

REVISION

REVISTA ARGENTINA DE DERMATOLOGÍA

Propiedad de la Asociación Argentina de Dermatología

ISSN 1851-300X | Número de Propiedad Intelectual 20459734

Aislamiento, cultivo y aplicación clínica de los melanocitos humanos. Los melanocitos como una fuente de terapia celular

AISOLATION, CULTURE AND CLINICAL APPLICATION OF HUMAN MELANOCYTES. MELANOCYTES AS A SOURCE OF CELL THERAPY



Abr - Jun 2014 | Vol. 95 N°2

Revisión

Rev. argent. dermatol. 2014; 95 (2): 1 – 11.

Publicado en línea 2014, Junio/ Published online June 2014.

Aislamiento, cultivo y aplicación clínica de los melanocitos humanos. Los melanocitos como una fuente de terapia celular

Autores | Contacto

A Almodóvar Real*, J Sánchez López*, ML Porriño Bustamante*, A Molina Leyva* y V Carriel**,***

*Unidad de Gestión Clínica de Dermatología. Hospital Universitario San Cecilio. Granada. España.

**Departamento de Histología (Grupo de Ingeniería Tisular). Universidad de Granada. España.

***Department of Basic Medical Sciences. Faculty of Medicine. Ghent University. Ghent. Belgium.

Correspondencia:

Dr. Víctor Carriel Araya.

Av. Madrid nº 11. Departamento de Histología (Grupo de Ingeniería Tisular). Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Granada CP 18012. Granada. España.

E-mail: vcarriel@ugr.es

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido: 23-01-2014

Aceptado para su publicación: 14-04-2014

RESUMEN

El vitiligo es una enfermedad pigmentaria cutánea adquirida e idiopática, debido a múltiples factores causales que ocasionan la destrucción o inactivación funcional del melanocito. Ha habido numerosas alternativas terapéuticas a lo largo de los años como: tratamientos tópicos, PUVA (psoralenos más luz ultravioleta) o fototerapia UVB de banda estrecha; sin embargo, muchos no responden a estos tratamientos médicos. El tratamiento quirúrgico del vitiligo se indica cuando las máculas hipo o amelanóticas, se localizan en zonas mal respondedoras o tras fracaso de los tratamientos convencionales. Se trata de favorecer la re-pigmentación de las lesiones, a través del trasplante de melanocitos desde las áreas pigmentadas normales. El objetivo de esta revisión, es el de analizar el estado actual del tratamiento quirúrgico del vitiligo y en concreto, del trasplante de melanocitos autólogos.

PALABRAS CLAVES

Vitiligo; Trasplante de melanocitos; Tratamiento quirúrgico; Injertos celulares; Cultivos autólogos.

SUMMARY

Vitiligo is an idiopathic and acquired disorder that affects the pigmentation of the skin due to several factors that cause the destruction of melanocytes. There are numerous therapeutic alternatives, topical treatments, PUVA or narrowband UVB phototherapy. However, many patients do not respond to these medical treatments. Surgical treatment of vitiligo is indicated when depigmented macules are located in poorly responsive or after failure of conventional treatments. It seeks to encourage repigmentation of lesions by transplantation of melanocytes from normal pigmented areas. The objective of this review is to analyze surgical treatment of vitiligo and especially autologous melanocyte transplantation.

KEY WORDS

Vitiligo; Melanocytes transplantation; Surgical treatment; Cellular grafting; Autologous cultures.

INTRODUCCIÓN

Los melanocitos son células especializadas en la producción de melanina, el principal pigmento responsable de la coloración de la piel, los ojos y el pelo. Son críticos en la respuesta frente a los rayos ultravioleta, protegiendo a las células de la piel de un potencial daño al ADN. Se originan en la etapa embrionaria a partir de la cresta neural, al igual que las neuronas y células de la glía del sistema nervioso periférico, células endócrinas de las glándulas adrenales y tiroideas y células mesenquimales, que forman cartílagos cráneo-faciales, huesos, dermis, tejido adiposo y células del músculo liso¹.

