

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
HOSPITAL MILITAR CENTRAL
LABORATORIO DE MEDICINA CELULAR AVANZADA STEM CELL

TRABAJO DE GRADO
DERMATOLOGIA

**CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES ASOCIADOS A FUNCIONALIDAD EN MELANOCITOS
EXPANDIDOS *EX VIVO* EN MEDIOS SELECTIVOS EN DOS TIEMPOS DEL CULTIVO**

AUTORES

Luz Mabel Ávila Portillo

Luis Antonio Castro

Paola Andrea Torres Vargas

Jennifer Ávila García

José de Jesús Arias Agudelo

PROYECTO 201133

2013

TABLA DE CONTENIDOS

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	6
3. Identificación y formulación del problema.....	9
4. Justificación.....	10
5. Objetivos e Hipótesis.....	11
6. Metodología.....	12
7. Plan de análisis.....	14
8. Aspectos éticos.....	15
9. Resultados.....	16
10. Discusión.....	20
11. Conclusiones.....	21
12. Bibliografía.....	22

LISTA DE TABLAS Y GRAFICOS

Tabla 1. Variables medidas en el donador de tejido.....	16
Tabla 2. Variables medidas en el espécimen de tejido.....	16
Tabla 3. Dias en los que se alcanzó confluencia de 80 a 90% para pase 1 y 2.	17
Tabla 4. Células obtenidas en pase 1 y 2 – Conteo cámara de Newbauer.....	17
Tabla 5. Numero de melanocitos observados por mm ² en tejido con tinción HE.....	17
Tabla 6. Expresión de receptores HMB45, Melan A y c- Kit en el primer pase.....	18
Tabla 7. Expresión de receptores HMB45, Melan A y c- Kit en el segundo pase.....	18
Tabla 8. Aumento de expresión de receptor HMB45 entre primer y segundo pase.....	18
Tabla 9. Aumento de expresión de receptor Melan –A entre primer y segundo pase.....	18
Tabla 10. Aumento de expresión de receptor c- Kit entre primer y segundo pase.....	19

1. RESUMEN

TITULO DE LA INVESTIGACION: Caracterización de receptores asociados a funcionalidad en melanocitos expandidos *ex vivo* en medios selectivos en dos tiempos del cultivo.

AUTORES:

Paola Andrea Torres Vargas Correo electrónico: ptova85@hotmail.com

Luz Mabel Ávila Portillo Correo electrónico: mabelavila_us@yahoo.com

Luis Antonio Castro Correo electrónico: lcastro_gomez@hotmail.com

Jennifer Ávila García Correo electrónico: priscila842@hotmail.com

José de Jesús Arias Agudelo

PROGRAMA: Dermatología

OBJETIVO: Caracterizar los receptores asociados a funcionalidad en melanocitos expandidos *ex vivo* en medios selectivos en dos tiempos del cultivo.

METODOLOGIA: Se realizó un estudio básico cuasi experimental con tejido obtenido por biopsia de piel de Individuos sanos mayores de 18 años que participaron voluntariamente. El tamaño de la muestra fue por conveniencia con un total de 15 participantes. El tejido obtenido de los primeros 10 fue utilizado para la estandarización del cultivo. Con el tejido obtenido de los últimos 5 se realizó el estudio llevándose el cultivo a confluencia de 80% - 90% en el segundo pase. Las principales variables medidas fueron: 1. El número de melanocitos presentes casa pase, y la expresión de receptores de funcionalidad c-Kit, Melan A y HMB45 en estas células.

RESULTADOS: El tejido se obtuvo de 5 individuos de género masculino con media de edad de 26.8 años y fototipos II, III Y IV.

Tras el proceso de obtención y cultivo en medios selectivos se logró el crecimiento exitoso de melanocitos *ex vivo* con una media de tiempo para lograr la confluencia de 80 a 90% en el primer pase de 35 días y para el segundo pase de 51.2 días. La media de número de melanocitos obtenidos por cultivo en el primer pase fue de 233.000 células y para el segundo pase fue de 553.000 células.

La media de melanocitos observados por mm² con hematoxilina y eosina en tejido fue de 6.4. La media de expresión del receptor HMB45 en el primer pase fue de 9%, para Melan – A 30% y para C-Kit 9%. En el segundo pase la expresión de HM45 fue de 62%, para Melan A de 81% y para C- Kit de 37%.

Hubo aumento del porcentaje de expresión de los receptores de funcionalidad entre el primer y segundo pase con una media de aumento de 53% para HMB45, una media de 51% para Melan A y una media de 28% de aumento para c- Kit.

CONCLUSION: La terapia celular avanzada con cultivo de melanocitos abre la puerta a una alternativa terapéutica con condiciones óptimas para obtener melanocitos viables y funcionales que garanticen su mejor implantación en pacientes con vitiligo. Esta implantación dados los resultados obtenidos sería ideal en el segundo pase del cultivo donde los melanocitos aumentan su expresión de receptores de funcionalidad lo que auguraría la implantación y repigmentación exitosa.

