

---

## Estudio *in vitro* de la apoptosis melanocitaria

### *In vitro study of melanocytary apoptosis*

P. Redondo<sup>1</sup>, J. García Foncillas<sup>2</sup>, J.C. Viera<sup>2</sup>, M. Idoate<sup>3</sup>

---

#### INTRODUCCIÓN

Los melanocitos son células constitutivas de la epidermis, que derivan de la cresta neural y son responsables de la pigmentación cutánea. El vitíligo es una enfermedad de causa desconocida, en la que se produce una destrucción selectiva de los melanocitos epidérmicos en pacientes predispuestos<sup>1</sup>. Aunque no existen estudios concluyentes, múltiples indicios sugieren que la muerte de los melanocitos en el vitíligo se produce por un fenómeno de apoptosis más que por necrosis. El concepto de apoptosis fue utilizado por primera vez en 1972 para describir una morfología de muerte celular caracterizada por encogimiento citoplasmático, condensación nuclear y cambios que originan una fagocitosis de las células afectadas por células vecinas<sup>2</sup>. Este proceso se distingue fácilmente de la necrosis; así, en la apoptosis las células no se hinchan ni revientan, sufren fagocitosis antes de liberar su contenido intracelular y no inducen una respuesta infla-

matoria. En diversas condiciones experimentales la presencia de múltiples factores intrínsecos y extrínsecos pueden iniciar o suprimir el programa de autodestrucción celular; entre ellos destacan: hormonas y factores de crecimiento, agentes físicos, etc. Este proceso a su vez es modulado por un largo número de genes, cuyos productos actúan como reguladores de la muerte celular. Los receptores para el factor de necrosis tumoral (TNF) y para el Fas (también denominado Apo 1 o CD95) pertenecen a la familia de receptores del TNF/NGF (factor de crecimiento neural) y se han implicado con frecuencia en procesos de apoptosis<sup>3</sup>. Cuando se les unen TNF- $\alpha$  y el ligando para el Fas (Fas-L), se traducen las señales de apoptosis<sup>4</sup>. Existe homología entre ambos receptores a través de una región denominada "dominio de muerte" que es necesaria para propagar el estímulo apoptótico. Esta señal activa una familia de proteasas-cisteína, también denominadas caspasas, que inducen la

---

ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 163-171.

1. Dpto. de Dermatología.
2. Dptos. de Anatomía Patológica.
3. Laboratorio de Oncología. Clínica Universitaria de Navarra. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

#### Correspondencia:

Pedro Redondo Bellón  
Departamento de Dermatología  
Clínica Universitaria de Navarra  
Apdo. 192  
31080 Pamplona  
Tfno. 948 255400  
Fax 948 172294  
E-mail: predondo@unav.es

destrucción celular<sup>5</sup>. Trabajos realizados con cultivos de queratinocitos han evidenciado la expresión del antígeno Fas en la superficie celular<sup>6</sup>, expresión que se incrementa tras la inducción con interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ). También se ha demostrado la presencia de esta molécula en muestras de melanoma, nevus pigmentocelulares y esporádicamente en melanocitos normales<sup>7</sup>. Los linfocitos T citolíticos presentan en su superficie el Fas-L que facilita la unión a la célula diana y el comienzo de los cambios morfológicos que constituyen el fenómeno de apoptosis.

Por otra parte, dentro de la familia del *bcl-2* existen genes tanto inductores como inhibidores de la apoptosis. El gen *bcl-2* fue descubierto como una traslocación cromosómica en un linfoma folicular de células B, favoreciendo su crecimiento por inhibición de la apoptosis<sup>8</sup>. Oligonucleótidos antisentido del *bcl-2* inducen apoptosis y aumentan *in vitro* la sensibilidad a quimioterapia en células leucémicas. Homólogos del *bcl-2* como *bcl-xL*, *mcl-1* y *ced-9* también suprimen la apoptosis. A su vez, los genes *bax* (*bcl-2* asociado a proteína X), *bak*, *bad* y *bcl-xS* inducen apoptosis<sup>9</sup>. Las proteínas resultantes de la transcripción y traducción de *bcl-2* y *bax* se unen entre sí formando dímeros, y el cociente Bcl-2/Bax determina la supervivencia o muerte celular siguiendo un estímulo de apoptosis. Diversos trabajos demuestran mediante inmunohistoquímica la expresión constitutiva de Bcl-2 por los melanocitos cutáneos<sup>10,11</sup>. Por todo lo expuesto, es posible que las proteínas codificadas por los genes *bcl-2* y *Fas* influyan en la patogenia de vitiligo.