La ausencia de los melanocitos es un fenómeno característico de ciertas patologías, tal es el caso del vitiligo y otras leucodermias como el piebaldismo. La falta de melanina en la epidermis, disminuye la protección frente a las radiaciones ultravioletas. Además, debido a un problema estético supone un gran estrés psicológico, para los pacientes que las padecen. Son múltiples las opciones terapéuticas que existen. Actualmente el trasplante de melanocitos autólogos se ha demostrado eficaz, para el tratamiento quirúrgico del vitiligo estable².

El objetivo del trabajo es dar una visión general de la literatura, en relación con los resultados y avances en el procedimiento técnico de obtención de melanocitos, su cultivo y posterior trasplante para el tratamiento de pacientes con leucodermias.

SÍNTESIS

▪ OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE MELANOCITOS

Los melanocitos son elementos fundamentales de la epidermis y un constituyente normal de los folículos pilosos; por lo tanto, estas células pueden ser obtenidas a partir de ambos sustratos.

1.a) Fuentes de obtención:

– PIEL AUTÓLOGA: es la fuente de obtención más utilizada, debido a la fácil accesibilidad que ofrece y evita el riesgo de rechazo. Andreassi y col³, extrajeron láminas de piel autóloga con un dermatomo eléctrico; método similar fue empleado por Pianigiani y col⁴.

Czajkowski⁵, también extraía melanocitos de la piel del propio paciente, utilizando una máquina eléctrica de succión de vacío, para formar ampollas. El techo de las mismas era retirado con unas tijeras y se enviaba a cultivo para obtener las células. Este método fue rápidamente utilizado por otros autores^{6,7}.

– DE LOS FOLÍCULOS PILOSOS: Dieckmann y col⁸, describieron la técnica basada en el aislamiento y cultivo de melanocitos foliculares humanos, a partir de explantes de folículos pilosos depilados. Esta técnica no requiere ninguna intervención quirúrgica, permite el aislamiento y el cultivo de melanocitos foliculares, con una cantidad pequeña de materia prima.

En relación con los melanocitos foliculares se ha demostrado que existen dos tipos: los melanocitos pigmentados del infundíbulo y el bulbo y los melanocitos amelanóticos, situados en la vaina radicular externa de los folículos de cabellos pequeños y medianos. Estos últimos son los responsables del pigmento del cabello. Además, sirven como reservorio de repoblación de los melanocitos epidérmicos durante la re-epitelización, después de la pérdida de la epidermis y de la re-pigmentación en el vitiligo. Como un tejido de fácil acceso, los folículos pilosos son una atractiva fuente de células madre, para la utilización en la medicina regenerativa, por ejemplo: terapias celulares en el tratamiento de víctimas de quemaduras o pacientes con vitiligo, así como la

promoción de la cicatrización de las úlceras crónicas de miembros inferiores ⁹.

Se ha intentado mejorar la técnica anterior con la introducción de un nuevo medio de cultivo, que condujo a un mayor rendimiento, más rápida diferenciación de melanocitos y una mayor pureza del cultivo ¹⁰.

1.b) Células madre:

Clewes y col ¹¹, describen el aislamiento, caracterización y la expansión ex vivo de las células madre de la cresta neural (HEPI-NCSC) y los protocolos para su diferenciación hacia osteocitos y melanocitos. Las HEPI-NCSC son células madre multipotentes con capacidad de auto-renovación, que persisten en los folículos pilosos, en la edad adulta. Son de fácil accesibilidad y pueden someterse a expansión ex vivo y diferenciación, dirigida a otras estirpes celulares. Son propicias para el trasplante autólogo, evitando el rechazo del injerto. De ahí su potencial para ser empleadas en terapias celulares y medicina regenerativa.

