo y, como resultado, se identificaron en el CUB unas estructuras quísticas en las que se podían diferenciar células precursoras de las células C, así como pequeños folículos tiroideos (Kusakabe et al. 2006).

En humanos, una de las alteraciones relacionadas con el desarrollo embrionario del CUB es el **síndrome de Di George (SDG)**. El SDG es una anomalía que cursa con cardiopatía congénita, alteración facial característica e hipocalcemia. El SDG se produce debido a **fallos en la migración de las CN** y sus síntomas se deben a malformaciones que afectan a los derivados de la tercera y cuarta bolsas faríngeas. Se sugirió que una consecuencia del SDG era la pérdida parcial o completa del CUB, situación que supondría la ausencia de células C en el tiroides de estos pacientes (Burke et al. 1987; Maggadottir & Sullivan 2013). Sin embargo, Pueblitz y cols. en 1993, demostraron que en el tiroides de pacientes con SDG había células C con más frecuencia de lo esperado, aunque en menor número que en los controles (Pueblitz et al.). A pesar de que esta observación confirma que se produce una alteración en el desarrollo de las células C en el SDG, también sugiere la posibilidad de que estas células endocrinas no procedan exclusivamente de las CN y que, por tanto, pueda existir una fuente adicional de células C en el tiroides.

Otra alteración en el desarrollo embrionario del tiroides que sugiere un origen común de las células foliculares y de las células C, es el **tiroides lingual ectópico**. El tiroides lingual se define como la localización de tejido tiroideo en un sitio anatómico anormal y se debe a una anomalía embrionaria, en la cual el descenso de la glándula tiroidea desde la base de la lengua hasta su posición anatómica habitual está alterado, lo que imposibilita su fusión con el CUB. Sin embargo, existen evidencias recientes de la **presencia de células C en casos de tiroides lingual** (Vandernoot et al. 2012), de la misma forma que cuando se analizaron los **remanentes del CUB** que permanecen asociados a las paratiroides superiores en los casos de tiroides lingual, **además de células C se hallaron estructuras foliculares que contenían Tg** (Williams et al. 1989).

Estos hallazgos inesperados suponen que, en determinadas circunstancias, podría existir una fuente común de células foliculares y de células C, y que el desarrollo de ambas poblaciones endocrinas en los vertebrados mamíferos, está interrelacionado y depende de factores tanto internos como externos al tiroides.

Si se acepta lo expuesto anteriormente, deberían existir **rasgos indicativos de un origen endodérmico común** entre ambos tipos celulares. Uno de estos rasgos podría ser la presencia de TTF-1 tanto en las células foliculares como en las células C (Suzuki et al. 1998; Ozaki et al. 2011). Así mismo y, como ha demostrado nuestro grupo de investigación, se ha detectado la presencia del receptor para la TSH en los dos tipos celulares (Morillo-Bernal et al. 2009), por lo que el control de la producción hormonal de ambas poblaciones la realizaría la TSH a través del eje HHT. Además, hemos comprobado que existe una regulación paracrina de las células C sobre las células foliculares, como un mecanismo adicional de control de la función tiroidea (Morillo-Bernal et al. 2009; Utrilla et al. 2013).

Aunque entre las células indiferenciadas de los FUB, generalmente, no se localizan células C, en los SCN, sin embargo, la población celular es más heterogénea y además de las células principales o “main cells”, aparecen células C, células ciliadas y estructuras microvesiculares que, según algunos autores, sugiere la existencia de células progenitoras de las células C (Martin et al. 2000).

En los restos UB de otros mamíferos también se identifican células ciliadas y en todos ellos se ha demostrado la presencia de células C entre las células indiferenciadas de los restos embrionarios del CUB (Wollman & Nève 1971b; Kameda et al. 1980; Juhl 1981b; Ljungberg & Nilsson 1985). En la rata, sin embargo, no se han identificado en los FUB células ciliadas ni otros tipos celulares, con excepción de las aportaciones de nuestro grupo que demostró la presencia esporádica de células C en FUB de ratas muy jóvenes (Conde et al, 1992), así como de inmunorreactividad para la Tg (Moreno et al. 1989).

Si en los **remanentes UB** se encuentran células madre adultas precursoras de las **células C**, tanto éstas como las “main cells” deberían de tener un **origen endodérmico común**, al haberse demostrado que tanto los SCN como los FUB proceden del CUB. Esto sería así, si consideramos a las células indiferenciadas de los restos UB células madres multipotentes, capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria. Tradicionalmente, las células madre adultas se han situado en esta etapa de evolución celular, sin embargo, investigaciones más recientes han evidenciado que las células madre adultas pueden diferenciarse en tejidos procedentes de cualquiera de las capas embrionarias (Weissman et al. 2001), y se les asigna capacidad de pluripotencialidad similar al de las células madre embrionarias. Este fenómeno ha sido calificado como **versatilidad de las células madre adultas**, teniendo en cuenta la flexibilidad que presentan algunas de ellas para

formar células especializadas de otros linajes(Jiang et al. 2002). El cambio del programa de diferenciación estaría relacionado con variaciones en las señales internas y externas, “microambiente o nicho ambiental”, que recibirían las células progenitoras, ya sean proteínas promotoras e inhibidoras del ciclo celular, factores secretados por las células vecinas o interacciones intercelulares y con la matriz extracelular(Blau et al. 2001; Alison et al. 2002).

Para intentar profundizar en esta materia, sería necesario, por lo tanto, comprobar si los restos UB expresan de forma conjunta, marcadores de células madre como OCT-4, Ki67 o bcl-2 y, marcadores endodérmicos como GATA4 y HNF4 α (Thomas et al. 2006).

Así pues, el estudio de los FUB presentes en el tiroides de la rata a lo largo de toda su vida postnatal, representa una importante vía de investigación para el diagnóstico de aquellas patologías tiroideas de etiología desconocida, que podrían originarse a partir de las células madre presentes en los restos UB. Igualmente, el hecho de que las células presentes en los remanentes UB, puedan diferenciarse hacia ambos tipos células endocrinas del tiroides, presenta especial relevancia, ya que abre la posibilidad de que estas células puedan participar de forma activa en la regeneración de la glándula tiroidea en alguna de sus alteraciones. Además, se podrían realizar nuevos estudios utilizando como modelo los FUB, que podrían contribuir a esclarecer la controversia que existe sobre el origen embrionario de las células C.

VI.-CONCLUSIONES

VI.-CONCLUSIONES

1.- En la glándula tiroidea, existen restos UB en ambos lóbulos tiroideos y en todas las ratas, independientemente de la edad y del género. Los restos UB se localizan, preferentemente, en el centro de cada lóbulo tiroideo, coincidiendo con el lugar de fusión de los CUB durante el desarrollo embrionario de la glándula.

2.-A medida que la rata crece, los remanentes UB modifican su tamaño y apariencia, presentando distintos patrones morfológicos que evolucionan desde nidos sólidos celulares, presentes en ratas muy jóvenes, a FUB inmaduros, en ratas de más de 30 días, y FUB quísticos maduros, en las ratas adultas y viejas, donde, además, se puede encontrar otra forma de remanente UB a la que, en base a su apariencia, hemos denominado cistoadenoma UB.

3.- En todos los casos, el área de los FUB es siempre mayor que la de los folículos tiroideos adyacentes, con una diferencia de tamaño estadísticamente significativa, excepto en las ratas macho, en las que aun siendo los FUB mayores que los folículos tiroideos, esta diferencia carece de significación estadística.

4.- Existe un dimorfismo sexual relacionado con los restos UB de la glándula tiroidea en ratas, atendiendo al mayor tamaño de los FUB, a la facilidad para su identificación y a la mayor incidencia de los cistoadenomas UB en las ratas hembra.

5.- La CK de alto peso molecular 34βE12 y la proteína p63, constituyen marcadores específicos de los remanentes UB del tiroides de la rata, ya que permiten distinguirlos perfectamente del parénquima tiroideo adyacente, independientemente de su morfología y de la edad del animal.

6.- Los FUB, en ratas, y los SCN en humanos, muestran el mismo patrón de inmunotinción para CK, CT, Tg, p63 y TTF-1, por lo que podemos afirmar que los restos embrionarios del CUB en ambas especies son equivalentes, lo cual justifica la utilización de la rata como modelo de experimentación animal para el estudio de los restos UB humanos.

7.-En la capa más periférica de los FUB se encuentra una población abundante de células indiferenciadas encargadas, probablemente, de renovar la pared de los mismos durante la vida postnatal de la rata, además de contribuir de forma esporádica a la formación de células foliculares y, también, de células C.

8.-Las células indiferenciadas presentes en la pared de los FUB, pueden sufrir, ocasionalmente, alteraciones proliferativas que darían lugar a una nueva entidad patológica en el tiroides de la rata, los cistoadenomas UB, que en los casos más agresivos muestran algunas semejanzas con los carcinomas UB de los toros o los carcinomas tiroideos mixtos humanos.

9.- Las células indiferenciadas de los FUB presentan ciertas características fenotípicas de “stem cells”, como su capacidad de autorrenovación, de diferenciación tanto hacia células foliculares como hacia células C, y por la expresión de algunos marcadores proliferativos, como la p63 y la CK 34 β E12. No obstante, para confirmarlo, sería necesario comprobar si, además, expresan otros marcadores más específicos de células madre, como OCT-4, ABCG2 o las telomerasas.

10.- A pesar de que, según los hallazgos de Yoko Kameda et al, en 2007, la teoría clásica del origen de las células C en las crestas neurales está cuestionada, tampoco existen datos concluyentes que confirmen el origen endodérmico de esta población endocrina. Nosotros creemos que los restos UB del tiroides de la rata podrían suponer una nueva vía de estudio para tratar de esclarecer de forma definitiva esta controversia mediante la utilización de marcadores de linaje específicos endodérmicos.

VII.-BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- 53/2013, R., **Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.**
- Ahrén, B., 1989. **Effects of calcitonin, katalcalcin, and calcitonin gene-related peptide on basal and TSH-stimulated thyroid hormone secretion in the mouse.** *Acta physiologica Scandinavica*, 135(2), pp.133–7.
- Ain, K.B. et al., 1997. **Somatostatin Receptor Subtype Expression in Human Thyroid and Thyroid Carcinoma Cell Lines.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(6), pp.1857–1862.
- Alison, M.R. et al., 2002. **An introduction to stem cells.** *The Journal of pathology*, 197(4), pp.419–23.
- Alt, B. et al., 2006. **Analysis of origin and growth of the thyroid gland in zebrafish.** *Developmental Dynamics*, 235(7), pp.1872–1883.
- Andrew, A., 1974. **Further evidence that enterochromaffin cells are not derived from the neural crest.** *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 31(3), pp.589–598.
- Andrew, A., Kramer, B. & Rawdon, B.B., 1998. **The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells - The last word?: Editorial.** *Journal of Pathology*, 186(2), pp.117–118.
- Antonica, F. et al., 2012. **Generation of functional thyroid from embryonic stem cells.** *Nature*, 491(7422), pp.66–71.
- Aracil Kessler, L., 2003. **Origen embrionario de las células parafoliculares de la glándula tiroidea.**
- Autelitano, F., Santeusanio, G. & Di Tondo, U., 1987. **Immunohistochemical study of solid cell nests of the thyroid gland found from an autopsy study.** *Cancer*, 59(3), pp.477–483.
- Baloch, Z.W. et al., 2008. **Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference.** *Diagnostic cytopathology*, 36(6), pp.425–37.
- Barasch, J.M., Mackey, H., et al., 1987. **Induction of a neural phenotype in a serotonergic endocrine cell derived from the neural crest.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 7(9), pp.2874–83.