En este trabajo se definen las condiciones y los medios necesarios para el cultivo de melanocitos *in vitro*. Asimismo, estudiamos los cambios morfológicos que se producen en los cultivos tras el uso de citocinas inductoras de apoptosis/necrosis celular como son el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$ , y su posible rescate con un fármaco antioxidante, la N-acetilcisteína (NAC). Por último, confirmamos la expresión de algunas proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cultivo de melanocitos

La piel sobrante de intervenciones de cirugía dermatológica se recoge en frascos de biopsia con 20 ml de RPMI 1640 hepes y 1 ml de penicilina/estreptomicina. Se almacena a 4°C hasta su utilización. En campana de flujo laminar, se coloca la muestra en una placa de Petri de 60 mm con una solución de PBS sin Ca ni Mg y 20 mg/ml de gentamicina, durante cinco minutos, realizando dos lavados sucesivos. Con tijeras de disección y pinzas de Adson, se elimina la hipodermis y dermis sobrante, y se trocea la pieza en 2 ó 3 fragmentos de tamaño similar. Posteriormente añadimos una solución de Dispasa II y dejamos la muestra en la estufa durante 10-14 horas a 37°C, en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. A la mañana siguiente, también bajo campana de flujo laminar, se separa la dermis de la epidermis con unas pinzas de Adson. La lámina de epidermis obtenida se coloca en una placa de Petri de 60 mm con una solución de Tripsina-EDTA al 0,25%, calentada a 37°C durante 5 minutos en incubadora de CO<sub>2</sub>, agitándose cada 30 segundos. De la suspensión obtenida se retiran las láminas sobrantes de epidermis. Se pipetea la solución restante y se añade a un tubo de centrifuga que contiene 5 ml de un inactivador comercial de la tripsina o un medio con 10% de suero de ternera fetal, centrifugando a 1500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. El *pellet* celular se coloca en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> (Nuncclon, Dinamarca), con una densidad aproximada de 2-6x10<sup>6</sup> células en 5-10 ml de medio completo. Como medio completo utilizamos el Melanocyte Medium Kit (Sigma, España) suplementado por la casa comercial con TPA, suero de ternera fetal, extracto de pituitaria bovina, factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), insulina, transferrina, heparina e hidrocortisona, y como basal el mismo sin suplementar. Asimismo en algunos experimentos utilizamos el medio basal de Sigma, suplementado con 2% de suero de ternera fetal, endotelina-1 (10 nM), hormona estimulante de melanocitos-a (MSH-a)(10 nM), endotóxina colérica (2,5 nM) y bFGF (10

ng/ml). Las células se incuban en una estufa a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. El medio se cambia cada 2 ó 3 días hasta que los melanocitos alcanzan la confluencia (entre 15-20 días). Durante los dos primeros días, el medio se cambia cada 24 horas, eliminando de esta manera los restos de láminas epidérmicas y células no viables.

Una vez obtenida la confluencia de las células, se realiza el denominado *splitter* o división en nuevos frascos de cultivo; para ello se añaden 5 ml de solución Tripsina-EDTA al 0,25% a 37°C a cada frasco de cultivo y se incuba durante 5-10 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se golpean lateralmente los frascos para favorecer la separación celular. La pérdida de adhesión es controlada mediante microscopio de luz invertida. Las células se pipetea y se trasladan a un tubo de centrifuga al que se añaden 5 ml de un inactivador de tripsina. Se centrifuga a 500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido de cada frasco se resuspende en medio completo y se distribuye en tres o más nuevos frascos de cultivo. De esta manera, tras la realización de progresivos *splitters* podemos obtener un número –en progresión geométrica– de frascos de cultivo con la misma procedencia y el mismo estadio de crecimiento y diferenciación.

### **Inducción celular y estudio mediante microscopía óptica**

Una vez alcanzada una buena confluencia (60-70%), los melanocitos fueron incubados con TNF- $\alpha$  recombinante humano (Sigma, España), IFN- $\gamma$  recombinante humano (Sigma, España) a diferentes tiempos y concentraciones o mantenidos en condiciones basales. En algunos experimentos 2 horas antes de la inducción se añadió al frasco de cultivo N-acetilcisteína (NAC, Sigma, España) a una concentración de 0,5-20 mM. Previamente, en casi todos los experimentos 24 horas antes de la inducción se cambió el medio completo por el medio basal sin suplementos para evitar posibles interacciones con factores específicos de crecimiento. Durante las siguientes 24-48 horas se valoraron los cambios morfológicos de los cultivos

mediante un microscopio de luz invertida (Nikon, Japon).