Recientemente, Zhou y col ¹² han publicado su estudio, en relación al papel de las células madre dérmicas mesenquimales (DMSCs), sobre la actividad de los linfocitos T CD8+. Se confirmó el perfil de DMSCs por citometría de flujo, ya que, estas células eran uniformemente positivas para CD44, CD73, CD90, CD105 y negativa para CD11b, CD19, CD34, CD45. Por otra parte, se ha observado que las células T CD8 + en la zona perilesional, de pacientes con vitiligo sometidos a trasplante de melanocitos, disminuyen la respuesta de los mismos. Las DMSCs inhiben su proliferación, inducen su apoptosis y regulan las citoquinas / quimiocinas que producen. Estos autores abogan por emplear estas células como agente auxiliar, en el trasplante de los melanocitos y así mejorar su efectividad.

1.c) Factores de crecimiento:

El protocolo utilizado para llevar a cabo el cultivo de los melanocitos es clave en el éxito del trasplante posterior.

Los melanocitos son células que se caracterizan por su lenta proliferación, de hecho bajo condiciones in vitro, se requieren al menos dos mitógenos que actúen en forma sinérgica para que proliferen; por ejemplo: factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de hepatocitos / factor de células madre, la endotelina-1, 12 – O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) la toxina del cólera y 3-isobutil-1-metilxantina.

Eisinger y Marko ¹³, fueron los primeros en utilizar 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) y la toxina del cólera en el cultivo de los melanocitos.

La mayoría de los medios de cultivo utilizados para objetivos clínicos, contienen suero bovino fetal. Actualmente, se aboga por la sustitución de medios de cultivo por solución salina tamponada con fosfato (PBS) o sustitución del suero bovino como un agente neutralizante para la tripsina, por el inhibidor de tripsina de soja derivada de suero humano autólogo ².

Tras la obtención de la muestra de piel, se introduce en PBS y se añade tripsina más solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para separar la epidermis de dermis. La epidermis se corta en pequeñas piezas y se centrifuga. El sobrenadante se descarta y el sedimento celular se resuspende y se cultiva.

Como hemos señalado anteriormente, en el medio de cultivo de los melanocitos existe una alta concentración de factores de crecimiento, aumento de la biosíntesis de melanina y rápida progresión del ciclo celular, lo que puede conducir al daño material genético y al inicio de la transformación maligna de melanocitos, en condiciones de cultivo celular. Las mutaciones de los genes de las vías de señalización RAS / RAF / MEK / ERK y CDKN2A, a menudo se encuentran en las primeras etapas del desarrollo del melanoma. El TPA se considera que es un factor oncogénico, pero no hay pruebas que

sea responsable de la iniciación de la melanogénesis. Czajkowski¹⁴, evaluó el riesgo del desarrollo de mutaciones en los genes seleccionados de la vía de señalización RAS / RAF / MEK / ERK y el gen CDKN2A, durante el cultivo de melanocitos en diversos medios de crecimiento, concluyendo que las altas concentraciones de TPA, así como el factor de crecimiento básico de los fibroblastos, factor de células madre y hormona estimulante de los melanocitos, no producen daño en los mismos. No obstante, continúan las investigaciones en este campo. Yarani y col¹⁵, aportan otro nuevo procedimiento para el aislamiento de células epidérmicas. Sustituyen la colagenasa en la obtención de las células epidérmicas, por la actividad proteolítica de la actidina de la fruta de kiwi y para la expansión de la población selectiva de los melanocitos, evita el uso de ésteres de forbol y la toxina del cólera, utilizando un medio de crecimiento con factor inhibidor de la leucemia (LIF) y la forskolina.

▪ EVALUACIÓN DE CONTROL DE CALIDAD DE LOS MODELOS DE MELANOCITOS IN VITRO

Los melanocitos, constituyen un componente menor de la población de células en la epidermis normal. En estudios in vitro de melanocitos, se han tenido que superar numerosas dificultades, como la falta de un buen tejido de origen que los contenga en abundancia, su lenta tasa de replicación y la presencia de células como queratinocitos y fibroblastos, que crecen más rápido que ellos¹³.