- Barasch, J.M., Tamir, H., et al., 1987. **Serotonin-storing secretory granules from thyroid parafollicular cells.** *Journal of Neuroscience*, 7(12), pp.4017–4033.
- Barbera, J.P.M. et al., 2000. **The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation.** *Development*, 127(11), pp.2433–2445.
- Barbier, A., Radu, M. & Repciuc, E., 1976. **The size distribution of thyroid follicles in single thyroid glands, a peculiar problem of particle size distribution in stereology.** *Revue Roumaine de Morphologie, d'Embryologie et de Physiologie - Serie Morphologie et d'Embryologie*, 22(1), pp.3–8.
- Baum, A. et al., 1995. **Lewis rats of the inbred strain LEW/Han: life expectancy, spectrum and incidence of spontaneous neoplasms.** *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*, 47(1), pp.11–8.
- Beckner, M.E., Shultz, J.J. & Richardson, T., 1990. **Solid and cystic ultimobranchial body remnants in the thyroid.** *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 114(10), pp.1049–1052.
- Bellevicine, C. et al., 2012. **Ultimobranchial body remnants (solid cell nests) as a pitfall in thyroid pathology.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(7), pp.2209–2210.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R. & Weimann, J.M., 2001. **The evolving concept of a stem cell: entity or function?** *Cell*, 105(7), pp.829–41.
- Burke, B.A. et al., 1987. **Thyrocalcitonin-containing cells in the Di George anomaly.** *Human pathology*, 18(4), pp.355–60.
- Burstein, D.E. et al., 2004. **Immunohistochemical Detection of p53 Homolog p63 in Solid Cell Nests, Papillary Thyroid Carcinoma, and Hashimoto's Thyroiditis: A Stem Cell Hypothesis of Papillary Carcinoma Oncogenesis.** *Human Pathology*, 35(4), pp.465–473.
- Burstein, D.E. et al., 2005. **Thinking “out of the nest”—a reply to “A stem-cell role for thyroid solid cell nests [letter].”** *Human pathology*, 36(5), pp.591–592.
- Calvert, R. & Isler, H., 1970. **Fine structure of a third epithelial component of the thyroid gland of the rat.** *Anatomical Record*, 168(1), pp.23–41.
- Cameselle-Teijeiro, J., Preto, A., et al., 2005. **A stem cell role for thyroid solid cell nests [1] (multiple letters).** *Human Pathology*, 36(5), pp.590–592.
- Cameselle-Teijeiro, J., Abdulkader, I., et al., 2005. **Cystic tumor of the atrioventricular node of the heart appears to be the heart equivalent of the solid cell nests**

- (ultimobranchial rests) of the thyroid. *American Journal of Clinical Pathology*, 123(3), pp.369–375.
- Cameselle-Teijeiro, J. et al., 1994. **Solid cell nests of the thyroid: Light microscopy and immunohistochemical profile.** *Human Pathology*, 25(7), pp.684–693.
- Cameselle-Teijeiro, J., Febles-Pérez, C. & Sobrinho-Simões, M., 1995. **Papillary and mucoepidermoid carcinoma of the thyroid with anaplastic transformation: A case report with histologic and immunohistochemical findings that support a provocative histogenetic hypothesis.** *Pathology - Research and Practice*, 191(12), pp.1214–1221.
- Capen, C.C. & Black, H.E., 1974. **Animal model of human disease. Medullary thyroid carcinoma, multiple endocrine neoplasia, Sipple's syndrome.** *American Journal of Pathology*, 74(2), pp.377–380.
- Carlson, B., 2009. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*, Barcelona, España: Elsevier.
- Carre, A. et al., 2011. **Hes1 is required for appropriate morphogenesis and differentiation during mouse thyroid gland development.** *PLoS ONE*, 6(2).
- Di Como, C.J. et al., 2002. **p63 expression profiles in human normal and tumor tissues.** *Clinical Cancer Research*, 8(2), pp.494–501.
- Conde, E. et al., 1992. **Immunocytochemical study of the ultimobranchial tubule in Wistar rats.** *Anatomia, histologia, embryologia*, 21(1), pp.94–100.
- Conde, E. et al., 1995. **Postnatal variations in the number and size of C-cells in the rat thyroid gland.** *Cell and Tissue Research*, 280(3), pp.659–663.
- Degli Uberti, E.C. et al., 1991. **Somatostatin reduces 3H-thymidine incorporation and c-myc, but not thyroglobulin ribonucleic acid levels in human thyroid follicular cells in Vitro.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 72(6), pp.1364–1371.
- Diéguez, C.Y.R., 2007. *Actualizaciones en endocrinología. Tiroides*,
- Dionigi, G. et al., 2007. **Medullary thyroid carcinoma: surgical treatment advances.** *Expert review of anticancer therapy*, 7(6), pp.877–85.
- Le Douarin, N., Fontaine, J. & Le Lievre, C., 1974. **New studies on the neural crest origin of the avian ultimobranchial glandular cells - interspecific combinations and cytochemical characterization of C cells based on the uptake of biogenic amine precursors.** *Histochemistry*, 38(4), pp.297–305.

- Dumont, J.E. et al., 1992. **Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors.** *Physiological reviews*, 72(3), pp.667–97.
- Van Dyke JH., 1944. **Behavior of Ultimobranchial Tissue in the postnatal Thyroid Gland: The origin of Thyroid Cistoadenomata in the rat.** *Anat Rec*, 88(17).
- Elvira Estrada Flores, M. del C.U.A., 2002. *Atlas de histología de vertebrados*, UNAM.
- Fagman, H., Andersson, L. & Nilsson, M., 2006. **The developing mouse thyroid: Embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation.** *Developmental Dynamics*, 235(2), pp.444–455.
- Fagman, H. & Nilsson, M., 2010. **Morphogenesis of the thyroid gland.** *Special Issue: Development Production of Endocrine Organs*, 323(1), pp.35–54.
- Fagman, H. & Nilsson, M., 2011. **Morphogenetics of early thyroid development.** *Journal of Molecular Endocrinology*, 46(1), pp.R33–R42.
- Fekete, C. et al., 2000. **Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis.** *Journal of Neuroscience*, 20(24), pp.9224–9234.
- De Felice, M. et al., 1998. **A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate.** *Nature Genetics*, 19(4), pp.395–398.
- Fernandez-Santos JM et al., 2012. **Paracrine Regulation of Thyroid-Hormone Synthesis by C Cells.** In *Intech*. pp. 51–84.
- Fierabracci, A. et al., 2008. **Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid.** *The Journal of endocrinology*, 198(3), pp.471–87.
- Fierabracci, A., Castagna, M. & Baschieri, L., 1993. **Calcitonin and somatostatin containing C cells in rat and human thyroid. Immunohistochemical study by a double-staining method.** *Pathologica*, 85(1099), pp.467–474.
- Fontaine, J., 1979. **Multistep migration of calcitonin cell precursors during ontogeny of the mouse pharynx.** *General and Comparative Endocrinology*, 37(1), pp.81–92.
- Fraser, B.A. & Duckworth, J.W.A., 1979. **Position of ultimobranchial body cysts in the human fetal thyroid gland.** *Acta Anatomica*, 105(3), pp.269–272.

- Friedrichsen, S. et al., 2004. **Expression of Pituitary Hormones in the Pax8^{-/-} Mouse Model of Congenital Hypothyroidism.** *Endocrinology*, 145(3), pp.1276–1283.
- Garcia, G. et al., 1985. **Contribution to the study of the ectodermic origin of the human parathyroid glands.** *Archives de biologie*, 96(1), pp.45–56.
- García-Marín, R. et al., 2012. **Melatonin-synthesizing enzymes and melatonin receptor in rat thyroid cells.** *Histology and Histopathology*, 27(11), pp.1429–1438.
- Gartner, L.P., 2002. **Cell Biology and Histology de Leslie P. Gartner: 9780781733106 - Castle Rock.** *Lippincott Williams and Wilkins*. Available at: <http://www.iberlibro.com/Cell-Biology-Histology-Leslie-P-Gartner/13290091451/bd> [Accessed September 22, 2015].
- Gibelli, B. et al., 2009. **Thyroid stem cells - danger or resource?** *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 29(6), pp.290–295.
- Gkonos, P.J. et al., 1989. **Thyrotropin-releasing hormone gene expression in normal thyroid parafollicular cells.** *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 3(12), pp.2101–9.
- Godwin MC, 1937. **Complex IV in the dog with special emphasis on the relation of the ultimobranchial body to inter-follicular cells in the post-natal thyroid gland.** *American Journal of Anatomy*, (60), pp.299–339.
- Goodman, D.G. et al., 1979. **Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats.** *Toxicology and applied pharmacology*, 48(2), pp.237–48.
- Goodman, D.G. et al., 1980. **Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging Osborne-Mendel rats.** *Toxicology and applied pharmacology*, 55(3), pp.433–47.
- Günes, C. & Rudolph, K.L., 2013. **The role of telomeres in stem cells and cancer.** *Cell*, 152(3), pp.390–3.
- Harach, H.R., 1987. **Mixed follicles of the human thyroid gland.** *Acta anatomica*, 129(1), pp.27–30.
- Harach, H.R., 1988. **Solid cell nests of the thyroid.** *Journal of Pathology*, 155(3), pp.191–200.
- Harach, H.R. & Wasenius, V.-M., 1987. **Expression of “visceral” cytokeratin and ultrastructural findings in solid cell nests of the thyroid.** *Acta Anatomica*, 129(4), pp.289–292.
- Harmon, B.G. & Kelley, L.C., 2001a. **Immunohistochemistry of ultimobranchial thyroid carcinomas in seven slaughtered cows and one bull.** *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(2), pp.101–105.