### **Citometría de flujo**

Los anticuerpos monoclonales usados para citometría fueron el anti-humano Fas (UB2)-FITC (Immunotech, Marseille, France), el anti-humano Bcl-2 (Pharmigen, San Diego, CA, USA) y el anticuerpo cabra anti-ratón IgG FITC (Becton Dickinson). Para la detección intracelular del Bcl-2 utilizamos el kit FIX&PERM cell Permeabilization kit, que contiene 2 reactivos: medio de fijación (reactivo A) y medio de permeabilización (reactivo B). Como isotipo control se utilizó un anticuerpo anti-ratón marcado con FITC.

Tras despegarlos de la superficie del frasco de cultivo con una solución de tripsina, los melanocitos fueron lavados con PBS frío conteniendo 10% de suero de ternera fetal. Todos los procedimientos se realizaron en hielo con PBS conteniendo un 0,3% de acida sódica. Inicialmente obtuvimos una suspensión celular de 5 x 10<sup>6</sup>/ml diluida en PBS, de la que utilizamos 100 ml (aproximadamente 500.000 células) para cada determinación. Tras los sucesivos lavados, marcajes e incubaciones siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial, se fijaron las células con el reactivo de fijación CellFix (Becton Dickinson). Todas las medidas se realizaron con citómetros de flujo FACScan y FACStar Plus (Becton Dickinson), equipados con un láser de argón de 50 mW.

### **Procesamiento para inmunohistoquímica**

Tras decantar totalmente el medio de cultivo, las células fueron despegadas con escobilla y el acúmulo celular –tras la rotura de la parte lateral del frasco de cultivo– fue trasladado con cuidado a un papel secante, que tras doblarse, se introdujo en formol. A partir de ese momento la inclusión en parafina y la obtención de los cortes siguió el curso normal de una pieza para estudio histológico. Se realizó técnica de inmunohistoquímica siguiendo el método convencional ABC (avidina-biotina-cromógeno peroxidasa) utilizando los anticuerpos monoclonales anti-human Bcl-2

(Novocastra, England) y anti-human Bax (Biogenex, California, USA).

### Extracción ADN

Las células del frasco de cultivo despegadas mediante escobilla, se resuspenden en 3 ml de buffer de lisis, en agitación. A continuación se añade Protease (Streratomyces griseus, Sigma, España) (10 ml por cada ml de células) y se incuba a 37 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente se agrega RNase one (Promega) a una concentración final de 20 mg/ml durante 30 minutos. Posteriormente se realizan 2 extracciones con fenol saturado (5 minutos de agitación y centrifugación a 2500 r.p.m. durante 5 minutos) y luego otra con cloroformo: isoamylalcohol (24:1 v/v). Tras centrifugar, la fase acuosa es trasladada a un nuevo tubo con cloruro sódico a una concentración final de 0,2 M, para que precipite el ADN. Posteriormente se añaden 2 volúmenes de etanol al 100%. Se recoge la formación filamentososa (ovillo de ADN) y se disuelve en 0,1 ml de Tris-Edta pH 8,0. La concentración de ADN se calcula midiendo la densidad óptica a 260 nm en el espectrofotómetro. Finalmente se realiza electroforesis del producto amplificado (10 ml más 2 ml de solución de carga) en un gel de agarosa al 2% en 1X TBE teñido con bromuro de etidio, y se visualiza bajo luz ultravioleta.

## RESULTADOS

### Estudio microscópico

La confluencia total de los melanocitos se alcanzó aproximadamente a las 3 semanas del cultivo. En algunos experimentos se apreció una contaminación por fibroblastos, que fue eliminada tras la incubación con geneticina (55 mg/ml) durante 3 días. A partir de ese momento se realizaron sucesivos *splitters* (de 1:3 ó 1:5 frascos), lográndose en todos ellos la confluencia a los 10 días. Todos los experimentos se realizaron entre el segundo y tercer *splitter*.