2.a) Histología:

Los melanocitos son células dendríticas que derivan de la cresta neural. La formación de la cresta neural y la migración de sus células, comienzan alrededor de las seis semanas en los embriones humanos. Los precursores de los melanocitos migran a varios destinos como: el iris, coroides, el oído interno, la dermis y la epidermis, al igual, que en la región del bulbo en los folículos pilosos en desarrollo, donde persisten como células madre (stem) con capacidad de auto-renovación⁸. En la epidermis, se localizan en el estrato basal y sus procesos dendríticos se extienden en todas las direcciones.

En las preparaciones con hematoxilina y eosina, los melanocitos están compuestos por núcleos elongados u ovoides y rodeados de un citoplasma de color claro. Habitualmente son más pequeños que los queratinocitos que los rodean.

La melanina es sintetizada a partir de la tirosina por la enzima tirosinasa. Los melanosomas con su contenido de melanina, una vez formados son transferidos a los queratinocitos circundantes y a las células foliculares del pelo, mediante un mecanismo de fagocitosis. El número de melanocitos en la piel normal es igual en todas las razas, por lo tanto, el color de la piel es determinado por el número y el tamaño de los melanosomas.

La melanina puede demostrarse mediante diversas reacciones histoquímicas. Las más usadas están basadas en su poder reductor, así, en el método de Fontana-Masson-Picrosirius la melanina reduce el nitrato de plata, que se precipita sobre los gránulos del pigmento dando un precipitado negro insoluble¹⁶.

Otro método se basa en la capacidad del melanocito de sintetizar melanina, a partir de tirosina o dopa. En la reacción positiva de dopa se aporta esta sustancia y el tejido se pigmenta ostensiblemente. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, los melanocitos expresan la proteína S100, la que puede ser detectada en varios tipos celulares (células de Langerhans, células de Schwann, células de las glándulas ecrinas y apócrinas). Otros marcadores inmunohistoquímicos para la identificación de los melanocitos, son los anticuerpos monoclonales Melan A/MART-1 y el antígeno HMB-45.

En el vitiligo lo que ocurre es un descenso en el número de melanocitos. En el albinismo se

manifiesta a través de un defecto en la síntesis de la melanina, pero el número de melanocitos es normal.

▪ APLICACIONES CLÍNICAS EN HUMANOS Y TIPOS DE TRASPLANTE

Leucodermia es un término que se utiliza para los trastornos, en los que la piel se vuelve blanca en algunas zonas, debido a la falta de melanina en la epidermis. El piebaldismo y el vitiligo son los más representativos. El vitiligo es una enfermedad adquirida de etiología incierta, que afecta aproximadamente al 0,1%-2,0% de la población mundial. Su tratamiento etiológico no está disponible, por lo que las distintas terapias están dirigidas a detener la progresión y lograr la re-pigmentación, en la medida de lo posible.

En los pacientes con leucodermia estable cuando la terapia médica falla o afecta áreas como: labios, genitales, párpados y las extremidades distales que se sabe responden mal, los métodos quirúrgicos pueden ser opciones terapéuticas alternativas ¹⁷.

El tratamiento quirúrgico del vitiligo se introdujo en la década de 1960, con la demostración que la epidermis autóloga podía ser aplicada con éxito sobre la piel no pigmentada, trabajando como una fuente de melanocitos sanos para la re-pigmentación de esas áreas acromáticas ³. Las técnicas se basan en trasplantar melanocitos autólogos, a partir de una piel de donante pigmentada normal, al área despigmentada.

Los criterios que deben cumplir para poder ser sometidos a tratamiento quirúrgico son: vitiligo estable al menos dos años y presentar unas lesiones refractarias a tratamiento médico, sin historial de cicatrices hipertróficas ni signos del fenómeno de Köebner.