- Harmon, B.G. & Kelley, L.C., 2001b. **Immunohistochemistry of ultimobranchial thyroid carcinomas in seven slaughtered cows and one bull.** *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 13(2), pp.101–5.
- Hartoft-Nielsen, M.-L. et al., 2005. **Estimation of number of follicles, volume of colloid and inner follicular surface area in the thyroid gland of rats.** *Journal of Anatomy*, 207(2), pp.117–124.
- Hick, A.-C. et al., 2013. **Reciprocal epithelial: Endothelial paracrine interactions during thyroid development govern follicular organization and C-cells differentiation.** *Developmental Biology*, 381(1), pp.227–240.
- Holm, R. et al., 1987. **Medullary thyroid carcinoma with thyroglobulin immunoreactivity. A special entity?** *Laboratory Investigation*, 57(3), pp.258–268.
- Hoshi, N. et al., 2007. **Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics.** *Endocrinology*, 148(9), pp.4251–4258.
- Huber, K. et al., 2013. **The LIM-Homeodomain transcription factor Islet-1 is required for the development of sympathetic neurons and adrenal chromaffin cells.** *Developmental biology*, 380(2), pp.286–98.
- I, M.-L. et al., 1999. **Correlation between gender and spontaneous C-cell tumors in the thyroid gland of the Wistar rat.** *Cell Tissue Res*, 297(3), pp.451–457.
- International society for stem cell research (ISSCR), **International society for stem cell research. Stem Cell Glossary.** Available at: <http://www.isscr.org/visitor-types/public/stem-cell-glossary> [Accessed May 9, 2015].
- Inzerillo, A.M., Zaidi, M. & Huang, C.L.H., 2002. **Calcitonin: the other thyroid hormone.** *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 12(9), pp.791–8.
- Ishimura, K. & Fujita, H., 1979. **Development of cell-to-cell relationships in the thyroid gland of the chick embryo.** *Cell and Tissue Research*, 198(1), pp.15–25.
- Ito, M., Kameda, Y. & Tagawa, T., 1986. **An ultrastructural study of the cysts in chicken ultimobranchial glands, with special reference to C-cells.** *Cell and Tissue Research*, 246(1), pp.39–44.
- Janzer, R.C., Weber, E. & Chr., H., 1979. **The relation between solid cell nests and C cells of the thyroid gland. An immunohistochemical and morphometric investigation.** *Cell and Tissue Research*, 197(2), pp.295–312.
- Jiang, X. et al., 2000. **Fate of the mammalian cardiac neural crest.** *Development (Cambridge, England)*, 127(8), pp.1607–16.

- Jiang, Y. et al., 2002. **Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain.** *Experimental hematology*, 30(8), pp.896–904.
- Juhl, M., 1981a. **Fine structure of the second kind of thyroid follicles in mature guinea pigs.** *Acta anatomica*, 111(4), pp.328–42.
- Juhl, M., 1981b. **Morphology of the second kind of follicle in the guinea pig thyroid gland.** *Acta anatomica*, 110(4), pp.318–26.
- Kameda, Y., 1995. **Evidence to support the distal vagal ganglion as the origin of C cells of the ultimobranchial gland in the chick.** *Journal of Comparative Neurology*, 359(1), pp.1–14.
- Kameda, Y., Nishimaki, T., Chisaka, O., et al., 2007. **Expression of the epithelial marker E-cadherin by thyroid C cells and their precursors during murine development.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 55(10), pp.1075–1088.
- Kameda, Y. et al., 2009. **FRS2a is required for the separation, migration, and survival of pharyngeal-endoderm derived organs including thyroid, ultimobranchial body, parathyroid, and thymus.** *Developmental Dynamics*, 238(3), pp.503–513.
- Kameda, Y. et al., 2013. **Hes1 is required for the development of pharyngeal organs and survival of neural crest-derived mesenchymal cells in pharyngeal arches.** *Cell and Tissue Research*, 353(1), pp.9–25.
- Kameda, Y., 1987. **Immunohistochemical demonstration of keratins in the cysts of thyroid glands, parathyroid glands, and C-cell complexes of the dog.** *American Journal of Anatomy*, 180(1), pp.87–99.
- Kameda, Y., 1984. **Immunohistochemical study of cyst structures in chick ultimobranchial glands.** *Archivum Histologicum Japonicum*, 47(4), pp.411–419.
- Kameda, Y. et al., 1988. **Innervation of the C cells of chicken ultimobranchial glands studied by immunohistochemistry, fluorescence microscopy, and electron microscopy.** *The American journal of anatomy*, 182(4), pp.353–68.
- Kameda, Y., Nishimaki, T., Miura, M., et al., 2007. **Mash1 regulates the development of C cells in mouse thyroid glands.** *Developmental Dynamics*, 236(1), pp.262–270.
- Kameda, Y., 1984. **Ontogeny of chicken ultimobranchial glands studied by an immunoperoxidase method using calcitonin, somatostatin and 19S-thyroglobulin antisera.** *Anatomy and Embryology*, 170(2), pp.139–144.
- Kameda, Y., 1971. **The occurrence and distribution of the parafollicular cells in the thyroid, parathyroid IV and thymus IV in some mammals.** *Archivum Histologicum Japonicum*, 33(4), pp.283–299.

- Kameda, Y., 1971. **The occurrence of a special parafollicular cell complex in and beside the dog thyroid gland.** *Archivum Histologicum Japonicum*, 33(2), pp.115–132.
- Kameda, Y., Shigemoto, H. & Ikeda, A., 1980. **Development and cytodifferentiation of C cell complexes in dog fetal thyroids. An immunohistochemical study using anti-calcitonin, anti-C-thyroglobulin and anti-19S thyroglobulin antisera.** *Cell and Tissue Research*, 206(3), pp.403–415.
- Kaspereit-Rittinghausen, J. et al., 1990. **Incidence and morphology of spontaneous thyroid tumours in different strains of rats.** *Journal of comparative pathology*, 102(4), pp.421–32.
- Kato R et al., 1990. **Mucoepidermoid carcinoma of the thyroid gland.** *Cancer*, pp.65(9):2020–7.
- Kawaoi, A. & Tsuneda, M., 1985. **Functional development and maturation of the rat thyroid gland in the foetal and newborn periods: an immunohistochemical study.** *Acta Endocrinologica*, 108(4), pp.518–524.
- Kim, S., Wong, P. & Coulombe, P.A., 2006. **A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth.** *Nature*, 441(7091), pp.362–365.
- Kørbling, M. & Estrov, Z., 2003. **Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?** *The New England journal of medicine*, 349(6), pp.570–82.
- Kusakabe, T., Hoshi, N. & Kimura, S., 2006. **Origin of the ultimobranchial body cysts: T/ebp/Nkx2.1 expression is required for development and fusion of the ultimobranchial body to the thyroid.** *Developmental Dynamics*, 235(5), pp.1300–1309.
- Lan, L. et al., 2007. **Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(9), pp.3681–8.
- Lania, G. et al., 2009. **Early thyroid development requires a Tbx1-Fgf8 pathway.** *Developmental biology*, 328(1), pp.109–17.
- Lanigan, T.M., DeRaad, S.K. & Russo, A.F., 1998. **Requirement of the MASH-1 transcription factor for neuroendocrine differentiation of thyroid C cells.** *Journal of Neurobiology*, 34(2), pp.126–134.
- Larsen PR, W.R.H., 2004. *Williams tratado de endocrinología.*, Barcelona: Elsevier.
- Leblanc, B. et al., 1990. **Immunocytochemistry of thyroid C-cell complexes in dogs.** *Veterinary Pathology*, 27(6), pp.445–452.

- Le Lievre, C.S. & Le Douarin, N.M., 1975. **Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos.** *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 34(1), pp.125–154.
- Lin, R.-Y. et al., 2003. **Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells in vitro.** *Endocrinology*, 144(6), pp.2644–9.
- Ljungberg, O. & Nilsson, P.O., 1985. **Hyperplastic and neoplastic changes in ultimobranchial remnants and in parafollicular (C) cells in bulls: a histologic and immunohistochemical study.** *Veterinary Pathology*, 22(2), pp.95–103.
- Maasumeh Tohidi, Gholamreza Pourbehi, Mohammad Bahmanyar, Seyed Sajjad Eghbali, Mohammadreza Kalantar Hormozi, and I.N., 2013. **“Mixed Medullary-Follicular Carcinoma of the Thyroid.”** *Case Reports in Endocrinology*, 2013, pp.1–3.
- Maggadottir, S.M. & Sullivan, K.E., 2013. **The diverse clinical features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome).** *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, 1(6), pp.589–94.
- Marinò, M. & McCluskey, R.T., 2000a. **Megalyn-mediated transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells is a calmodulin-dependent process.** *Thyroid*, 10(6), pp.461–469.
- Marinò, M. & McCluskey, R.T., 2000b. **Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release.** *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 279(5 48-5), pp.C1295–C1306.
- Martin Lacave. I; Garcia Caballero I., 2012. *ATLAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA. Ines Martin Lacave / Tomas Garcia Caballero.,*
- Martin, V. et al., 2000. **Ultrastructural features of “solid cell nest” of the human thyroid gland: a study of 8 cases.** *Ultrastructural pathology*, 24(1), pp.1–8.
- Martin-Lacave, I., Conde, E., Moreno, A., et al., 1992. **Evidence of the occurrence of calcitonin cells in the ultimobranchial follicle of the rat postnatal thyroid.** *Acta anatomica*, 144(2), pp.93–6.
- Martin-Lacave, I., Conde, E., Montero, C., et al., 1992. **Quantitative changes in the frequency and distribution of the C-cell population in the rat thyroid gland with age.** *Cell and Tissue Research*, 270(1), pp.73–77.
- Martín-Lacave, I., 2014. *ATLAS DE HISTOLOGIA HUMANA - INES MARTIN-LACAVE. Díaz de Santos, p.350.*
- Martín-Lacave, I. et al., 2009. **C cells evolve at the same rhythm as follicular cells when thyroidal status changes in rats.** *Journal of Anatomy*, 214(3), pp.301–309.

- Martín-Lacave, I. et al., 1992. **Evidence of the occurrence of calcitonin cells in the ultimobranchial follicle of the rat postnatal thyroid.** *Acta Anat (Basel)*, 144(2), pp.93–96.
- Merida-Velasco, J.A. et al., 1988. **Morphogenesis of the ultimobranchial body and its colonizing cells in the chick embryo.** *Archives d'anatomie, d'histologie, et d'embryologie normales et experimentales*, 71, pp.43–55.
- Merida-Velasco, J.A. et al., 1989. **Origin of the ultimobranchial body and its colonizing cells in human embryos.** *Acta Anatomica*, 136(4), pp.325–330.
- De Miguel, M. et al., 2005. **Thyrotropin-releasing hormone receptor expression in thyroid follicular cells: A new paracrine role of C-cells?** *Histology and Histopathology*, 20(3), pp.713–718.
- Mitsutake, N. et al., 2007. **Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively.** *Endocrinology*, 148(4), pp.1797–803.
- Mizukami, Y. et al., 1996. **Mixed medullary-follicular carcinoma of the thyroid gland: a clinicopathologic variant of medullary thyroid carcinoma.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 9(6), pp.631–5.
- Mizukami, Y. et al., 1994. **Solid cell nests of the thyroid: A histologic and immunohistochemical study.** *American Journal of Clinical Pathology*, 101(2), pp.186–191.
- Monsour, P.A., Kruger, B.J. & Barnes, A., 1985. **Calcitonin cell population and distribution in the thyroid gland of the rat.** *Journal of Morphology*, 186(3), pp.271–278.
- Moreno, A.M. et al., 1989. **Demonstration of sugar residues in the ultimobranchial tubule and thyroid C-cells of the rat using peroxidase labelled lectins.** *Anatomia, histologia, embryologia*, 18(2), pp.114–21.
- Morillo-Bernal, J. et al., 2009. **Functional expression of the thyrotropin receptor in C cells: New insights into their involvement in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis.** *Journal of Anatomy*, 215(2), pp.150–158.
- Morillo-Bernal, J. et al., 2011. **Ghrelin potentiates TSH-induced expression of the thyroid tissue-specific genes thyroglobulin, thyroperoxidase and sodium-iodine symporter, in rat PC-Cl3 Cells.** *Peptides*, 32(11), pp.2333–9.
- Murakami, G. & Uchiyama, Y., 1986. **Bimodal variations in subcellular structures of rat thyroid follicular cells during 24 hours: Fine structural and morphometric studies.** *American Journal of Anatomy*, 175(1), pp.1–13.