PALABRAS CLAVES: Melanocitos, Cultivo celular, Receptores de Funcionalidad

2. INTRODUCCION Y MARCO TEORICO

La piel constituye el 15% del peso corporal total y es el órgano más grande del cuerpo humano. Se compone de 3 capas: epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo, cada una de ellas con estructura compleja y función. Sirve como barrera mecánica contra agentes químicos, físicos y biológicos; es un órgano inmunológico por excelencia; participa en la regulación térmica e hidroelectrolítica y es importante en la sensualidad y el bienestar físico y social.¹

Dentro de una de sus funciones, se encuentra la protección contra la radiación ultravioleta (RUV), ejercida por los melanocitos basales, que mediante la producción de melanina, evitan la formación de radicales libres de oxígeno y dímeros de pirimidina, deletéreos para la célula.¹

El color de la piel, pelo y ojos de los mamíferos, resulta de la presencia y distribución de los pigmentos de melanina, polímeros derivados de la degradación del aminoácido tirocinasa.^{2,3} La melanina se sintetiza, exclusivamente, a partir de una pequeña población de células que incluyen los melanocitos y el epitelio pigmentario de la retina.⁴

Los melanocitos se derivan embriológicamente de la cresta neural y migran a múltiples órganos y tejidos, incluyendo la capa basal de la epidermis, los ojos, el oído interno y las leptomeninges.⁵

Constituyen células dendríticas que junto con los queratinocitos forman la unidad epidérmica de melanina, donde un único melanocito, sufre con melanosomas, a un grupo de 36 queratinocitos viables.⁶ El número de las unidades varía en las diferentes regiones del cuerpo, siendo mayor la distribución de los melanocitos por mm² en áreas fotoexpuestas como la cara (2900 +/-249), comparada con áreas no fotoexpuestas como los glúteos o piernas (1900 +/-178).⁶

La pigmentación basal, esta principalmente determinada por la genética. Sin embargo, los melanocitos también adaptan su capacidad melanogénica a estímulos extracelulares, como factores paracrin, endocrinos y ambientales externos como la luz ultravioleta.⁷

Los melanocitos tienen la capacidad de sintetizar melanina dentro de organelas llamadas melanosomas. La formación, transporte y transferencia de estos últimos, es estimulada por vías de señalización mediadas por el receptor de Melanocortina 1 (MCR1) y el factor de transcripción de microoftalmia (MITF).⁷

El MCR1 humano, es un receptor transmembrana, perteneciente a la superfamilia de receptores asociados a la proteína G.⁸ Esta expresado principalmente en los melanocitos. Es activado por las melanocortinas, proteínas derivadas de un precursor hormonal llamado proopiomelanocortina (POMC), expresado en la glándula pituitaria, melanocitos cutáneos y queratinocitos.⁹

El MC1R media una señal de transducción en la membrana del melanocito. Estimula la adenil ciclasa, llevando a un aumento del AMP cíclico (AMPc), con activación consecuente de la proteína quinasa A (PKA) y fosforilación de la proteína de elementos de respuesta del AMPc (CREB).¹⁰ Esta última promueve la transcripción del MITF, el cual regula la diferenciación, proliferación y supervivencia del melanocito.¹⁰

La activación del MCR1 en los melanocitos, estimula la melanogénesis, promoviendo un aumento en la transcripción de la maquinaria necesaria para la biogénesis de los melanosomas y su transporte.¹² Además, a través de la señalización mediada por este receptor, los melanocitos transfieren melanosomas a los queratinocitos adyacentes.¹²

Por otra parte, existen entre muchos otros, factores estimuladores de la melanogénesis, como el factor de Steel, el cual se deriva de los queratinocitos y es inducido por la radiación ultravioleta.¹³ Éste se une al c-Kit, un receptor transmembrana, tirosin quinasa, expresado en la superficie de los melanocitos y melanoblastos, formando un dímero, que activa vías de señalización a través de segundos mensajeros, jugando un papel fundamental en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular.¹⁴

El Melan A se expresa exclusivamente en células productoras de melanina específicamente melanocitos de la piel y la retina. Se expresa en 100% de los melanocitos nevocos, melanoma primario y metastásico. Es una proteína de 118 aminoácidos que está presente de predominio en los melanosomas y el retículo endoplásmico. Su importancia radica en su intervención para la expresión, estabilidad y procesamiento de la proteína PMEL 17 la cual es de gran importancia para la formación de los melanosomas estadio II.^{8, 21}