Son muchas las técnicas quirúrgicas que se han diseñado en los últimos años para re-pigmentar el vitiligo. Se pueden dividir en injertos tisulares e injertos celulares. Previo a cualquiera de las técnicas la zona receptora debe ser preparada.

3.a) Técnicas utilizadas para preparar el área receptora del implante:

Son conocidos diversos métodos para la preparación sitio receptor, con anterioridad al tratamiento quirúrgico. El objetivo de todos ellos es el de deepitelizar la zona receptora, separar la epidermis de la dermis, para asegurar condiciones óptimas de crecimiento de los melanocitos trasplantados. La deepitelización del área receptora del injerto, se puede lograr mediante la crioterapia, la inducción de ampollas de succión o dermoabrasión utilizando un dermabrader de alta velocidad. Sin embargo, para las áreas anatómicas más delicadas o críticas (por ejemplo, los párpados) y en las lesiones irregulares o manchas, la abrasión con láser puede ser una mejor alternativa. Algunos autores concluyen que la re-pigmentación de la zona inducida con ampollas de succión, es mejor que la tratada con CO2 láser ⁷. No obstante, la técnica preferida para la zona receptora depende de la elección del cirujano.

3.b) Técnicas quirúrgicas con injertos tisulares:

Los injertos de tejido incluyen injertos dermo-epidérmicos de espesor parcial, injertos de espesor total e injerto epidérmico por succión. Con estos injertos tisulares, sólo una zona limitada de superficie puede ser tratada por sesión.

– **INJERTO DE ESPESOR PARCIAL:** los injertos se obtienen de la zona receptora con un dermatomo y se coloca sobre la zona receptora previamente denudada. No es posible cubrir áreas como las palmas, plantas o los pliegues del cuerpo, pero es útil para cubrir múltiples lesiones y grandes áreas a la vez.

– **INJERTO DE ESPESOR TOTAL:** se preparan tras anestesia local, las áreas receptoras con un punch de 1.5, 2.0 o 2.5 mm. Se tomarán 0,5 mm mayor en diámetro que el lugar destinatario, ya que, el injerto tiende a retraerse. El exceso de tejido adiposo se corta. La propagación del pigmento se inicia gradualmente y puede ser facilitada, mediante la exposición del área tratada a la luz del sol o UVA. Si los injertos no se recortan correctamente, puede quedar un grosor desigual. No requiere ningún equipo especial o configuración de laboratorio y da muy buenos resultados en las palmas y las plantas.

– **INJERTO DE AMPOLLA EPIDÉRMICO:** consiste en el trasplante de epidermis que ha sido obtenida de burbujas de succión. Se emplea una máquina eléctrica de succión de vacío, que crea una presión negativa de 300 a 400 mm Hg. Esto se aplica a la superficie del área seleccionada normo pigmentada. El techo de las ampollas es retirado con unas tijeras. El injerto se coloca en la zona receptora, previamente desepitelizada⁵. Requiere mucho tiempo y no sirve para zonas extensas, palmas ni plantas, pero tiene excelentes resultados cosméticos en cara, párpados o labios y es eficaz en zonas con leucotriquia.

– **MICROINJERTO:** se trata de una nueva técnica de injerto de melanocitos, utilizando micro injertos implantados por una técnica de punción¹⁸.

3.c) Técnicas quirúrgicas con injertos celulares con o sin cultivo de células:

En el trasplante celular, las células se extraen de una piel no afectada o el cabello y se trasplanta.

Los injertos celulares incluyen suspensiones de células epidérmicas no cultivadas (mezcla de melanocitos y queratinocitos), trasplante de melanocitos puros cultivados, trasplante de melanocitos-queratinocitos cultivados o el trasplante de melanocitos no cultivado, obtenidos de la vaina externa del folículo piloso¹⁹.

La principal ventaja de estas técnicas de suspensión y cultivo, es que permiten el tratamiento de piel afectada de mayor tamaño que la zona donante.