- National Institute of health (NIH), **National institute of health (NIH) Glossary [Stem Cell Information]**. Available at: <http://stemcells.nih.gov/info/pages/glossary.aspx> [Accessed May 9, 2015].
- Nekulova, M. et al., 2011. **The role of p63 in cancer, stem cells and cancer stem cells.** *Cellular & molecular biology letters*, 16(2), pp.296–327.
- Nève, P. & Wollman, S.H., 1971. **Fine structure of ultimobranchial follicles in the thyroid gland of the rat.** *Anatomical Record*, 171(2), pp.259–272.
- Ozaki, T. et al., 2011. **Development of thyroid gland and ultimobranchial body cyst is independent of p63.** *Laboratory Investigation*, 91(1), pp.138–146.
- Painter, J.T., Clayton, N.P. & Herbert, R.A., 2010. **Useful immunohistochemical markers of tumor differentiation.** *Toxicologic Pathology*, 38(1), pp.131–141.
- Papotti, M. et al., 1997. **Mixed medullary-follicular carcinoma of the thyroid.** *Virchows Archiv*, 430(5), pp.397–405.
- Park, Y.J. et al., 2008. **Ghrelin enhances the proliferating effect of thyroid stimulating hormone in FRTL-5 thyroid cells.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 285(1-2), pp.19–25.
- Pearse, A.G., 1966. **Common cytochemical properties of cells producing polypeptide hormones, with particular reference to calcitonin and the thyroid C cells.** *Veterinary Record*, 79(21), pp.587–590.
- Pearse, A.G.E., 1977. **The diffuse neuroendocrine system and the apud concept: related “endocrine” peptides in brain, intestine, pituitary, placenta and anuran cutaneous glands.** *Medical Biology*, 55(3), pp.115–125.
- Pearse, A.G.E. & Polak, J.M., 1971. **Cytochemical evidence for the neural crest origin of mammalian ultimobranchial C cells.** *Histochemie*, 27(2), pp.96–102.
- Pfeffer, M. et al., 1999. **Inducible cyclic AMP early repressor protein in rat pinealocytes: A highly sensitive natural reporter for regulated gene transcription.** *Molecular Pharmacology*, 56(2), pp.279–289.
- Pondel, M., 2001. **Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond.** *International Journal of Experimental Pathology*, 81(6), pp.405–422.
- Preto, A. et al., 2004. **Telomerase expression and proliferative activity suggest a stem cell role for thyroid solid cell nests.** *Modern Pathology*, 17(7), pp.819–826.
- Prósper, F. & Verfaillie, C.M., 2003. **Adult stem cells.** *Anales del sistema sanitario de Navarra*, 26(3), pp.345–56.

- Pueblitz, S., Weinberg, A.G. & Albores-Saavedra, J., **Thyroid C cells in the DiGeorge anomaly: a quantitative study.** *Pediatric pathology / affiliated with the International Paediatric Pathology Association*, 13(4), pp.463–73.
- Raghu, K. et al., 2006. **Ghrelin localization in rat and human thyroid and parathyroid glands and tumours.** *Histochemistry and Cell Biology*, 125(3), pp.239–246.
- Rao-Rupanagudi, C, S.G. & R, H., 1992. **Age-related changes in thyroid structure and function in Sprague-Dawley rats.** *Veterinary Pathology*, 29(4), pp.278–287.
- Rausell, V. et al., 1999. **Identification of the TRH-like peptides pGlu-Glu-Pro amide and pGlu-Phe-Pro amide in rat thyroid: regulation by thyroid status.** *Regulatory peptides*, 81(1-3), pp.55–60.
- Reis-Filho, J.S. et al., 2003. **p63 expression in solid cell nests of the thyroid: Further evidence for a stem cell origin.** *Modern Pathology*, 16(1), pp.43–48.
- Richard L. Drake, Adam M.W. Mitchell, A.W.V., 2015. *Gray. Anatomía Para Estudiantes - 3ª Edición 3ª Edición.* Elsevier, ed.,
- Riedel, C., Levy, O. & Carrasco, N., 2001. **Post-transcriptional Regulation of the Sodium/Iodide Symporter by Thyrotropin.** *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), pp.21458–21463.
- Ríos Moreno, M.J. et al., 2011. **Inmunohistochemical profile of solid cell nest of thyroid gland.** *Endocrine pathology*, 22(1), pp.35–39.
- Ríos Moreno, M.J. et al., 2011. **Inmunohistochemical profile of solid cell nest of thyroid gland.** *Endocrine Pathology*, 22(1), pp.35–39.
- Rosenthal, N., 2003. **Prometheus's vulture and the stem-cell promise.** *The New England journal of medicine*, 349(3), pp.267–74.
- Ross, P., 2012. *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*, Editorial Médica Panamericana.
- Ross-Pawlina, 2013. **Ross Histologia (2013) 6 Ed.** Ed. Panamericana, p.900.
- Sadler, T.W. & Langman, J., 2007. *Langman embriología médica: con orientación clínica*, Ed. Médica Panamericana.
- Santisteban, P., Kohn, L.D. & Di Lauro, R., 1987. **Thyroglobulin gene expression is regulated by insulin and insulin-like growth factor I, as well as thyrotropin, in FRTL-5 thyroid cells.** *Journal of Biological Chemistry*, 262(9), pp.4048–4052.
- Sato, A. et al., 1995. **Effect of thyrotropin-releasing hormone on serum thyroid hormones: A study in the patients with untreated and treated Graves' disease**

- and subacute thyroiditis.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80(7), pp.2173–2177.
- Sawicki B, 1997. **Solid cell nests (SCN) in the thyroid gland of some laboratory and wild mammals; histochemical and preliminary immunocytochemical studies.** *Folia Hystochem Cytobiol*, (35), pp.107–108.
- Sawicki B, 1991. **Ultimobranchial follicles and cysts of the european bison thyroid.** *Acta Therio*, (36), pp.349–356.
- Sawicki, B. & Zabel, M., 1997. **Immunocytochemical study of parafollicular cells of the thyroid and ultimobranchial remnants of the European bison.** *Acta Histochemica*, 99(2), pp.223–230.
- Sehe, C.T., 1965. **Comparative studies on the ultimobranchial body in reptiles and birds.** *General and Comparative Endocrinology*, 5(1), pp.45–59.
- Serls, A.E. et al., 2005. **Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung.** *Development*, 132(1), pp.35–47.
- Srivastav, A.K. & Swarup, K., 1982. **Thyroid calcitonin cells and unusual follicles in the fox.** *Acta Anatomica*, 112(4), pp.338–345.
- Steinert, P.M. & Roop, D.R., 1988. **Molecular and cellular biology of intermediate filaments.** *Annual review of biochemistry*, 57, pp.593–625.
- Suzuki, K. et al., 1998. **Identification of thyroid transcription factor-1 in C cells and parathyroid cells.** *Endocrinology*, 139(6), pp.3014–7.
- Takaoka, M. et al., 1995. **Age-related changes in thyroid lesions and function in F344/DuCrj rats.** *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 44(1), pp.57–62.
- Tan, D.-X. et al., 2000. **Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: A potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation.** *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), pp.1177–1185.
- Tateyama, S. et al., 1988. **The ultimobranchial remnant and its hyperplasia or adenoma in equine thyroid gland.** *Nippon juigaku zasshi. The Japanese journal of veterinary science*, 50(3), pp.714–722.
- Thomas, D., Friedman, S. & Lin, R.-Y., 2008. **Thyroid stem cells: lessons from normal development and thyroid cancer.** *Endocrine-related cancer*, 15(1), pp.51–8.
- Thomas, T. et al., 2006. **Expression of endoderm stem cell markers: Evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands.** *Thyroid*, 16(6), pp.537–544.

- Thomson, J.A. et al., 1998. **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), pp.1145–7.
- Trueba, S. et al., 2005. **PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(1), pp.455–62.
- Turk, J.R. et al., 1983. **Ultimobranchial adenoma of the thyroid gland in a horse.** *Veterinary Pathology*, 20(1), pp.114–117.
- Ueki, I. et al., 2011. **A case of mixed medullary and follicular cell carcinoma of the thyroid.** *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 50(12), pp.1313–6.
- Utrilla, J.C. et al., 2013. **Expression of hypothalamic regulatory peptides in thyroid C cells of different mammals.** *General and comparative endocrinology*, 187, pp.6–14.
- Vandernoot, I. et al., 2012. **Evidence for calcitonin-producing cells in human lingual thyroids.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(3), pp.951–6.
- Varga, I., Pospíšilová, V., Gálfiová, P., et al., 2008. **Morphological view on human thymus ontogenesis.** *Cesko-Slovenska Pediatrie*, 63(4), pp.201–208.
- Varga, I., Pospíšilová, V., Gmitterová, K., et al., 2008. **The phylogenesis and ontogenesis of the human pharyngeal region focused on the thymus, parathyroid, and thyroid glands.** *Neuroendocrinology Letters*, 29(6), pp.837–845.
- Verfaillie, C.M., Pera, M.F. & Lansdorp, P.M., 2002. **Stem cells: hype and reality.** *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, pp.369–91.
- Viciano, M.J. et al., 1996. **Papillary carcinoma of the thyroid with mucoepidermoid differentiation.** *Archives of pathology & laboratory medicine*, 120(4), pp.397–8.
- Volante, M. et al., 1999. **Mixed medullary-follicular thyroid carcinoma: Molecular evidence for a dual origin of tumor components.** *American Journal of Pathology*, 155(5), pp.1499–1509.
- Wagner & Soler. Univ. Delaware, 2013. **Mammalian histology. Microscopic anatomy.** Available at: <http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/histopage.htm> [Accessed May 14, 2015].
- Waldo, K.L., Lo, C.W. & Kirby, M.L., 1999. **Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development.** *Developmental biology*, 208(2), pp.307–23.