Es entonces el melanocito, la célula protagonista en diferentes patologías dermatológicas relacionadas con alteraciones en la pigmentación, cuyas manifestaciones varían según el defecto en el proceso de la melanogénesis, teniendo de esta forma, el piebaldismo y el síndrome de Waardenburg relacionadas con la alteración en la proliferación y migración de melanocitos, el albinismo oculocutáneo, con la producción de melanina, los síndromes de Chediak-Higashi, Hermansky-Pudlak y esclerosis tuberosa, con la formación de melanosomas y el síndrome de Griselli y la incontinenencia de pigmento, con la transferencia de melanosomas. Cada uno de estos desórdenes, presentan un defecto en un gen específico y se manifiestan principalmente en la infancia.¹⁵

Una de las principales y más estudiadas enfermedades relacionadas con alteración en la pigmentación, ha sido el vitíligo. Esta patología dermatológica, afecta al 1% de la población general. Su causa no se conoce completamente, pero han sido implicados factores genéticos, autoinmunes, neurohormonales y de autotoxicidad.¹⁴

Es una enfermedad que no produce discapacidad física y es usualmente asintomática, pero puede ser psicológicamente devastadora.¹⁶ Conlleva a un importante deterioro de la calidad de vida del paciente, por la pérdida de confianza basada en la autoimagen del mismo y por la percepción que tienen las otras personas de los pacientes afectados, aunado a otros factores como la facilidad de quemadura solar de las zonas afectadas.¹⁶ El rechazo social es común y las oportunidades laborales son limitadas por la estigmatización que no se observa en otras dermatosis; además las compañías aseguradoras la califican como una enfermedad estética y el reembolso es negado generalmente.¹⁷

Aunque el tratamiento médico ha mejorado, actualmente la repigmentación completa no se consigue en todos los pacientes.¹⁶ La terapia quirúrgica, ha presentado tasas de repigmentación más altas en áreas refractarias de pacientes seleccionados, ofreciendo una solución potencial a aquellos que no respondan al tratamiento convencional.¹⁶

Las opciones quirúrgicas disponibles en la actualidad, se pueden dividir en 2 tipos: aquellas que involucren las técnicas de cultivo celular y las que no. Dentro de los tratamientos quirúrgicos que no incluyen el cultivo celular, están: injertos de espesor total (dermoepidérmicos), injertos de espesor parcial (epidérmicos), mini injertos con punch, injertos por ampollas de succión y trasplante de suspensión de queratinocitos y melanocitos no cultivados. Aunque las tasas de éxito reportadas han sido buenas, en un rango de 68-88%, estos procedimientos se limitan al tratamiento de lesiones pequeñas y localizadas y es aquí, donde el tratamiento quirúrgico que involucre cultivo celular, ofrece una potencial solución a lesiones extensas de vitíligo.¹⁴

El cultivo celular tiene como objetivo lograr a partir de células obtenidas de muestras de tejidos vivos la multiplicación y mantenimiento in vitro de las mismas procurando mantener todas las propiedades que le son características y le permiten su funcionamiento en condiciones fisiológicas.

El cultivo celular se ha empleado con diferentes fines terapéuticos en diversas ramas del campo médico. Para el campo de la dermatología es de gran importancia lograr el cultivo de melanocitos con el fin de usarlos para el tratamiento quirúrgico de los pacientes con vitíligo.

Se han empleado diferentes métodos y medios para el cultivo de melanocitos ya sean solos o acompañados de queratinocitos. La técnica de cultivar células, tiene la ventaja potencial de tratar áreas despigmentadas extensas, expandiendo el número de células, a partir de un fragmento pequeño de piel normalmente pigmentada.¹⁴ Han sido limitados los reportes publicados y los

pacientes tratados con trasplante celular, por lo que la tasa de éxito de estas técnicas de cultivo, no ha sido claramente evaluada.¹⁴

El medio ideal de cultivo es aquel que carezca de compuestos químicos con potencial carcinogénico, de productos obtenidos de animales que sean potencialmente transmisores de agentes patógenos como virus, que sea poco alérgico y además que facilite posteriormente su uso terapéutico por medio de trasplante en el paciente.^{14, 18, 19}

Los medios de cultivo utilizados en los diferentes reportes, son específicos para melanocitos e incluyen sustancias químicas y factores de crecimiento, entre otras; la mayoría de ellos modifican ciertos componentes, pero en general usan técnicas similares. Yu-Fu Chen et al., utilizaron el factor de crecimiento transformante beta (FGTb) como sustituto del promotor tumorigénico TPA, usado en cultivos previos, y junto con la adición de otros agentes, expandieron el número de melanocitos en 10 a 150 veces, durante 2 a 3 pases de cultivo. Además midieron el contenido de melanina celular, en cada pase y en el momento del trasplante y obtuvieron excelentes resultados de repigmentación en pacientes con vitíligo estable.¹⁴

Por otra parte, un grupo del departamento de Dermatología de la Universidad de Navarra – Pamplona, España, desarrollo un cultivo de melanocitos sobre membrana amniótica, obteniendo una única capa de melanocitos puros confirmados con HMB45, resaltando además, las ventajas ofrecidas por este sustrato como la fácil obtención, el bajo costo, las propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y la matriz extracelular rica en colágeno tipos IV, VII, Laminina 1 y 5, sustrato natural en el cual los melanocitos pueden sobrevivir y proliferar, haciéndola idónea para el cultivo y posterior trasplante.²⁰

3. IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Existen diferentes patologías dermatológicas caracterizadas por alteración en la supervivencia y funcionalidad de los melanocitos que clínicamente se manifiestan por defectos pigmentarios de la piel y las faneras, entre ellas el vitíligo. Para el estudio de estas patologías es de vital importancia la identificación de los melanocitos en el tejido afectado, además de verificar la presencia de sus receptores de funcionalidad, convirtiendo esta célula en un blanco terapéutico para el manejo de estas enfermedades.