Czajkowski⁵, publicó una amplia comparación de los distintos tipos de trasplante de melanocitos, en el tratamiento del vitiligo.

– **INJERTO CELULAR EPIDÉRMICO NO CULTIVADO – Suspensión de células epidérmicas autólogas (melanocitos y queratinocitos):**

Con esta técnica se utiliza una suspensión celular sin tener que realizar cultivo previo. El trasplante de suspensión de queratinocitos y melanocitos es una técnica económica, fácil, que se puede utilizar en áreas resistentes de vitiligo estable y que puede ser completado en varias horas de forma ambulatoria.

Van Geel y col¹⁷, realizan una revisión de toda la literatura respecto de este tema.

Muchos informes han sido publicados desde su introducción en 1992, por Gauthier y Surleve-Bazeille. Un factor limitante crucial de esta técnica de injerto, era la fijación de la suspensión líquida en la zona receptora. Para superar este problema, se introdujo ácido hialurónico como un portador celular biodegradable, a efectos de aumentar la viscosidad de la suspensión inyectable²⁰.

Los tipos de re-pigmentación varían ampliamente dentro de las diferentes publicaciones (>75% de re pigmentación en 27-100% de los pacientes). Los resultados tienden a ser mejores en la cara, tronco y extremidades proximales y peores en codos, rodillas y extremidades distales, dedos y los labios.

Una limitación frecuentemente reportada, es la falta de coincidencia del color entre la zona tratada y la piel circundante. Sin embargo, este desajuste del color no era inquietante, según la mayoría de estos pacientes.

– TRASPLANTE DE MELANOCITOS CULTIVADOS AUTÓLOGOS:

El trasplante de melanocitos autólogos, tiene una serie de ventajas sobre la técnica de injerto tisular y es, que logra aumentar el número de células considerablemente, por lo que pueden tratar una mayor zona receptora con una zona donante más pequeña respecto del cultivo, ya que, melanocitos y queratinocitos consumen mucho menos medio de cultivo y además el color de la piel es más homogéneo. No obstante, las técnicas de cultivo son más costosas, requieren laboratorio bien equipado y personal altamente capacitado. Además, el tiempo de cultivo es de varias semanas, lapso que los pacientes deben esperar para recibir el tratamiento.

Chen y col ⁶, analizaron 120 casos donde evaluaron la viabilidad en el tratamiento de vitiligo, empleando esta técnica. Previo al trasplante realizaron dermoabrasión con láser CO2. Los pacientes con vitiligo estable localizado, experimentaron el mayor porcentaje de excelente re-pigmentación en un 84%.

Recientemente Yao y col ²¹, aportan un caso de re-pigmentación de leucotriquia en vitiligo, tras trasplante de melanocitos autólogos cultivados y tratamiento posterior con PUVA.

Redondo y col ²², demostraron que el trasplante de melanocitos autólogos, cultivados en membrana amniótica es un nuevo tratamiento, sencillo y eficaz para el vitiligo estable. La membrana amniótica como injerto promueve la re-epitelización, disminuye la inflamación, la fibrosis e inhibe la angiogénesis. Por otra parte, actúa como una membrana basal y facilita la migración de células epiteliales; tiene propiedades antimicrobianas y presenta una muy baja inmunogenicidad. Además, es fácil de obtener, de bajo costo y es cosméticamente deseable, evitando las cicatrices observadas con el uso de injertos de piel de espesor parcial.

– TRASPLANTE DE MELANOCITOS-QUERATINOCITOS CULTIVADOS:

Esta técnica permite el cultivo de la unidad melanocito-queratinocito, la que puede ser cultivada en membranas de ácido hialurónico u otras sustancias.

Andreassi y col, utilizaron cultivos compuestos de melanocitos y queratinocitos autólogos, cultivados en membranas de ácido hialurónico, que se injertaban directamente sobre las zonas receptoras acromáticas dermoabrasadas. Se obtenían buenos resultados, incluso para grandes áreas de la piel acromática. Parece preferible utilizar este tipo de cultivo compuesto, en lugar de un monocultivo de melanocitos, ya que, los resultados recientes sugieren que la alteración metabólica de los queratinocitos, dentro del marco de la unidad melano-epidérmica, juega un principal papel en la patogénesis del vitiligo.