- Walter, F., 2003. **“SYNTHESIS OF THYROID HORMONES.”** In Elsevier/Saunders, ed. *Medical Physiology: A cellular and molecular approach. Elsevier/Saunders . p. 1300 ISBN 1-4160-2328-3.* p. Chapter 48.
- Weissman, I.L., Anderson, D.J. & Gage, F., 2001. **Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations.** *Annual review of cell and developmental biology*, 17, pp.387–403.
- Welsch, U., 2009. *HISTOLOGÍA SOBOTTA, WELSCH*, Editorial médica Panamericana.
- Wendl, T. et al., 2002. **pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish.** *Development*, 129(15), pp.3751–3760.
- Westerlund, J. et al., 2008. **Expression of Islet1 in thyroid development related to budding, migration, and fusion of primordia.** *Developmental Dynamics*, 237(12), pp.3820–3829.
- Wierup, N. et al., 2007. **Characterisation of CART-containing neurons and cells in the porcine pancreas, gastro-intestinal tract, adrenal and thyroid glands.** *BMC Neuroscience*, 8.
- Williams, E.D., Toyn, C.E. & Harach, H.R., 1989. **The ultimobranchial gland and congenital thyroid abnormalities in man.** *Journal of Pathology*, 159(2), pp.135–141.
- Wollman, S.H. & Hilfer, S.R., 1978. **Embryologic origin of the various epithelial cell types in the second kind of thyroid follicle in the C3H mouse.** *Anatomical Record*, 191(1), pp.111–121.
- Wollman, S.H. & Hilfer, S.R., 1977. **Embryologic origin of various epithelial cell types in the thyroid gland of the rat.** *Anatomical Record*, 189(3), pp.467–478.
- Wollman, S.H. & Nève, P., 1971a. **Postnatal development and properties of ultimobranchial follicles in the rat thyroid.** *The Anatomical record*, 171(2), pp.247–258.
- Wollman, S.H. & Nève, P., 1971b. **Ultimobranchial follicles in the thyroid glands of rats and mice.** *Recent progress in hormone research*, 27, pp.213–234.
- Yokota, Y. et al., 2013. **A Case of Mixed Medullary Follicular Cell Carcinoma Diagnosed with High Serum Carcinoembryonic Antigen Levels.** *Practica Oto-Rhino-Laryngologica*, 106(8), pp.733–737.
- Zhang, P. et al., 2006. **Cancer stem cell hypothesis in thyroid cancer.** *Pathology international*, 56(9), pp.485–9.

VIII.- ANEXOS

ANEXO I.- ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AANAT: aralkylamine N-acetyltransferase

APUD: amine Precursor Uptake and Decarboxylation

α -CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CART: cocaine and amphetamine related transcript

CK: citoqueratina

CMT: carcinoma medular de tiroides

CN: células de la cresta neural

CT: calcitonina

CUB: cuerpo ultimobranquial

DAB: diaminobencidina

DIT: diyodotirosina

ESC: células madres embrionarias

FR: Fast-Red

FUB: folículos ultimobranquiales

HHT: eje hipotálamo- hipófisis- tiroides

HIOMT: hydroxyindole-O-methyl transferase

H-E: Hematoxilina-Eosina

I-: yoduro

Ig: inmunoglobulina

IHQ: inmunohistoquímica

IF: inmunofluorescencia

IGF-1: insuline growth factor-1

ISSCR: International society for stem cell research

MIT: monoyodotirosina

NIH: National institute of health

NIS: symporter Na⁺/I⁻

NSE: Enolase específica neuronal

RER: retículo endoplasmático rugoso

SCN: Solid Cell Nests

SNED: Sistema Neuroendocrino Difuso

SNS: Sistema nervioso simpático

SPC: side population cells

SS: somatostatina

SSC: células madres somáticas o adultas

Tg: tiroglobulina

T3: triyodotironina

T4: tiroxina o tetrayodotironina

TPO: tiroperoxidasa o peroxidasa tiroidea

TSH: hormona estimulante del tiroides o tiotropina

TRH: thyrotropin releasing hormone

UB: ultimobranquial

ANEXO 2.- PUBLICACIONES RELACIONADAS

- **“Postnatal fate of the ultimobranchial remnants in the rat thyroid gland.”**

Vázquez-Román V^a, Utrilla JC, Fernández-Santos JM, Conde E, Bernabé R, Sampedro C, Martín-Lacave I.

Journal of Morphology. July 2013; 274 (7): 725-732.

Postnatal Fate of the Ultimobranchial Remnants in the Rat Thyroid Gland

Victoria Vázquez-Román,¹ José C. Utrilla,¹ José M. Fernández-Santos,¹ Esperanza Conde,² Reyes Bernabé,³ Consuelo Sampedro,⁴ and Inés Martín-Lacave^{1*}

¹Department of Normal and Pathological Cytology and Histology, School of Medicine, University of Seville, Spain

²Department of Cellular Biology, School of Biology, University of Seville, Spain

³Nuestra Señora de Valme Hospital, Servicio Andaluz de Salud, Seville, Spain

⁴C. de Salud M. Navarro, Servicio Andaluz de Salud, Seville, Spain

ABSTRACT The ultimobranchial follicles (UBFs) are considered embryonic remnants from the ultimobranchial body (UBB). They are follicular structures that vary in size and appearance depending on the age of the rat. The main objective of this article was to study the progressive changes in shape, size, and frequency of the UBFs in the postnatal rat, from birth to old-age. To accomplish that objective, a systematic morphometric and incidental study of the UBF has been carried out in 110 Wistar rats of different ages and both sexes, divided into three groups: 1) young rats (5–90-day-old); 2) adult rats (6–15-month-old), and 3) old rats (18–24-month-old). The glands were serially sectioned and immunostained for calcitonin at five equidistant levels. According to our results, UBFs were observed in all thyroid glands but a more exhaustive sampling was occasionally necessary in male rats. In young rats, immature UBFs predominantly appeared whereas in adult rats, mature UBFs with cystic appearance and variable luminal content prevailed. We frequently found spontaneous anomalous UBFs in old rats, which we have termed as “ultimobranchial cystadenomata.” Additionally, in young rats, UBF areas significantly increased with age and they were larger when compared to that of normal thyroid follicles. Likewise, in adult rats, UBFs were significantly larger than normal thyroid follicles but only in female rats. In general, UBFs in females were also significantly larger than those found in male rats. Finally, all these differences related to UBFs together with a higher incidence in females of UB cystadenomata suggest a sexual dimorphism in regard to the destiny of these embryonic remnants during postnatal thyroid development. *J. Morphol.* 274:725–732, 2013. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: ultimobranchial follicle; ultimobranchial cystadenoma; C-cells; rat thyroid gland

INTRODUCTION

In mammals, the thyroid gland consists of two endocrine cell types, namely, follicular cells and C-cells. These two cell populations are of distinct embryonic origins. During development, the thyroid diverticulum, which is derived from the endodermic epithelium of the ventral pharyngeal floor, moves caudally down along the midline and forms two lateral lobes, thus giving rise to follicular cells.

In contrast, the ultimobranchial body (UBB) develops from the fourth pharyngeal pouch and migrates to its final place of residence, the lateral lobes of the thyroid gland. There it gives rise to C-cells, which synthesize and secrete calcitonin, a serum calcium-lowering hormone (Westerlund et al., 2008; Fagman and Nilsson, 2011).

However, in a variety of animals, including humans, a third cell population, obviously differing from the aforementioned, has been described. These cells form the lining of follicular structures that have been considered as embryonic remnants of the UBBs. Such structures show interspecies differences and have been described in the literature under several different denominations: “second kind of thyroid follicles,” “ultimobranchial follicles,” “ultimobranchial tubules,” or “ultimobranchial cysts,” in rodents (Van Dyke, 1944; Wollman and Nève, 1971a, b; Rao-Rupanagudi et al., 1992; Martín-Lacave et al., 1992); “C-cell complexes,” in dogs (Kameda et al., 1980; Leblanc et al., 1990); “unusual follicles,” in the fox (Srivastav and Swarup, 1982); “ultimobranchial remnants,” in bulls (Ljungberg and Nilsson, 1985); and “solid cell nest” (SCN), in humans (Harach, 1988; Beckner et al., 1990; Harach et al., 1993).

Evidences of the UBB origin of the second kind of thyroid follicles in rodents have been provided by different authors. Specifically, Wollman and Hilfer (1977, 1978) demonstrated the development of ulti-

Contract grant sponsor: Consejería de Innovación; Ciencia y Empresa; Junta de Andalucía, Spain; Grant numbers: CTS-439/2009, P08-CVI-03598.

*Correspondence to: Inés Martín-Lacave; Department of Cytology and Histology, School of Medicine, Avda. Sánchez-Pizjuán s/n, 41009 Seville, Spain.
E-mail: ilacave@us.es

Received 7 September 2012; Revised 28 November 2012;
Accepted 18 December 2012

Published online 28 January 2013 in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com)
DOI: 10.1002/jmor.20126

mobranchial follicles (UBFs) from transplants of ultimobranchial outpocketing to kidney capsules, whereas transplants from the ventral outpocketing formed exclusively normal thyroid follicles, with differences between rats and mice related to the characteristics of developed UBF. In humans, the ultimobranchial origin of SCN has been extensively discussed. Nevertheless, most evidences support that SCN are vestiges of the UBB as both structures share the same anatomical, morphological, and immunohistochemical features, besides the presence of C-cells in SCN (Nadig et al., 1978; Janzer et al., 1979; Harach, 1988; Harach et al., 1993; Reis-Filho et al., 2003; Burstein et al., 2004; Moreno et al., 1989; Rios Moreno et al. 2011).

In rodents, particularly in rats, many reports described the morphology of the UBFs (Van Dyke, 1944; Wollman and Nève, 1971a; Rao-Rupanagudi et al., 1992; Martin-Lacave et al., 1992). In general, UBFs were located partially embedded amongst the usual thyroid follicles in the center of the lobe and they were characterized by being lined by two or more layers of squamous cells, having an abundance of desquamated cells in the lumen. Differences related to the UBF size, shape, and luminal content with age have been reported (Wollman and Nève, 1971a, b), however, a systematic study of UBF fate during the life span of the rat (0–24 months old) is lacking. Moreover, neither morphometric analyses nor UBF differential incidences studies between male and female rats have yet to be carried out. Therefore, the main objective of the present study is to describe the UBF developmental progression along the life span of the Wistar rat, in terms of shape, size, and frequency, highlighting the possible existence of a sexual dimorphism.

MATERIALS AND METHODS

One hundred and ten Wistar rats of both sexes and different ages were used. Rats were divided into three groups: 1) 40 young rats of both sexes (5-10-15-20-25-30-60-90 days old); 2) 40 adult rats (20 females and 20 males) of 6-9-12-15 months old; and, finally, and 3) 30 old rats (15 females and 15 males) of 18-21-24 months old. Each age group consisted of five animals. Rats were anesthetized, and the thyroid gland and the attached parathyroid glands and trachea were removed and processed. All experiments were conducted in accordance with the guidelines proposed in The Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net>) involving the use of laboratory animals. The samples were fixed for 3 h in Bouin's solution and embedded in paraffin. Thyroids were serially sectioned at a thickness of 5 μ m, from the superior pole to the inferior pole of the gland, and mounted on slides (15 sections each). The first and last sections were stained with hematoxylin and eosin. At least, five equidistant slides were immunohistochemically stained for calcitonin using a rabbit antibody (DAKO, Glostrup, Denmark) and the peroxidase-antiperoxidase or the LSAB methods (DAKO, Glostrup, Denmark), with 3,3'-diaminobenzidine as chromogen, followed or not by the periodic acid-Schiff (PAS) reaction, and counterstaining with Harris' hematoxylin, as described previously (Conde et al., 1995). Consequently, at least 75 sections were studied per animal. Morphometric analysis of UBF and normal thyroid follicles areas was also performed by software process-

ing and image analysis (Cell* Imaging Software). The area of normal thyroid follicles was exclusively obtained from those follicles ($n = 10$) which surrounded closely the corresponding UBF. Data were compared using the Student's *t*-test. *P* values of less than 0.05 were accepted as significant.