El cultivo de melanocitos y el estudio de su funcionalidad *ex vivo* es una alternativa de investigación de gran importancia dado su posible uso terapéutico en pacientes con vitíligo. Los estudios reportados en la literatura evidencian aislamiento y expansión de melanocitos *ex vivo* por la identificación de la proteína específica de melanocitos HMB45, pero hasta donde conocemos ningún estudio analiza la presencia de receptores asociados a funcionalidad en diferentes momentos del cultivo que permitan conocer si los melanocitos obtenidos *ex vivo* en cultivos tienen y si pueden perder estos marcadores e incidir sobre la exitosa implantación del injerto en el paciente.

La medición de Melan A y c-KIT sobre melanocitos obtenidos por cultivo en medios selectivos son un valor agregado que refleja la posibilidad de migración y supervivencia del melanocito, la formación de los melanosomas y su transporte y transferencia a las células vecinas en caso de ser trasplantados.

El propósito de la línea de investigación es ofrecer una opción terapéutica mejorada basada en terapia celular avanzada a los pacientes afectados por el vitíligo que no han logrado mejoría con el manejo convencional. Este primer estudio es el abrebocas de una nueva esperanza para estos pacientes.

4. JUSTIFICACIÓN

La terapia celular avanzada consiste en el uso de la capacidad de las células progenitoras y/o madre para la regeneración de los tejidos. Su estudio y aplicación abre infinidad de opciones terapéuticas en diferentes campos de la medicina, con el fin de proporcionar cada vez nuevas y mejores opciones terapéuticas a los pacientes.

La línea de investigación de medicina regenerativa de la Universidad Militar Nueva Granada y el Hospital Militar Central, se basa en la búsqueda de la aplicación de la terapia celular avanzada en las diferentes especialidades médico quirúrgicas, y en el caso particular de dermatología, en ofrecer una opción terapéutica a los pacientes con vitíligo, patología usualmente asintomática pero con gran impacto en la calidad de vida de los que la padecen, afectando aspectos psicológicos, laborales y sociales importantes en la vida del individuo. Actualmente, las alternativas terapéuticas quirúrgicas y exitosas en quienes no han logrado mejoría con el manejo convencional, son escasas, por lo cual, lo que se pretendió con este proyecto fue desarrollar y tipificar las condiciones de cultivo celular de melanocitos en medio selectivo, para obtener melanocitos viables que además expresan receptores de funcionalidad que auguran una mejor implantación en el paciente.

Esto a nivel mundial hasta donde conocemos no ha sido descrito, por lo tanto, sería un estudio pionero en el cultivo de melanocitos funcionales, bajo condiciones óptimas y estandarizadas, que pronostiquen el mejor momento de injerto o implantación en el paciente con vitíligo, quien a futuro se convertirá en el principal beneficiado.

5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL: Caracterizar los receptores asociados a funcionalidad en melanocitos expandidos *ex vivo* en medios selectivos en dos tiempos del cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

5.2.1 Obtener biopsias de piel de adecuada calidad para la obtención de melanocitos vivos.

5.2.2 Obtener y cultivar *in vitro* melanocitos en condiciones óptimas para su utilización clínica.

5.2.3 Identificar por inmunohistoquímica los receptores HMB 45, Melan A y c-Kit, en los melanocitos expandidos por cultivo.

5.2.4 Determinar la funcionalidad de las células, mediante la identificación de los receptores de Melan A y c-Kit, específicos de melanocitos, en dos períodos de tiempo de expansión celular.

5.3 HIPÓTESIS

¿Se expresan los receptores asociados a funcionalidad Melan A y c-Kit en diferentes pases de cultivo de melanocitos obtenidos *ex vivo* en un medio selectivo?

6. METODOLOGÍA

Se realizó una investigación básica cuasi –experimental con desarrollo en el Hospital Militar Central y en Stem Medicina Regenerativa, con participación de la Universidad Militar Nueva Granada.

El tejido obtenido por biopsia fue recolectado en el período comprendido entre el 30 de mayo al 29 de Julio de 2013. Todos los sujetos donadores cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión y participaron de forma voluntaria en el estudio.

El estudio estuvo dividido en tres fases:

1. Toma de biopsia
2. Obtención de melanocitos en medios selectivos y cultivo hasta Segundo Pase.
3. Estudio de receptores de funcionalidad sobre producto celular obtenido.