Otros autores, también realizaron el cultivo de células epidérmicas autólogas, a partir de pequeñas biopsias de la piel de pigmentación normal y las cultivaron en membranas de ácido hialurónico, utilizando medio suplementado con el suero del paciente. Los cultivos celulares se injertaban previa dermoabrasión con láser, en las áreas despigmentadas. Los pacientes fueron sometidos a terapia UVB de banda estrecha, tres semanas después del injerto, con buenos resultados ⁴.

Kim y col ²³, publicaron su informe sobre la posibilidad de co-cultivar los melanocitos con células madre, derivadas de tejido adiposo (ADSCs) como sustitutivo de queratinocitos. La proliferación y migración de los melanocitos, se estimuló significativamente por el co-cultivo con ADSCs, en comparación con los monocultivos de melanocitos. Esto puede estar relacionado con el aumento de células madre y el factor de crecimiento básico de fibroblastos, factores de crecimiento para los melanocitos producidos por las ADSCs.

CONCLUSIONES

Aunque existen diversas opciones terapéuticas (tratamientos tópicos y sistémicos), ninguna es totalmente eficaz en el tratamiento del vitiligo. Actualmente, se ha demostrado que el trasplante de melanocitos cultivados, así como el cotrasplante de melanocitos-queratinocitos, pueden ser una alternativa viable para los pacientes con vitiligo, que son refractarios a los tratamientos médicos, siempre que éste sea estable. Actualmente, se han desarrollado eficientes modelos de piel artificial, mediante técnicas de ingeniería tisular^{24,25}. Estos modelos básicamente están compuestos por elementos estromales y queratinocitos. Un desafío futuro, sería la elaboración de sustitutos tridimensionales de piel artificial con capacidad de pigmentación, los que podrán tener diversas aplicaciones clínicas, incluido el tratamiento de patologías como el vitiligo.

REFERENCIAS

1. Aris M. Origen del melanocito normal y maligno. *Acta Bioq Clín* 2009; 43(3).
2. Sahni K, Parsad D, Kanwar AJ, Mehta SD. Autologous noncultured melanocyte transplantation for stable vitiligo: can suspending autologous melanocytes in the patients' own serum improve repigmentation and patient satisfaction? *Dermatol Surg* 2011; 37(2): 176-182.
3. Andreassi L, Pianigiani E, Andreassi A, Taddeucci P, Biagioli M. A new model of epidermal culture for the surgical treatment of vitiligo. *Int J Dermatol* 1998; 37(8): 595-598.
4. Pianigiani E, Risulo M, Andreassi A, Taddeucci P, Ierardi F, Andreassi L. Autologous epidermal cultures and narrow-band ultraviolet B in the surgical treatment of vitiligo. *Dermatol Surg* 2005; 31(2): 155-159.
5. Czajkowski R. Comparison of melanocytes transplantation methods for the treatment of vitiligo. *Dermatol Surg* 2004; 30(11): 1400-1405.
6. Chen YF, Yang PY, Hu DN, Kuo FS, Hung CS, Hung CM. Treatment of vitiligo by transplantation of cultured pure melanocyte suspension: analysis of 120 cases. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51(1): 68-74.
7. Fu LF, Zhang DM, Xu AE. De-epithelialization of vitiliginous area for transplantation of cultured autologous melanocyte: a case report of two patients with different methods. *Int J Dermatol* 2012; 51(6): 747-749.
8. Dieckmann C, Milkova L, Hunziker T, Emmendorffer A, Simon JC. Human melanocytes can be isolated, propagated and expanded from plucked anagen hair follicles. *Exp Dermatol* 2010; 19(6): 543-545.
9. Limat A, Hunziker T. Use of epidermal equivalents generated from follicular outer root sheath cells in vitro and for autologous grafting of chronic wounds. *Cells Tissues Organs* 2002; 172(2): 79-85.