RESULTS

Localization of UBFs in the Thyroid Gland

Ultimobranchial follicles were found in one or both lobes of the thyroid gland at all ages studied. Ultimobranchial follicles occurred singly or in clusters and were mainly located in the central region of each thyroid lobe, intimately related to adjacent thyroid parenchyma and frequently in contact with perivascular connective tissue (Fig. 1). In two rats, however, UBFs were detected in an unusual position, specifically, in the connective interstitium between the tracheal cartilage and the thyroid lobe, probably as a result of an UBB emigration defect (Fig. 2A). At all ages, thyroid lobes with more than one UBF were found and in most of the cases they were very close or even interconnected.

Morphology of UBFs at Different Ages

Young rats: 5–90-day-old. In the youngest rats (5–30-day-old), UB remnants were observed to vary in size, appearance, and luminal content, according to these features they were called “immature UBFs.” These structures evolved from narrow cellular nests or rods to tubular structures, in 5–10-day-old rats, through intermediate stages in which they appeared either as an epithelial pearl-like structure or presented a “mixed follicle” appearance in others (Fig. 1A–E). Most immature UBFs could be distinguished from adjacent evolving thyroid follicles for being composed of solid clusters constituted by cells with less cytoplasm than typical follicular cells, which exhibited a slightly golden color with this particular immunohistochemical procedure, and showed more ovoid and grouped nuclei (Fig. 1A–C). On the other hand, mixed follicles were partially made by UBF fused to usual thyroid follicles. Generally, some cells and cell debris could be observed in the lumen of immature UBFs (Fig. 1E).

In 60-day-old rats or over, most UBFs were spheroidal and presented a cystic appearance in whose wall more than one cell layer was always distinguishable. At the periphery, they showed cuboidal cells which tended to flatten towards the central lumen. This structure was called “mature UBF” (Fig. 1F). By morphometric analysis, UBFs in the young-rat group were found to have a size above normal thyroid follicles, with an average area of 2874 ± 970 vs. $1898 \pm 741 \mu\text{m}^2$, highly significant statistically values ($P < 0.01$; Fig. 3).

Adult rats: 6–15-month-old. In this group, “mature UBFs” were predominant, in most cases with cystic appearance and round (Fig. 2A–D).

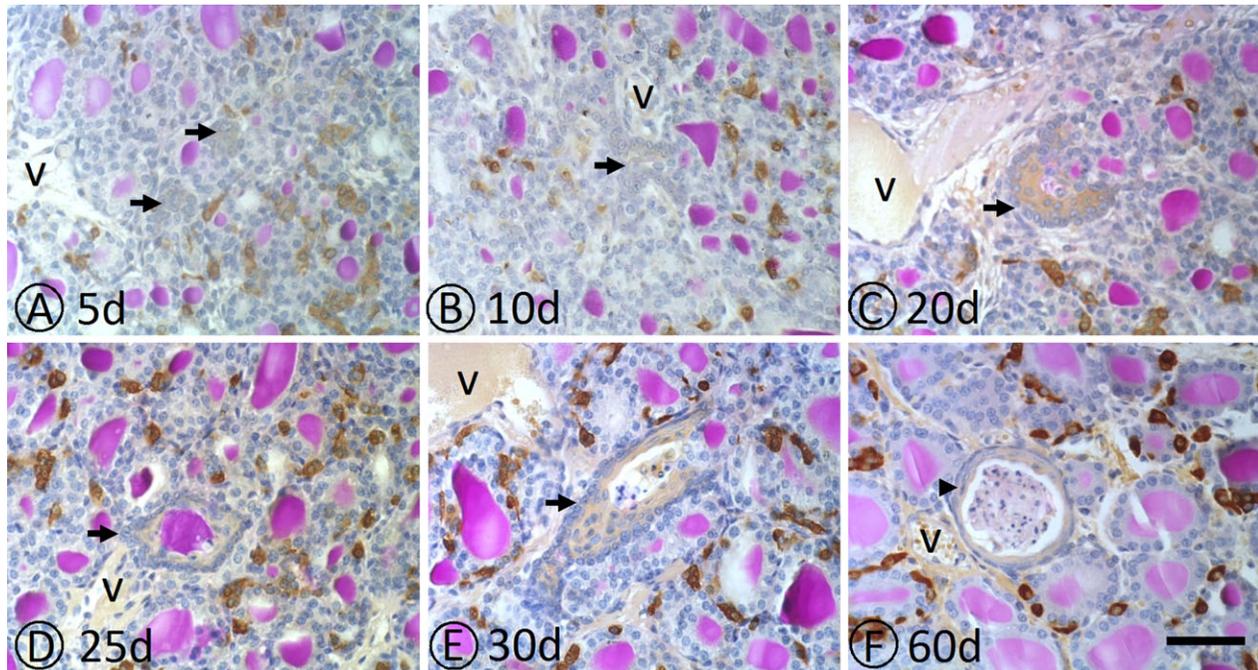


Fig. 1. Progressive UBF transition in the rat thyroid gland from immature (5–30-day-old) to mature forms (60-day-old). Immature UBFs (see arrows) consist of solid cellular nests (A, 5d), narrow rods (B, 10d), epithelial pearls (C, 20d), tubular structures with luminal content (D, 25d), and “mixed follicles” (E, 30d). However, mature UBFs (see arrow head) are cystic structures with a multilayered wall and cellular detritus in the lumen (F, 60d). In general, UBFs are located in contact with perivascular connective tissue around a major vein (see V). In all photomicrographs, C-cells are labelled for calcitonin (in brown colour). d = days of age; Bar = 80 μm .

Pyknotic nuclei, desquamated cells, and PAS-positive material traces were frequently found in the luminal content. The cells at the outer layer from mature UBFs were generally more flattened than those observed in immature ones. The UBF size was variable according to the rat and age. In general, UBFs in female rats were slightly larger than those found in male rats (Table 1), with an average area of 6205 ± 1781 vs. $5199 \pm 2384 \mu\text{m}^2$, not being statistically significant values. However, UBFs in females were significantly larger than normal thyroid follicles, with an average area of 6205 ± 1781 vs. $3839 \pm 367 \mu\text{m}^2$, with $P < 0.05$. In male rats, UBFs were also larger than thyroid follicles, with an average area of 5199 ± 2384 vs. 3581 ± 470 , but not statistically significant values (Table 1). Furthermore, UBFs of reduced dimensions, showing morphologies that resembled those observed in young rats, appeared preferentially in male rats at any age (Fig. 2C).

Old rats: 18–24-month-old. In the old-rat group, “mature UBFs” were also predominant (Fig. 2E–F). In general, UBFs in female rats were larger than those found in male rats (Table 1), with an average area of 6624 ± 2347 vs. $2843 \pm 786 \mu\text{m}^2$ ($P < 0.05$). Accordingly, at most ages considered, the female UBF area was superior to that of males (Fig. 4). Furthermore, UBFs in females were larger than normal thyroid follicles, with an

average area of 6624 ± 2347 vs. $4376 \pm 370 \mu\text{m}^2$, but not statistically significant. In contrast, in male rats, UBFs were significantly smaller than thyroid follicles, with an average area of 2843 ± 786 vs. 4634 ± 447 ($P < 0.01$; Table 1).

When adult and old rat groups were considered together, the differences between female and male UBF areas significantly increased, with an average area of 6385 ± 1864 vs. $4142 \pm 2116 \mu\text{m}^2$ ($P < 0.01$). These data support the clear tendency towards a sexual dimorphism related to UBF area progression in rats.

The presence of very large cystic structures was also observed in adult and old rats, sometimes exhibiting a clustered appearance, which we named “UB cystadenomata” (Fig. 2G–I). The UB cystadenomata contained a degenerative material in the lumen, which was organized in concentric layers resembling a sliced onion, with no trace of nuclei, and were scarcely vascularized. Their area ranged from 22,759 to 200,244 μm^2 , with an average area of $83,981 \pm 53,682 \mu\text{m}^2$ (Table 2), a considerably greater size than the normal adjacent thyroid follicles ($3765 \pm 984 \mu\text{m}^2$, $P < 0.01$). These structures were found in 17% of the oldest rats and were more frequent in females than in males (ratio 2.33:1). Normally, these structures compressed the adjacent thyroid parenchyma which, despite this, maintained its integrity. Nevertheless, there was one