6.1 FASE 1- TOMA DE BIOPSIA:

La toma de biopsias de piel fue realizada por el residente de dermatología participante en el estudio bajo la supervisión de un docente del servicio. El procedimiento fue llevado a cabo en la sala de procedimientos del servicio de dermatología del Hospital Militar Central bajo estrictas normas de asepsia y antisepsia.

Los individuos sanos de los cuales se tomaron las biopsias firmaron el consentimiento informado previ a explicación detallada del procedimiento y sus complicaciones aprobando así el mismo. Se obtuvieron 15 voluntarios para donación de tejido. El tejido obtenido de los 10 primeros fue usado para la esterilización del cultivo y el de los 5 siguientes se llevó por todas las fases hasta la terminación del estudio.

Las biopsias fueron tomadas de áreas de piel sana no foto expuesta (glúteos o abdomen); a cada individuo se le realizaron 2 biopsias. Estas fueron realizadas bajo anestesia local con lidocaína al 2% más epinefrina 1:200.000 previa antisepsia del sitio seleccionado para la toma de la biopsia con clorhexidina y alcohol. Se tomaron Biopsias con punch número 3,3.5 o 4. No se presentaron complicaciones en ninguna biopsia. Se realizó cierre de piel primario con prolene4/0 en todos los casos y se dio orden de retiro de puntos entre 10 y 15 días posterior al procedimiento.

Se diligencio el formato correspondiente al procedimiento diseñado para este estudio donde se registró con detalle todo lo concerniente al voluntario, sitio de toma de la biopsia, complicaciones durante su toma y calidad del tejido obtenido.

El tejido obtenido fue tipificado en cuanto a sus características macroscópicas para definir si era de buena calidad para el cultivo y posteriormente 1 de las biopsias fue conservada en formol al 10% y se dirigió al servicio de patología del Hospital Militar Central donde se procesó para tinción Hematoxilina – eosina e inmunohistoquímica para los marcadores HMB45, C- Kit y Melan A.

En las láminas con tinción de hematoxilina y eosina sobre tejido se evaluó el número de melanocitos presentes por mm^2 , evaluando 5 campos de 40X y promediando el número de melanocitos observados. Las tinciones de inmunohistoquímica se realizaron sobre el tejido solo para verificar su positividad.

El tejido obtenido de la segunda biopsia se llevó a conservación en solución salina con 1% de antibiótico (Penicilina, Estreptomina y Anfotericina) para posterior procesamiento de Obtención y cultivo de melanocitos. Este tejido fue transportado de manera inmediata a Stem Cell Medicina Regenerativa

6.2 FASE 2- OBTENCIÓN DE MELANOCITOS EN MEDIOS SELECTIVOS Y CULTIVO EN 2 PERÍODOS DE TIEMPO

Esta fase a su vez se dividió en 2 etapas:

Obtención de los Melanocitos: Una vez comprobados los datos y el tamaño adecuado de la biopsia, se realizó un lavado con solución salina estéril, se eliminó el exceso de tejido celular subcutáneo en cada muestra de tejido de ser necesario y posteriormente se realizó disociación enzimática durante 6 a 7 horas con Dispasa II. Una vez completado este tiempo de disociación se llevó a cabo la disociación mecánica en la cual se separó la epidermis de la dermis. Una vez separada la epidermis, ésta fue posicionada en una caja de Petri se realizó disociación Tryple Select durante 10 minutos y raspado de la cara interna de la misma en búsqueda de obtención de la mayor cantidad de melanocitos posible. Se realiza centrifugación a 1200rpm para obtener el botón celular.

Cultivo Celular: Una vez obtenido el botón celular se realizó el cultivo en caja de 12 pozos con medio selectivo para melanocitos – Medio 245 (Gibco®) e incubadas a 37°C y 5% CO₂. Se realizó lavado con buffer fosfato salino (Gibco®) y cambio de medio cada 2 a 3 días hasta que se alcanzó un 80 a 90 % de confluencia. En ese momento se realizó disociación con Tryple Select por 7 min y centrifugación a 1200 rpm por 10min para la obtención de las células. Se realizó conteo celular en cámara de Newbauer y luego fueron separadas en dos partes iguales; 1 de ellas se sembró en caja t 25 y con la otra mitad se realizaron los extendidos sobre las láminas cargadas para fijación e inmunohistoquímica de los marcadores ya mencionados y posterior lectura por el patólogo.

Los nuevos cultivos fueron sometidos al mismo procedimiento antes descrito con las mismas condiciones de temperatura y concentración de CO₂ hasta alcanzar de nuevo un 80 a 90% de confluencia, fue allí entonces que se realizó un nuevo conteo en Cámara de Newbauer y nuevos extendidos en láminas cargadas para la lectura de los mismos receptores en estas células que correspondían al segundo pase.