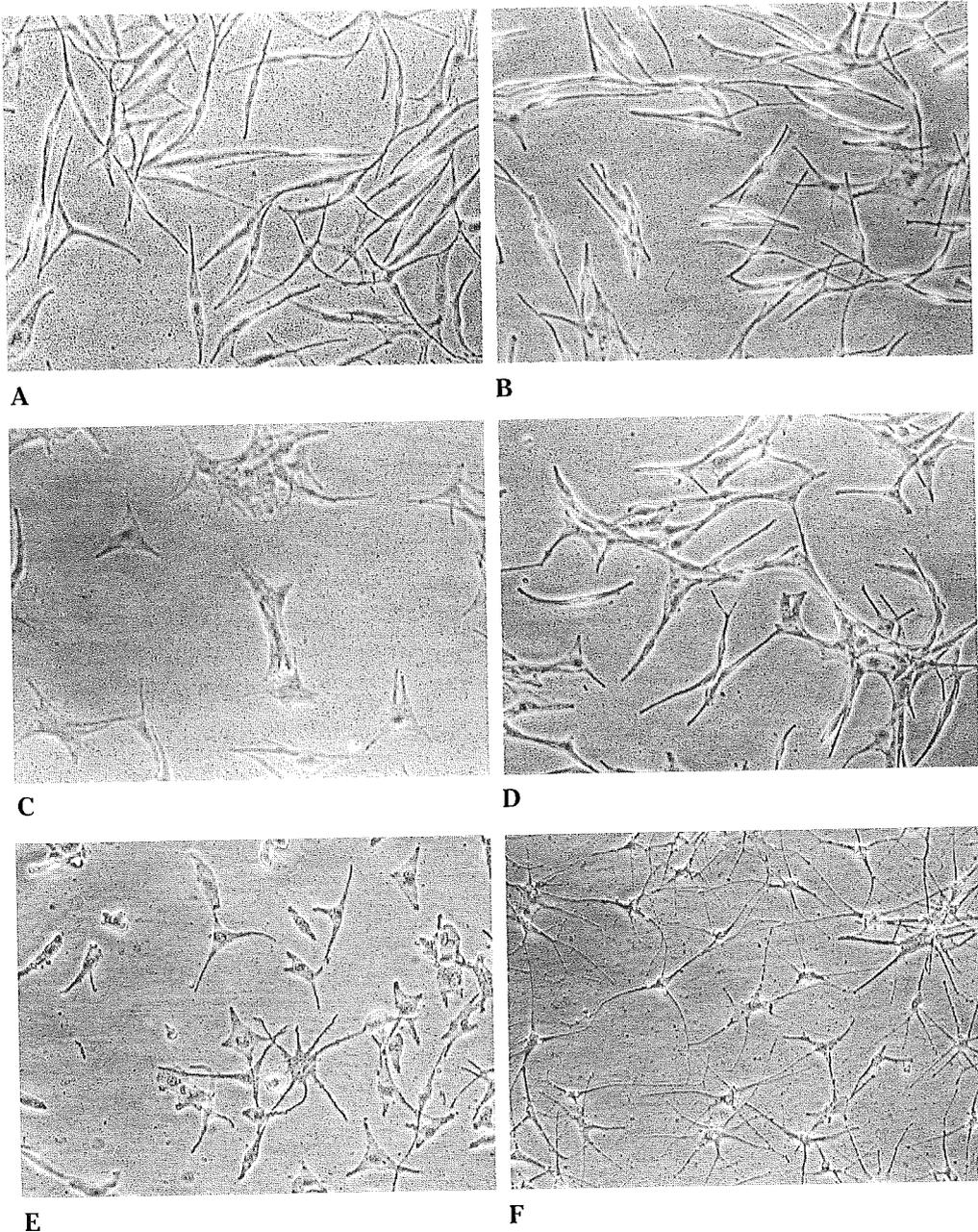
En los estadios iniciales los melanocitos presentaban una morfología dendrítica, que conservaban en las sucesivas divisiones si se mantenía el suplemento con

el 13-acetato 12-miristilo forbol (TPA) en el medio. La ausencia de TPA provocaba un crecimiento más lento y las células adquirirían una forma en huso o poligonal aplanada.