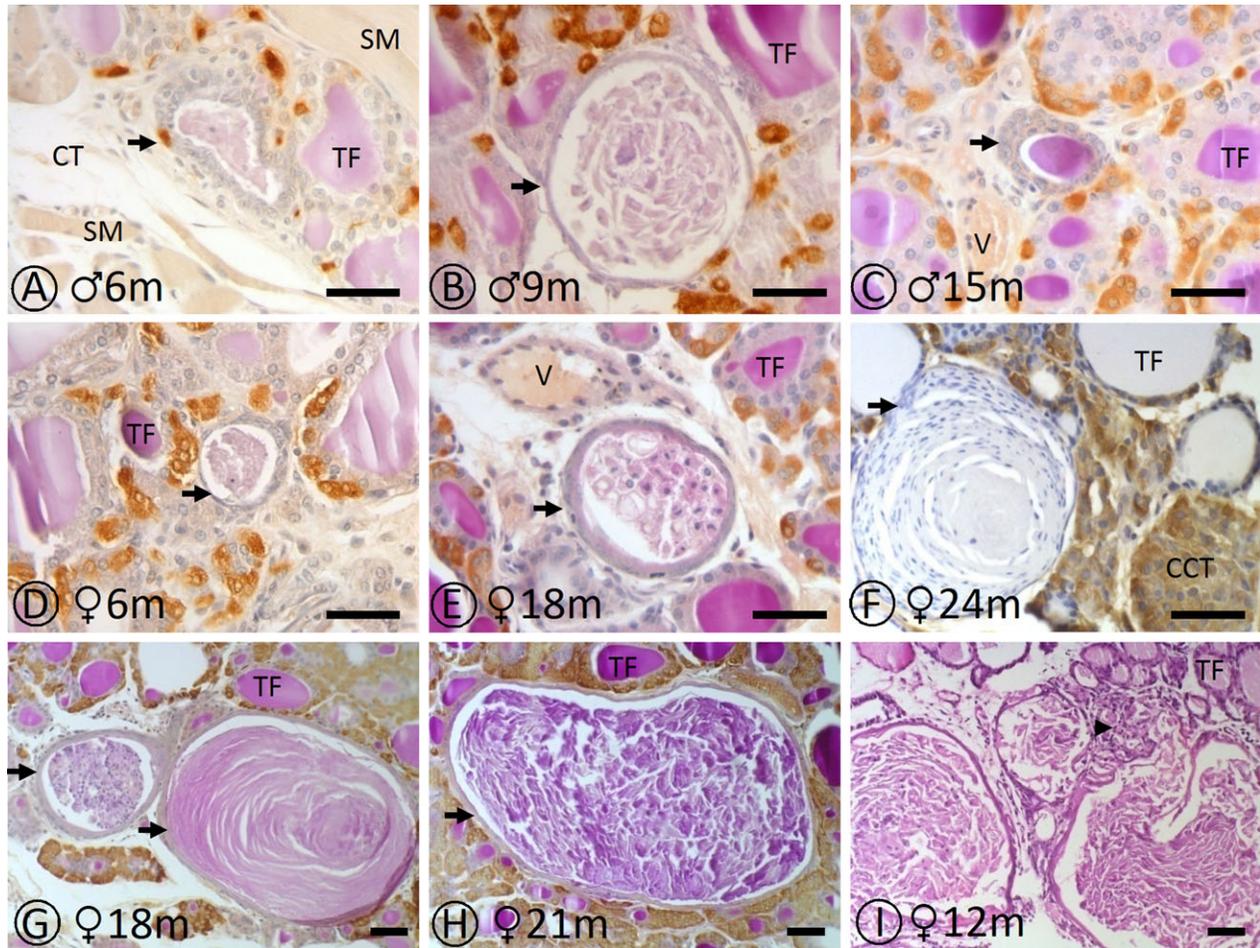


Fig. 2. Developmental progression of UBFs in male and female rats from 6- to 24-month-old. In male rats (♂), either mature and immature forms of UBFs are indistinctly observed (see arrows), ranging from an unusual peripherally located UBF with C-cells in the wall (A, 6m), a characteristic mature form (B, 9m) to an immature UBF (C, 15m). In female rats (♀), however, mature UBFs of increasing sizes are observed (see arrows), ranging from typical cystic structures of variable luminal content (D, 6m; E, 18m; F, 24m) up to the appearance of characteristic ultimobranchial cystadenomata (G, 18m; H, 21m). The cystadenoma found in a 12-month-old rat (I), which was stained with Hematoxylin–Eosin, exhibits a more aggressive morphology by invading the adjacent thyroid parenchyma (see arrow head). At all ages, UBFs usually occur in the interior of the thyroid lobe embedded among normal thyroid follicles (see TF). In all photomicrographs, C-cells are labelled for calcitonin (in brown colour). m = months of age; CCT = C-cell tumor; CT = connective tissue; SM = skeletal muscle; TF = usual thyroid follicle; V = vein; Long, and small bars = 80 μ m.

single case, a 12-month-old female rat, in which the UB cystadenoma reached such a great size that it practically occupied most of the thyroid lobe, besides exhibiting aggressive morphology (Fig. 2I). Furthermore, in two cases, the UB cystadenomata were adjacent to C-cell tumors.

Relation of UBFs with Thyroid Endocrine Cells

Small thyroid follicles with a normal appearance could be frequently observed, in close association with the wall of immature UBFs, called “mixed follicles” (Fig. 1E). In relation to C-cells, its presence was only occasional in association with UBFs. Specifically, C-cells and C-cell mitosis were visualized in the wall of those UBFs atypically located in a par-

atracheal position (Fig. 2A), as previously has been mentioned, as well as in scarce immature UBFs, but never in connection with the wall of mature UBFs. Although UBFs were generally located in the interior of the thyroid lobe (the region where C-cells predominate, hence the so-called “C-cell area”), a specific increase in C-cell numbers could not be observed around UBFs at any age.

Incidence of UBFs

We considered that a rat contains UB remnants if, at least, they appear in one of the two thyroid lobes. After the analysis of five equidistant levels per animal (75 sections in total), an apparently higher incidence in the young rat group was observed (5–90-day-old), followed by the groups of

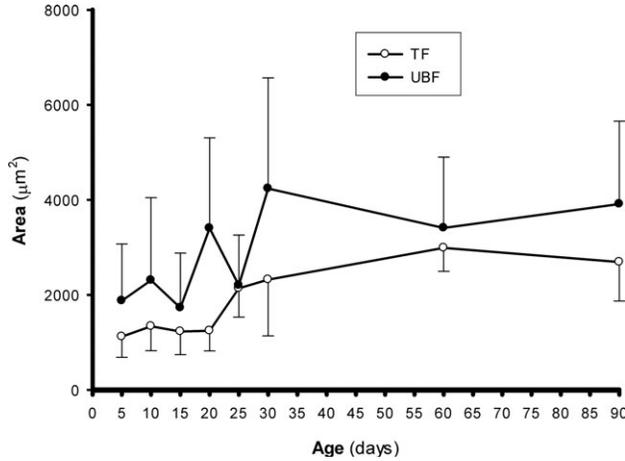


Fig. 3. Progression of the UBF area, in comparison with the area of normal thyroid follicles (TF), with age in young rats (5–90-day-old). As can be observed, UBFs are larger than thyroid follicles at most ages studied.

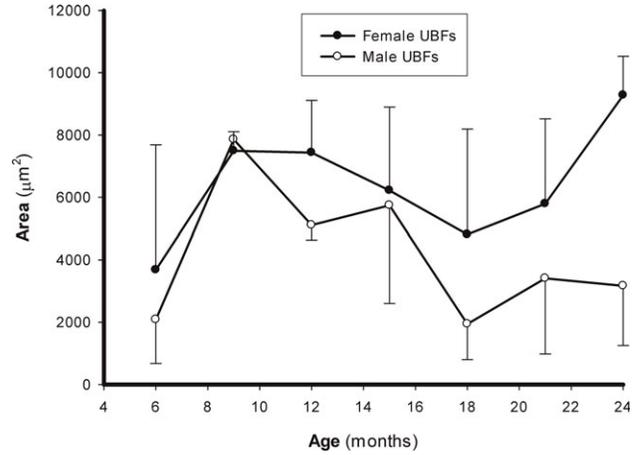


Fig. 4. Progression of the UBF area in relation to the gender and age in adult and old rats (6–24-month-old). A tendency towards a sexual dimorphism in relation to the size of UBFs is observed.

adult and old female rats in comparison with male rats of the same age. However, when no UBF was observed in a rat after studying the thyroid lobes in these conditions of sampling, we proceeded to stain additional sections of the same thyroid gland, then the prospect of some UBFs appearing considerably increased, preferentially in male rats. In fact, when we analyzed six completely seriated thyroid glands (three males and three females), we found UBFs in all thyroid lobes. Consequently, we can conclude that all thyroid glands contain UBFs, independently of the age and gender.

DISCUSSION

The developmental progression of UB thyroid remnants throughout the postnatal life of the rat

has been studied, from the moment of birth to 24-months-old, with the aim of checking whether differences are found relating to age and gender. At all ages examined, UBFs could be observed. In younger rats, “immature UBFs” appear that evolve from cellular solid nests and tubular cystic forms through intermediate stages until becoming “mature UBFs,” the characteristic cystic and multilayered form with variable luminal content found in adult rats. These UBFs forms are clearly differentiable from normal thyroid follicles, both in structure and size, and significantly larger than normal ones, only in female rats. Furthermore, we have also found a significant difference in the size of the UBFs depending on the age of the rats, UBFs of adult rats being larger than those found in young rats.

TABLE 1. Areas (μm^2) of ultimobranchial follicles (UBF) and normal thyroid follicles (TF) in rats of different gender and age. The statistical analysis was performed between UBF and TF areas of the same sex and age rat groups

(I) Adult rats (age)	Female		Male	
	UBF area (μm^2)	FT area (μm^2)	UBF area (μm^2)	FT area (μm^2)
6-month-old	3681 ± 4001	3463 ± 454	2087 ± 1412	3145 ± 804
9-month-old	7489 ± 619	4239 ± 886	7859 ± 350*	4010 ± 379
12-month-old	7432 ± 1681*	3481 ± 532	5110 ± 476*	3204 ± 225
15-month-old	6218 ± 2677*	4173 ± 1170	5743 ± 3136	3967 ± 422
Mean ± SD	6205 ± 1781*	3839 ± 367	5199 ± 2384	3581 ± 470
(II) Old rats (age)	UBF area (μm^2)	FT area (μm^2)	UBF area (μm^2)	FT area (μm^2)
18-month-old	4809 ± 3384	3983 ± 666	1946 ± 1146	4118 ± 484**
21-month-old	5790 ± 2727	4425 ± 96	3414 ± 2431	4864 ± 929
24-month-old	9275 ± 1251*	4720 ± 692	3171 ± 1916	4920 ± 267*
Mean ± SD	6624 ± 2347	4376 ± 370	2843 ± 786	4634 ± 447**
Total mean (6–24-month-old)	6385 ± 1864*	4069 ± 467	4142 ± 2116	4033 ± 702

N = 5 animals/sex/age; SD = standard deviation.

*P ≤ 0.05.

**P ≤ 0.01.

TABLE 2. Incidences and specific areas of ultimobranchial cystadenomata according to age and gender

Rat age/Incidence	Female (μm^2)	Male (μm^2)
9-month-old F: 0/5; M: 1/5	–	57,964
12-month-old F: 1/5; M: 1/5	200,244	32,817
15-month-old F: 2/5; M: 0/5	103,404 22,759	–
18-month-old F: 2/5; M: 1/5	34,238 88,004	70,112
21-month-old F: 1/5; M: 0/5	128,828	–
24-month-old F: 1/5; M: 0/5 F: 7/30; M: 3/30	101,443	–
Mean \pm SD	96,988 \pm 59,532	53,631 \pm 19,021
Total mean \pm SD	83,988 \pm 53,682 μm^2	

F = female; M = male; N = 5 animals/sex/age; SD = standard deviation.

Apart from the immature and mature forms of UBFs, a third form of UB remnant has also been found in the oldest rats, which we have designated as "UB cystadenoma." This structure may represent an unusual progression of the previous forms and is characterized by its cystic appearance, the concentric luminal content made of multiple layers of desquamated and anucleated cells, and by its considerable size which compresses the adjacent thyroid parenchyma. The UB cystadenomata are also more frequent in female than in male rats.

This is the first time that a sexual dimorphism tendency related to the UB remnants fate has been demonstrated in the rat thyroid gland. Although Wollman and Nève (1971a, b) meticulously described the UBFs progression in rodents, at both light-microscopic and ultrastructural levels, they circumscribed their study to male rats ranging from 2 to 365 days of age (Wollman and Nève, 1971a). Therefore, they could evaluate neither gender differences nor the existence of the most mature form of the UB remnants, UB cystadenomata.

In relation to the frequency of UBFs in Wistar rats, we have observed this structure in practically all thyroid glands. These results differ from those described by Van Dyke (1944) for the Sprague–Dawley rat, who found the following rates: 15%, 34.5%, and 61.9% for the same periods of age, more frequent in females than in male rats. Rao-Rupana-gudi et al. (1992) made a morphological study in Sprague–Dawley rats and found ultimobranchial cysts in one-third of all the animals examined. These last authors, as well as Takaoka et al. (1995), reported, however, that the number of UB cysts decreased with age. A possible explanation of this controversy could possibly be the number of sections observed per thyroid gland. According to our experience, when no UBF was observed in a rat after studying the selected thyroid levels, and we proceeded to stain additional sections of the same

gland, the prospect of some UBF appearing significantly increased. Consequently, we coincide with Wollman and Nève (1971a, b) that UBFs are present in both thyroid lobes of all rats, independently of the age and gender.

In relation to the higher incidence of UBFs found in female rats in comparison with male rats that some authors have observed (Van Dyke, 1944; Rao-Rupana-gudi et al., 1992), the most plausible explanation may be that the size of the UBFs in female rats is significantly greater than that exhibited in male rats, as we have reported in the present manuscript. Consequently, more possibilities to locate UBFs on the selected thyroid sections in female rats, together with the greater ability to distinguish them from normal thyroid follicles are found.