6.3 FASE 3 – ESTUDIO DE VIABILIDAD Y RECEPTORES DE FUNCIONALIDAD SOBRE PRODUCTO CELULAR OBTENIDO

Las láminas con los extendidos celulares ya fijadas del primer pase y segundo pase fueron llevadas al Servicio de patología del Hospital Militar Central donde se realizaron las tinciones de inmunohistoquímica para los marcadores de superficie HMB45, C- Kit y Melan A.

Se hizo la lectura de las mismas por parte del patólogo y la residente de dermatología vinculados con el estudio. La lectura de positividad de los receptores de membrana fue expresada en porcentaje; este obtenido considerando como 100% la sumatoria total de células observadas en 10 campos en cada lamina y de estas cuantas células eran positivas para la tinción estudio.

.7. PLAN DE ANÁLISIS

7.1 PLAN DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN:

Se obtuvieron los datos de las diferentes variables, mediante el formato diseñado para el correspondiente procedimiento y el registro de seguimiento de células en cultivo. Los resultados fueron así tabulados y almacenados con su posterior análisis.

7.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se describieron los resultados de las variables con mínimas, máximas y medias y se hizo una correlación de análisis del aumento de expresión de los receptores en cada fase del cultivo expresando la positividad y el aumento en porcentajes. .

El análisis estadístico se realizará mediante el programa estadístico SPSS 15.0.

8. ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio se rige por las normas de Colombia para investigación en el Decreto 8430 de 1993 y por las normas de la Declaración de Helsinki y del Reporte Belmont respetando los derechos de las personas y pacientes en investigación, bajo los criterios de respeto, beneficencia y justicia. El cultivo de células vivas fue cuidadosamente vigilado de acuerdo a las normas para el manejo de células madre de la Asociación Médica Mundial.

Es un estudio básico cuasi experimental, de riesgo mínimo, donde no se realizó ninguna modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participaron.

Se realizó un procedimiento mínimamente invasivo para la obtención de una biopsia de piel de 4 mm de diámetro en los voluntarios, previo consentimiento libre e informado, basado en una información adecuada, relacionada con los riesgos del mismo, dentro de los cuales se incluyen la cicatrización, el dolor y la infección como principales, no atentando estos contra la vida, salud, dignidad, integridad ni intimidad del individuo.

9. RESULTADOS

9.1 FASE 1: TOMA DE BIOPSIA:

Se obtuvieron 15 biopsias de individuos sanos que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión y que aceptaron libremente su participación en el estudio mediante firma del consentimiento informado. Las 10 primeras biopsias fueron usadas para la estandarización del cultivo. Con las 5 últimas se realizó el estudio llevándolas a confluencia de 80% en el segundo pase con crecimiento exitoso de melanocitos *ex vivo*.

Los individuos correspondieron a 5 hombres entre los 22 y 33 años (media 26.8 años). Solo se obtuvieron voluntarios con fototipos II, III Y IV. Todas las biopsias obtenidas fueron adecuadas y no se presentaron complicaciones durante la toma en ningún caso. Ningún individuo voluntario presentó infección del sitio de toma de la biopsia ni alteraciones en la cicatrización. (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Variables medidas en el donador de tejido:

INDIVIDUO	EDAD (Años)	GENERO	FOTOTIPO DE PIEL	SITIO DE LA BIOPSIA
JMY	30	Masculino	II	Glúteo
JMT	22	Masculino	III	Glúteo
NT	33	Masculino	IV	Glúteo
AT	27	Masculino	IV	Glúteo
FM	22	Masculino	IV	Glúteo

Tabla 2. Variables medidas en el espécimen de tejido:

INDIVIDUO	DIAMETRO (mm)	ESPESOR (mm)	MACERACION
JMY	4	6	No
JMT	3	5	No
NT	4	6	No
AT	4	6	No
FM	4	6	No

9.2 FASE 2: OBTENCIÓN DE MELANOCITOS EN MEDIOS SELECTIVOS Y CULTIVO EN 2 PERÍODOS DE TIEMPO

El tejido obtenido de los individuos fue sometido al proceso de obtención de melanocitos antes descrito. La media de tiempo para lograr la confluencia de 80 a 90% en el primer pase fue de 35 días y para el segundo pase fue de 51.2 días. (Tabla 3)

La media de número de melanocitos obtenidos por cultivo en el primer pase fue de 233.000 células y para el segundo pase fue de 553.000 células. (Tabla 4).

Tabla 3. Días en los que se alcanzó confluencia de 80 a 90% para pase 1 y 2.

INDIVIDUO	BIOPSIA DE PIEL	PRIMER PASE	SEGUNDO PASE
JMY	Día 0	Día 47	Día 59
JMT	Día 0	Día 15	Día 27
NT	Día 0	Día 29	Día 43
AT	Día 0	Día 42	Día 75
FM	Día 0	Día 42	Día 52

Tabla 4. Células obtenidas en pase 1 y 2 – Conteo cámara de Newbauer.