10. Savkovic V, Dieckmann C, Milkova L, Simon JC. Improved method of differentiation, selection and amplification of human melanocytes from the hair follicle cell pool. *Exp Dermatol* 2012; 21(12): 948-950.
11. Clewes O, Narytnyk A, Gillinder KR, Loughney AD, Murdoch AP, Sieber-Blum M. Human epidermal neural crest stem cells (hEPI-NCSC)—characterization and directed differentiation into osteocytes and melanocytes. *Stem Cell Rev* 2011; 7(4): 799-814.
12. Zhou MN, Zhang ZQ, Wu JL, Lin FQ, Fu LF, Wang SQ y col. Dermal mesenchymal stem cells (DMSCs) inhibit skin-homing CD8+ T cell activity, a determining factor of vitiligo patients' autologous melanocytes transplantation efficiency. *PLoS One* 2013; 8(4): e60254.
13. Eisinger M, Marko O. Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79(6): 2018-2022.
14. Czajkowski R. BRAF, HRAS, KRAS, NRAS and CDKN2A genes analysis in cultured melanocytes used for vitiligo treatment. *Int J Dermatol* 2011; 50(2): 180-183.
15. Yarani R, Mansouri K, Mohammadi-Motlagh HR, Bakhtiari M, Mostafaie A. New procedure for epidermal cell isolation using kiwi fruit actinidin, and improved culture of melanocytes in the presence of leukaemia inhibitory factor and forskolin. *Cell Prolif* 2013; 46(3): 348-355.
16. Carriel VS, Aneiros-Fernández J, Arias-Santiago S, Garzon IJ, Alaminos M, Campos A. A novel histochemical method for a simultaneous staining of melanin and collagen fibers. *J Histochem Cytochem* 2011; 59(3): 270-277.
17. Van GN, Goh BK, Wallaeyes E, De KS, Lambert J. A Review of Non-cultured Epidermal Cellular Grafting in Vitiligo. *J Cutan Aesthet Surg* 2011; 4(1): 17-22.
18. Sharquie KE, Noaimi AA, Al-Mudaris HA. Melanocytes transplantation in patients with vitiligo using needling micrografting technique. *J Drugs Dermatol* 2013; 12(5): e74-e78.
19. Singh C, Parsad D, Kanwar AJ, Dogra S, Kumar R. Comparison between autologous noncultured extracted hair follicle outer root sheath cell suspension and autologous non cultured epidermal cell suspension in the treatment of stable vitiligo: a randomized study. *Br J Dermatol* 2013; 21.
20. Van GN, Ongenae K, De MM, Naeyaert JM. Modified technique of autologous noncultured epidermal cell transplantation for repigmenting vitiligo: a pilot study. *Dermatol Surg* 2001; 27(10): 873-876.
21. Yao L, Zhong SX, Hu DN, Guo JW, Li SS, Xie XL y col. Repigmentation of leukotrichia in vitiligo with transplantation of cultured autologous melanocytes. *Int J Dermatol* 2013; 4.
22. Redondo P, Giménez de AA, Marques L, García-Guzmán M, Andreu E, Prosper F. Amniotic membrane as a scaffold for melanocyte transplantation in patients with stable vitiligo. *Dermatol Res Pract* 2011; 532139.

23. Kim JY, Park CD, Lee JH, Lee CH, Do BR, Lee AY. Co-culture of melanocytes with adipose-derived stem cells as a potential substitute for co-culture with keratinocytes. *Acta Dermatol Venereol* 2012; 92(1): 16-23.

24. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface* 2010; 7(43): 229-258.

25. Carriel V, Garzón I, Jiménez JM, Oliveira AC, Arias-Santiago S, Campos A y col. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs* 2012; 196(1): 1-12.