The morphology of UB remnants in rats differs in some aspects from those found in other species such as mice (Wollman and Nève, 1971a; Wollman and Hilfer, 1978), dogs (Kameda et al., 1980; Leblanc et al., 1990), shrews (Swarup et al., 1978); foxes (Srivastav and Swarup, 1982), guinea pigs (Juhl, 1981), bulls (Ljungberg and Nilsson, 1985), bison (Sawicki and Zabel, 1997), and humans (Harach, 1988; Mizukami et al., 1994). Nevertheless, it is generally understood that in early stages of the embryonic development, in all species, these structures constitute the origin of C-cells. In fact, we have observed C-cells arising from the rat UBFs wall in specific cases (Martin-Lacave et al., 1992). In addition, UB remnants may also be a place where follicular cells could be produced, at least in rats (Moreno et al., 1989; Conde et al., 1992), although it is more controversial in other species, such as humans, where SCNs represent the remnants of the UBB (Williams et al., 1989). However, several authors share the opinion that SCNs contribute to both calcitonin producing cells (C-cells) and thyroglobulin-producing cells (follicular cells) to the thyroid gland itself as well as to some specific thyroid tumors, such as the mixed follicular thyroid neoplasia (Williams et al., 1989; Cameselle-Teijeiro et al., 1994). According to the results described by Cameselle-Teijeiro et al. (1994), the male:female ratio of SCNs is 1:6. Nevertheless, other authors, such as Martin et al. (2000), reported SCNs in 16% of men and 8% of women, therefore it does not allow for any conclusion concerning the relative frequency of SCNs according to sex.

We have identified a new entity arising from the UB remnants in rats, called UB cystadenoma. These structures may represent the final fate of mature UBFs or, more probably, an unusual progression of UBFs, considering their peculiar morphology and huge size. Similarly, Ljungberg and Nilsson (1985) described hyperplastic and neoplastic changes of the UB remnants in bulls, which they termed ultimobranchial carcinomas. These tumors closely resembled an intermediate type of

human differentiated thyroidal carcinoma with morphological and immunohistochemical traits of both medullary and follicular carcinoma, aforementioned mixed follicular thyroid neoplasia, which is probably derived from human UB remnants (Cameselle-Teijeiro et al., 1994).

The sexual dimorphism related to UB remnants destiny in the rat thyroid gland coincides with that reported by us in relation to the frequency of proliferative disorders whose origin is in C-cells: both C-cell hyperplasia and C-cell tumors presented a greater incidence in female in comparison with male rats, which increased with age (Martin-Lacave et al., 1999). In regard to the incidence of spontaneous thyroid tumors derived from follicular cells, the data varied according to the rat strain and the authors. Specifically, some researchers found a greater frequency in female than in male rats (Kaspereit-Rittinghausen et al., 1990; Baum et al., 1995) but others described opposite results (Goodman et al., 1979, 1980). In humans, however, neoplasias derived from follicular cells (follicular adenoma, follicular carcinoma, papillary thyroid carcinoma, anaplastic thyroid carcinoma) as well as C-cells (medullary thyroid carcinoma) are more common in women than men (Rosai et al., 1992; Dionigi et al., 2007). The reasons of this sexual dimorphism in thyroid pathology have yet to be discovered.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Mr. John Brown for the corrections of the English language.

LITERATURE CITED

- Baum A, Pohlmeier G, Rapp KG, Deerberg F. 1995. Lewis rats of the inbred strain LEW/Han: Life expectancy, spectrum and incidence of spontaneous neoplasms. *Exp Toxicol Pathol* 47:11–18.
- Beckner ME, Shultz JJ, Richardson T. 1990. Solid and cystic ultimobranchial body remnants in the thyroid. *Arch Pathol Lab Med* 114:1049–1052.
- Burstein DE, Nagi C, Wang BY, Unger P. 2004. Immunohistochemical detection of p53 homolog p63 in solid cell nests, papillary thyroid carcinoma, and hashimoto's thyroiditis: A stem cell hypothesis of papillary carcinoma oncogenesis. *Hum Pathol* 35:465–473.
- Cameselle-Teijeiro J, Varela-Duran J, Sambade C, Villanueva JP, Varela-Nunez R, Sobrinho-Simoes M. 1994. Solid cell nests of the thyroid: Light microscopy and immunohistochemical profile. *Hum Pathol* 25:684–693.
- Conde E, Martin-Lacave I, Utrilla JC, Gonzalez-Campora R, Galera-Davidson H. 1995. Postnatal variations in the number and size of C-cells in the rat thyroid gland. *Cell Tissue Res* 280:659–663.
- Conde E, Moreno AM, Martin-Lacave I, Fernandez A, Galera H. 1992. Immunocytochemical study of the ultimobranchial tubule in Wistar rats. *Anat Histol Embryol* 21:94–100.
- Dionigi G, Bianchi V, Rovera F, Boni L, Piantanida E, Tanda ML, Dionigi R, Bartalena L. 2007. Medullary thyroid carcinoma: Surgical treatment advances. *Expert Rev Anticancer Ther* 7:877–885.
- Fagman H, Nilsson M. 2011. Morphogenetics of early thyroid development. *J Mol Endocrinol* 46:R33–R42.
- Goodman DG, Ward JM, Squire RA, Chu KC, Linhart MS. 1979. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 48:237–248.
- Goodman DG, Ward JM, Squire RA, Paxton MB, Reichardt WD, Chu KC, Linhart MS. 1980. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging Osborne-Mendel rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 55:433–447.
- Harach HR. 1988. Solid cell nests of the thyroid. *J Pathol* 155:191–200.
- Harach HR, Vujanic GM, Jasani B. 1993. Ultimobranchial body nests in human fetal thyroid: An autopsy, histological, and immunohistochemical study in relation to solid cell nests and mucoepidermoid carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 169:465–469.
- Janzer RC, Weber E, Hedinger C. 1979. The relation between solid cell nests and C cells of the thyroid gland: An immunohistochemical and morphometric investigation. *Cell Tissue Res* 197:295–312.
- Juhl M. 1981. Morphology of the second kind of follicle in the guinea pig thyroid gland. *Acta Anat (Basel)* 110:318–326.
- Kameda Y, Shigemoto H, Ikeda A. 1980. Development and cyto-differentiation of C cell complexes in dog fetal thyroids. An immunohistochemical study using anti-calcitonin, anti-C-thyroglobulin and anti-19S thyroglobulin antisera. *Cell Tissue Res* 206:403–415.
- Kaspereit-Rittinghausen J, Wiese K, Deerberg F, Nitsche B. 1990. Incidence and morphology of spontaneous thyroid tumors in different strains of rats. *J Comp Pathol* 102:421–432.
- Leblanc B, Paulus G, Andreu M, Bonnet MC. 1990. Immunocytochemistry of thyroid C-cell complexes in dogs. *Vet Pathol* 27:445–452.
- Ljungberg O, Nilsson PO. 1985. Hyperplastic and neoplastic changes in ultimobranchial remnants and in parafollicular (C) cells in bulls: A histologic and immunohistochemical study. *Vet Pathol* 22:95–103.
- Martin-Lacave I, Bernab R, Sampedro C, Conde E, Fernandez-Santos JM, San Martin MV, Beato A, Galera-Davidson H. 1999. Correlation between gender and spontaneous C-cell tumors in the thyroid gland of the Wistar rat. *Cell Tissue Res* 297:451–457.
- Martin-Lacave I, Conde E, Moreno A, Utrilla JC, Galera-Davidson H. 1992. Evidence of the occurrence of calcitonin cells in the ultimobranchial follicle of the rat postnatal thyroid. *Acta Anat (Basel)* 144:93–96.
- Martin V, Martin L, Viennet G, Challier B, Carbillet J, Fellmann D. 2000. Solid cell nests and thyroid pathologies. Retrospective study of 1,390 thyroids. *Ann Pathol* 20:196–201.
- Mizukami Y, Nonomura A, Michigishi T, Noguchi M, Hashimoto T, Nakamura S, Ishizaki T. 1994. Solid cell nests of the thyroid. A histologic and immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 101:186–191.
- Moreno AM, Martin-Lacave I, Montero C, Gomez-Pascual A, Fernandez A, Galera H. 1989. Demonstration of sugar residues in the ultimobranchial tubule and thyroid C-cells of the rat using peroxidase labelled lectins. *Anat Histol Embryol* 18:114–121.
- Nadig J, Weber E, Hedinger C. 1978. C-cell in vestiges of the ultimobranchial body in human thyroid glands. *Virchows Arch B Cell Pathol* 27:189–191.
- Rao-Rupanagudi S, Heywood R, Gopinath C. 1992. Age-related changes in thyroid structure and function in Sprague-Dawley rats. *Vet Pathol* 29:278–287.
- Reis-Filho JS, Preto A, Soares P, Ricardo S, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. 2003. p63 expression in solid cell nests of the thyroid: Further evidence for a stem cell origin. *Mod Pathol* 16:43–48.
- Rios Moreno MJ, Galera-Ruiz H, De Miguel M, Lopez MI, Illanes M, Galera-Davidson H. 2011. Immunohistochemical profile of solid cell nest of thyroid gland. *Endocr Pathol* 22:35–39.

- Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA. 1992. Medullary carcinoma. In: Rosai J, Sobin LH, editors. Atlas of Tumor Pathology Tumors of the Thyroid Gland. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology. pp 207–245.
- Sawicki B, Zabel M. 1997. Immunocytochemical study of parafollicular cells of the thyroid and ultimobranchial remnants of the European bison. *Acta Histochem* 99:223–230.
- Srivastav AK, Swarup K. 1982. Thyroid calcitonin cells and unusual follicles in the fox. *Acta Anat (Basel)* 112:338–345.
- Swarup K, Srivastav AK, Tewari NP. 1978. Occurrence of calcitonin cells and cysts in the parathyroid of the house shrew, *Suncus murinus*. *Acta Anat (Basel)* 101:340–345.
- Takaoka M, Teranishi M, Furukawa T, Manabe S, Goto N. 1995. Age-related changes in thyroid lesions and function in F344/DuCrj rats. *Exp Anim* 44:57–62.
- Van Dyke JH. 1944. Behavior of ultimobranchial tissue in the postnatal thyroid gland: The origin of thyroid Cistoadenomata in the rat. *Anat Rec* 88:17.
- Westerlund J, Andersson L, Carlsson T, Zoppoli P, Fagman H, Nilsson M. 2008. Expression of Islet1 in thyroid development related to budding, migration, and fusion of primordia. *Dev Dyn* 237:3820–3829.
- Williams ED, Toyn CE, Harach HR. 1989. The ultimobranchial gland and congenital thyroid abnormalities in man. *J Pathol* 159:135–141.
- Wollman SH, Hilfer SR. 1977. Embryologic origin of various epithelial cell types in the thyroid gland of the rat. *Anat Rec* 189:467–478.
- Wollman SH, Hilfer SR. 1978. Embryologic origin of the various epithelial cell types in the second kind of thyroid follicle in the C3H mouse. *Anat Rec* 191:111–121.
- Wollman SH, Nève P. 1971a. Postnatal development and properties of ultimobranchial follicles in the rat thyroid. *Anat Rec* 171:247–258.
- Wollman SH, Nève P. 1971b. Ultimobranchial follicles in the thyroid glands of rats and mice. *Recent Prog Horm Res* 27:213–234.