INDIVIDUO	CELULAS OBTENIDAS 1 PASE	CELULAS OBTENIDAS 2 PASE
JMY	10.000	80.000
JMT	840.000	1.305.000
NT	95.000	935.000
AT	80.000	275.000
FM	140.000	170.000

9.3 FASE 3 – ESTUDIO DE VIABILIDAD Y RECEPTORES DE FUNCIONALIDAD SOBRE PRODUCTO CELULAR OBTENIDO

En el servicio de patología del Hospital Militar Central se realizó la lectura de las láminas de la biopsia conservada en formol a la cual se realizó tinción de hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica HMB45, MELAN A y C- Kit además de las láminas con los extendidos celulares obtenidos del cultivo tanto para el primer pase como para el segundo con tinción de inmunohistoquímica para los mismos marcadores.

La media de melanocitos observados por mm² con hematoxilina y eosina (HE) en tejido fue de 6.4. (Tabla 5).

Tabla 5. Numero de melanocitos observados por mm² en tejido con tinción HE

INDIVIDUO	NUMERO DE MELANOCITOS HE
JMY	5 melanocitos/mm ²
JMT	6 melanocitos/mm ²
NT	6 melanocitos/mm ²
AT	7 melanocitos/mm ²
FM	8 melanocitos/mm ²

La media de expresión del receptor HMB45 en el primer pase fue de 9%, para Melan – A 30%, para c- Kit 9%. (Tabla 6) En el segundo pase la expresión de HM45 fue de 62%, para Melan A de 81% y para c- Kit de 37%. (Tabla 7).

Tabla 6. Expresión de receptores HMB45, Melan A y c- Kit en el primer pase

INDIVIDUO	HMB45 1 PASE	C-KIT 1 PASE	MELAN A 1 PASE
JMY	10%	0%	16%
JMT	20%	15%	70%
NT	0%	0%	18%
AT	15%	30%	16%
FM	0%	0%	30%

Tabla 7. Expresión de receptores HMB45, Melan A y c- Kit en el segundo pase

INDIVIDUO	HMB45 2 PASE	C-KIT 2 PASE	MELAN A 2 PASE
JMY	64%	3%	68%
JMT	70%	80%	90%
NT	75%	30%	93%
AT	70%	30%	91%
FM	30%	40%	62%

Es evidente así el aumento del porcentaje de expresión de los receptores de funcionalidad entre el primer y segundo pase con un aumento entre el 30% y el 75% (media 53%) para HMB45, Entre el 20% y el 75% (media 51%) para Melan A y entre el 0% y el 65% (media 28%) para c- Kit. (Tablas 8, 9 y 10.) Durante el estudio además se observó que en el segundo pase el botón celular obtenido antes del conteo en cámara era más café a diferencia del primer pase lo sugiere producción melanica.

Tabla 8. Aumento de expresión de receptor HMB45 entre primer y segundo pase

RECEPTOR ESTUDIADO	Pase 1	Pase 2	Incremento entre Pase 1 y 2
HMB45 Min	0%	30%	30%
Media	9%	62%	53%
Máx	20%	75%	75%

Tabla 9. Aumento de expresión de receptor Melan A entre primer y segundo pase

RECEPTOR ESTUDIADO	Pase 1	Pase 2	Incremento entre Pase 1 y 2
Melan - A Min	16%	62%	20%
Media	30%	81%	51%
Máx	70%	93%	75%

Tabla 10. Aumento de expresión de receptor c- Kit entre primer y segundo pase

RECEPTOR ESTUDIADO		Pase 1	Pase 2	Incremento entre Pase 1 y 2
c - Kit	Min	0%	3%	0%
	Media	9%	37%	28%
	Máx	30%	80%	65%

10. DISCUSION

Las técnicas quirúrgicas son una gran opción para los pacientes con vitiligo que no han respondido al tratamiento médico¹⁴. Dentro de las opciones de manejo quirúrgico se encuentra el trasplante de melanocitos cultivados *ex vivo*. Esta técnica ya ha sido utilizada previamente y se ha encontrado efectiva como tratamiento¹⁷.

La importancia de esta opción terapéutica radica en la posibilidad de tratar grandes áreas con melanocitos cultivados dada la obtención de un gran número de células por expansión a partir de una pequeña porción de tejido¹⁴.

Lograr un cultivo celular de melanocitos autólogo permite además la crio conservación del producto celular obtenido que puede ser utilizado en el paciente en cualquier momento y en varias ocasiones.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que es posible desarrollar y tipificar las condiciones de cultivo celular de melanocitos en medio selectivo y obtener melanocitos viables para implantación como opción terapéutica en pacientes con vitiligo.

Hasta donde conocemos ningún estudio analiza la presencia de receptores asociados a funcionalidad en diferentes momentos del cultivo que permitieran conocer si en durante el proceso de cultivo se podían perder estos marcadores e incidir sobre la implantación del injerto en el paciente. Este estudio es pionero en la caracterización de receptores asociados a funcionalidad en melanocitos expandidos *ex vivo* en diferentes tiempos del cultivo.