La inducción con TNF- $\alpha$  provocó cambios morfológicos en las células consistentes en encogimiento, disminución del número de dendritas y progresiva pérdida de adhesión al frasco de cultivo, que se hicieron más evidentes a las 48 horas. La incubación previa -24 horas antes- con NAC (20 mM) preservaba estos cambios, manteniendo los melanocitos el aspecto previo a la inducción (Fig. 1). Además, aunque en este experimento a las 72 horas el número de células flotantes en el medio de cultivo era mayor que en el frasco control, la incubación de nuevo con el medio basal suplementado permitía de nuevo la proliferación melanocitaria. En cambio esta proliferación no se apreció en la muestra inducida con TNF- $\alpha$  sin NAC.

Respecto a la inducción con IFN- $\gamma$ , morfológicamente apreciamos en los melanocitos cambios similares a los producidos por el TNF- $\alpha$ , que también estuvieron ausentes en los experimentos en los que se realizó una incubación previa con NAC (20 mM). En algunos de estos frascos continuamos suplementando el medio con TPA y, como se puede apreciar en la figura 1, los melanocitos mantenían el aspecto dendrítico cuando se preincubaron con NAC, pero no cuando únicamente eran inducidos con IFN- $\gamma$ .

En otros experimentos tras el segundo *splitter*, durante 3 semanas, continuamos cambiando el medio de cultivo cada 3 días. Progresivamente, además de lograr la confluencia total aparecieron acúmulos celulares visibles macroscópicamente como puntos negros en la superficie de los frascos. Dichos acúmulos fueron aumentando en número y tamaño según transcurría el tiempo. Claramente se objetivó una mayor secreción de melanina al medio de cultivo, apareciendo ya una coloración pardo-grisácea del mismo a las 8-12 horas del recambio. Con el microscopio de luz invertida no se apreciaron signos sugestivos de atipia citológica. También la proliferación celular valorada en distintas fases del cul-



**Figura 1.** Melanocitos tras el segundo *splitter* (x 200). A-D: medio basal sin suplementar. E-F: medio completo, conteniendo TPA. A) Melanocitos control. B) Incubación con NAC 20 mM, aspecto a las 24 horas. C) Incubación con TNF- $\alpha$  10 ng/ml, aspecto a las 24 horas. D) Preincubación con NAC 20 mM 24 horas antes de la inducción con TNF- $\alpha$  10 ng/ml. E) Incubación con IFN- $\gamma$  500 U/ml, aspecto a las 24 horas. F) Preincubación con NAC 20 mM 24 horas antes de la inducción con IFN- $\gamma$  500 U/ml

tivo mediante citometría de flujo, reflejó un clon poblacional con un índice de ADN claramente diploide. La viabilidad celular, determinada mediante la cámara de Neubauer en distintos experimentos tras el primer y segundo *splitter* fue siempre mayor del 80%.

#### Citometría de flujo

Mediante citometría de flujo apreciamos una pequeña expresión de Fas en la superficie de los melanocitos, incluso en condiciones basales. Esta expresión aumentó, aunque sin llegar a ser significativa, en algunos de los experimentos inducidos con IFN- $\gamma$ , especialmente a la dosis de 500 U/ml a las 48 horas. Por otra parte, la expresión intracitoplasmática de Bcl-2 fue apreciada en casi todas las muestras, a unos niveles bajos, incrementándose discretamente en algunos experimentos donde las células fueron incubadas con NAC (0,5-20 mM), pero sin observarse unas diferencias significativas ni una expresión dosis-dependiente (datos no mostrados).