Nuestros hallazgos evidencian que durante los pases no se pierden los receptores medidos asociados a funcionalidad sino que por el contrario se fortalecen. Esto se hace claro observando que la expresión de los receptores de funcionalidad aumenta en el segundo pase. Esto sumado a la observación cualitativa de pigmento en el botón celular del segundo pase nos lleva a pensar que es en este momento cuando tenemos un melanocito más maduro; un melanocito idóneo para el trasplante al encontrarse más apto para su adaptación *in vivo*.

Continuar con estudios enfocados a la obtención de productos celulares es de gran importancia para avanzar en el campo médico y ofrecer nuevas, seguras y eficientes posibilidades de tratamiento a los pacientes.

El entrenamiento médico en cultivo celular avanzado es de vital importancia pues en este campo aún falta mucho por explorar y su conocimiento nos dará nuevas herramientas para ayudar a los pacientes.

11. CONCLUSION

La terapia celular avanzada con cultivo de melanocitos abre la puerta a una alternativa terapéutica con condiciones óptimas para obtener melanocitos viables y funcionales. Melanocitos cultivados en los cuales se conoce el momento ideal para su exitosa implantación en áreas despigmentadas en pacientes con vitiligo que han sido resistentes a los tratamientos médicos convencionales, siendo así una esperanza en camino para mejorar al fin la calidad de vida de estos pacientes.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Min Li, Carlos D. Urmacher. Normal Skin. En: Mills Stacey. Histology for Pathologists. 3th ed. Lippincott Williams Wilkins; 2006. p. 5-53.
2. Schiaffino Maria Vittoria. Review Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. Int J Biochem Cell Biol .2010; 42:1094–1104.
3. Prota G, D' Ischia M, Napolitano A. The chemistry of melanins and related metabolites. En: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA,. The pigmentary system. 2nd ed. Blackwell Publishing. 2006; 307–32.
4. King RA, Hearing VJ, Creel DJ, Oetting WS. Albinism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill, Inc.; 1995. p. 4353–92.
5. Graw J. The genetic and molecular basis of congenital eye defects. Nat Rev Genet 2003; 4: 876–88.
6. A.V Anstey. Disorder of skin color. En: Burns Tony, Breathnach Stephen, Cox Neil, Griffiths Christopher. Rook's Text Book of Dermatology. 8a ed. Wiley- Blackwell 2010: P.58.1-58
7. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature.2007;50: 445:843.
8. Wolff, Goldsmith, Katz, Gilchrest; Paller, Leffell. Dermatología en Medicina General Editorial Médica Panamericana, 7^a ed. Colombia 2009. p.591-640
9. Eipper Betty A, Mains Richard E. Structure and biosynthesis of proadrenocorticotropin /endorphin and related peptides. Endocr Rev 1980; 1:1–27.
10. Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. Genes Dev 2000; 14:1712–28.
11. Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. Annu Rev Genet 2004; 38:365–411.
12. Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia associated transcription factor target genes. Pigment Cell Melanoma Res. 2009; 23: 27- 40.
13. C I Vera y M C Díaz. Vitiligo, con énfasis en su variante inflamatoria. Rev Argent Dermatol 2009; 90: 72-84.

14. Chen Yu-Fu, MD, Yang Pei-Yu, Hu Dan-Ning, Kuo Feng-Sheng, Hung Cheng-Sheng, Chih-Ming. Treatment of vitiligo by transplantation of cultured pure melanocyte suspension: Analysis of 120 cases. *Jam Acad Dermatol*. 2004; 51: 68-74.
15. Hong Liang Tey. A Practical Classification of Childhood Hypopigmentation Disorders. *Acta Derm Venereol* 2010; 90: 6–11
16. Eves Paula Clare, Beck Alison J., Shard Alex G., Mac Neil Sheila. A chemically defined surface for the co-culture of melanocytes and keratinocytes. *Biomaterials*. 2005; 26, 7068–7081.
17. Falabella Rafael. Surgical Approaches for Stable Vitiligo. *Dermatol Surg Dermatol Surg* 2005; 31:1277–1284.
18. Van Geel N, Ongenae K, Naeyaert JM. Surgical techniques for vitiligo: a review. *Dermatology* 2001; 202:162-6.
19. Njoo MD, Westerhof W, Bos JD, Bossuyt PMM. A systemic review of autologous transplantation methods in vitiligo. *Arch Dermatol* 1998; 134:1543-9.
20. P. Redondo, J. del Olmo, M. Garcia-Guzman, L. Guembe, F. Prósper. Repigmentation of vitiligo by transplantation of autologous melanocyte cells cultured on amniotic membrane. *British Journal of Dermatology* 2008; 158:1134–1173.
21. Ordóñez Nelson G. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: a review and update. *Hum Pathol*. 2013. Forthcoming