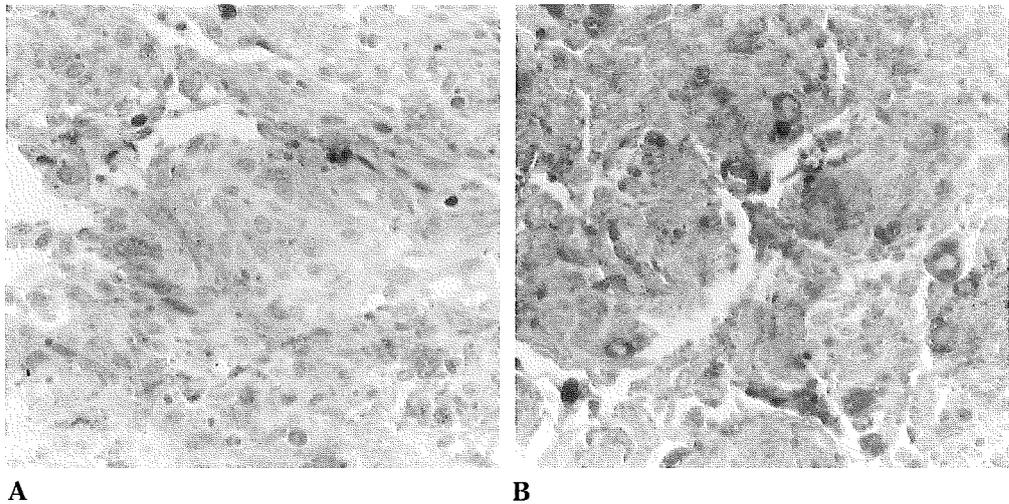
#### Inmunohistoquímica

El marcaje de Bcl-2 mediante inmunohistoquímica fue escaso en melanocitos

en estadios iniciales tras el segundo *splitter*. En unos estadios más avanzados (segundo *splitter* y tres semanas de cultivo) el marcaje fue prácticamente negativo tanto en condiciones basales como tras la inducción con las citocinas descritas y la incubación con distintas concentraciones de NAC. Por el contrario, la tinción con el anticuerpo Bax resultó muy positiva (Fig. 2) en todos los cultivos más avanzados, sin detectar diferencias significativas entre los frascos control y los inducidos con citocinas y/o NAC. No se realizó esta tinción en los cultivos iniciales.

#### Indicador de apoptosis (*laddering DNA*)

En las muestras analizadas a las 24 horas no observamos datos relevantes en el nivel de fragmentación del ADN en unidades nucleosomales (180-200 pb), una de las características específicas de las células apoptóticas. En algunas muestras inducidas con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  se apreció una difuminación de la mancha de ADN aunque sin observarse la "escalera propia" de la fragmentación nucleosomal, respecto a las muestras control en las que la mancha fue más uniforme (datos no mostrados).



**Figura 2.** Melanocitos tras el segundo *splitter* y tres semanas de cultivo. Inmunohistoquímica con el método ABC (avidina-biotina-cromogéno peróxidasa). A) Negatividad para Bcl-2 (x 300). B) Positividad para Bax (x 300)

## DISCUSIÓN

Los melanocitos, junto con los queratinocitos y células de Langerhans, son células constitutivas de la piel esenciales para el mantenimiento de la homeostasis epidérmica. Derivan directamente de la cresta neural y presentan un aspecto pseudodendrítico muy característico. Además de sus aplicaciones clínicas, en el campo de la investigación el melanocito es una célula fascinante no sólo en lo referente a la oncología cutánea por su posible transformación maligna y desarrollo de un melanoma, sino también para el estudio de modelos inflamatorios e inducción de fenómenos de apoptosis, extensibles a comprender la etiopatogenia de una enfermedad tan frecuente como el vitiligo. Además de su origen embriológico común y características morfológicas similares –como las dendritas–, los melanocitos cutáneos se asemejan a las neuronas por la presencia de receptores activos para el bFGF, la endotelina-1, la MSH- $\alpha$ , el factor *stem cell*<sup>12</sup> y el factor de crecimiento neural<sup>13</sup>. Recientemente se ha postulado que el cultivo de melanocitos humanos puede ser un modelo aceptable para el estudio de la enfermedad de Alzheimer y para el desarrollo de futuros tratamientos<sup>14</sup>.

El estudio *in vivo* de la apoptosis melanocitaria es difícil debido al escaso número de células existentes en la piel normal (1 melanocito por cada 36 queratinocitos). Por tanto, para estudiar la apoptosis de melanocitos es necesario obtener un modelo experimental *in vitro*, de forma que con una muestra suficiente y uniforme de células con la misma procedencia se realicen los experimentos. El cultivo de melanocitos puede resultar una técnica adecuada para el estudio de la apoptosis melanocitaria, tanto de células procedentes de pacientes afectados de vitiligo, como de melanocitos de pacientes normales tras la inducción por distintos estímulos. También lo consideramos un modelo válido para medir la acción farmacológica de posibles sustancias reguladoras en estos procesos. En nuestro trabajo hemos demostrado la expresión melanocitaria de receptores celulares implicados en fenómenos de apoptosis tanto por citometría de flujo como por inmunohistoquímica.

Asimismo, hemos apreciado variaciones morfológicas –sugestivas de apoptosis– en los melanocitos tras la inducción con citoquinas específicas, valoradas por el microscopio de luz invertida. Estas características morfológicas fueron atenuadas o resultaron inapreciables con el empleo simultáneo de la N-acetilcisteína. En cualquier caso, todos estos datos habría que interpretarlos con cautela, ya que no hemos podido demostrar mediante un indicador de apoptosis como es el *laddering* de ADN, los rasgos peculiares de esta muerte celular en nuestros experimentos.

Trabajos recientes demuestran mediante citometría de flujo y Western-blot que los melanocitos expresan constitutivamente Bcl-2, Bax y otras proteínas implicadas en fenómenos de apoptosis celular<sup>15,16</sup>. La expresión de Bcl-2 es esencial para el mantenimiento de los melanocitos incluidos en el folículo pilosebáceo, apreciándose en ratones carentes de este gen la cannicidad precoz a partir del segundo ciclo capilar<sup>17</sup>. Por otra parte se ha descrito que el Bcl-2 es capaz de interactuar con la superóxido dismutasa mitocondrial y suprimir la peroxidación lipídica, con lo que cabe especular que el efecto de esta proteína esté involucrado en la activación de diversos mecanismos antioxidantes de la célula<sup>18,19</sup> que la protegen frente al insulto oxidativo. Algunos estudios sugieren que la expresión de Bcl-2 puede inhibir la disminución de tioles intracelulares por radicales libres<sup>20</sup>, aunque está por demostrar si existe una contraregulación, es decir, si aumentando los niveles de antioxidantes endógenos aumenta la expresión de Bcl-2. La actuación sobre el sistema Bcl-2 y los mecanismos asociados de apoptosis, posiblemente en asociación sinérgica con una vía intracelular antioxidante, puede resultar una nueva terapéutica para la melanoprotección en el vitiligo. Respecto al papel del stress oxidativo/radicales libres en la etiopatogenia del vitiligo, en la literatura existen múltiples referencias. Recientemente se ha utilizado la aplicación tópica de un gel de pseudocatalasa asociada a cloruro cálcico y luz ultravioleta en el tratamiento del vitiligo, con unos resultados muy satisfactorios<sup>21</sup>. La catalasa es la enzima encargada de la eliminación

intracelular del peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno y otros radicales libres son capaces de producir apoptosis, que puede ser bloqueada por la presencia de Bcl-2.

La N-acetilcisteína ha sido usada como antioxidante para prevenir la apoptosis en linfocitos, neuronas<sup>22</sup> y células endoteliales. El papel antioxidante y citoprotector de esta sustancia, precursor esencial del glutatión (principal antioxidante endógeno) podría desarrollarse favoreciendo una mayor expresión/síntesis de bcl-2. En nuestro trabajo, sólo en algunos experimentos mediante citometría pudimos demostrar un mayor marcaje de Bcl-2 tras la incubación con NAC. Además de su acción antioxidante, la NAC ejerce una acción antiinflamatoria al inhibir el factor de transcripción nuclear kB (NFkB) que a su vez induce la transcripción de múltiples citocinas proinflamatorias<sup>23</sup>. Recientemente también se ha demostrado en cultivo de fibroblastos que la NAC ejerce un efecto antiproliferativo, suprimiendo la fase G1 del ciclo celular<sup>24</sup>.

Aunque desde hace tiempo se sabe que los melanocitos expresan constitutivamente Bcl-2, poco se conoce acerca de la expresión de Bax. Nuestros resultados, realizados por un procedimiento que consigue aplicar las técnicas de inmunohistoquímica en frascos de cultivo, indican que los niveles de Bax permanecen inalterables y constantes en los melanocitos cultivados durante largo tiempo, mientras que la expresión de Bcl-2 disminuye. De esta manera, el cociente Bcl-2/Bax es menor dentro de las células cuando estas son mantenidas durante largo tiempo en cultivo; hallazgos que coinciden con los de Sermadiras y cols<sup>15</sup>, quienes también aprecian una expresión elevada de Bax y una disminución del Bcl-2 según aumenta la diferenciación celular. Estos autores sugieren un posible control de la pigmentación por dichos oncogenes, que nosotros corroboramos tanto morfológicamente como con distintas tinciones en los cultivos prolongados de melanocitos.

Por otra parte, la expresión de Fas en melanocitos normales, -documentada escasamente en la literatura-, y su posible

inducción por citocinas proinflamatorias podría explicar el que esta proteína de membrana estuviera implicada en la apoptosis melanocitaria mediada por linfocitos citotóxicos que expresan en su superficie el Fas-L<sup>25</sup>.

En conclusión, nuestros datos demuestran que los cultivos de melanocitos humanos procedentes del mismo donante, expresan en distintas condiciones de cultivo las proteínas pro y antiapoptóticas Bax y Bcl-2, que parecen influir en el grado de pigmentación. Asimismo, estas células presentan en su superficie la molécula Fas, que puede ser inducida por algunas citocinas proinflamatorias y de esta manera intervenir en procesos de apoptosis tras unirse al Fas-L de los linfocitos citotóxicos.

Este modelo parece adecuado para el estudio y regulación de la apoptosis melanocitaria, con posibles aplicaciones por extrapolación al campo de las neurociencias.

Finalmente, la NAC al menos desde un punto de vista teórico, podría ser eficaz en el tratamiento del vitiligo, tanto por su acción antioxidante como antiinflamatoria, aunque indudablemente hay que estudiar y confirmar su papel en la regulación de estos procesos.

#### Agradecimientos

A Marisol González-Huarriz y María Guzman por su continuo apoyo técnico.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. HERLYN M, MANCIANTI ML, JAMBROSIC J, BOLEN JB, KOPROWSKI H. Regulatory factors that determine growth and phenotype of normal human melanocytes. *Exp Cell Res* 1988; 179: 322-331.
2. KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
3. ITOH N, YONEHARA S, ISHII A, MIZUSHIMA S, SAMESHIMA M, HASE A et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243.
4. ITOH N, NAGATA S. A novel protein domain required for apoptosis. *J Biol Chem* 1993; 268: 10932-10937.

5. ENARI M, HUG H, NAGATA S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1995; 375: 78-81.
6. SAYAMA K, YONEHARA S, WATANABE Y, MIKI Y. Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 330-334.
7. NORRIS DA. Differential control of cell death in the skin. *Arch Dermatol* 1995; 131: 945-948.
8. VAUX DJ, LORY S, ADAMS JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335: 440-442.
9. OLVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SS. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619.
10. KLEIN-PARKER HA, WARSHAWSKI L, TRON VA. Melanocytes in human skin express bcl-2 protein. *J Cutan Pathol* 1994; 21: 297-301.
11. PLETTENBERG A, BALLAUN C, PAMMER J, MILDNER M, STRUNK D, WENINGER W et al. Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *Am J Pathol* 1995; 146: 651-659.
12. GRABBE J, WELKER P, DIPPEL E, CZARNETZKI BM. Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Arch Dermatol Res* 1994; 287: 78-84.
13. PEACOCKE M, YAAR M, MANSUR CP, CHAO MV, GILCHREST BA. Induction of nerve growth factor receptors on cultured human melanocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5282-5286.
14. YAAR M, GILCHREST BA. Human melanocytes as a model system for studies of Alzheimer disease. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1287-1291.
15. SERMADIRAS S, DUMAS M, JOLY-BERVILLE R, BONTE F, MEYBECK A, RATINAUD MH. Expression of Bcl-2 and Bax in cultured normal human keratinocytes and melanocytes: relationship to differentiation and melanogenesis. *Br J Dermatol* 1997; 137: 883-889.
16. SONG Y, YAAR M, GILCHREST BA. Evidence that Bax mediates keratinocytes differentiation and apoptosis. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 875 (abstract).
17. YANAMURA K, KAMADA S, ITO S, NAKAGAWA K, ICHIHASHI M, TSUJIMOTO Y. Accelerated disappearance of melanocytes in bcl-2-deficient mice. *Cancer Res* 1989; 56: 3546-2550.
18. HOCKENBERY B, NUÑEZ G, MILLIMAN C, SCHREIBER RD, KORSMEYER SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-336.
19. HOCKENBERY D, OLVAI Z, YIN XM, MILLIMAN C, KORSMEYER SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway in apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251.
20. KANE DJ, SARAFIAN TA, ANTON R, HAHN H, GRALLA EB, VALENTINE JS et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262: 1274-1277.
21. SCHALLREUTER KU, WOOD JM, LEMKE KR, LEVENING C. Treatment of vitiligo with a topical application of pseudocatalase and calcium in combination with short-term UVB exposure: a case study of 33 patients. *Dermatology* 1995; 190: 223-229.
22. FERRARI G, YAN CY, GREENE LA. N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J Neurosci* 1995; 15: 2857-2866.
23. STAAL FJT, ROEDERER M, HERZENBERG LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kB and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9943-9947.
24. SEKHARAM M, TROTTI A, CUNNICK JM, WU J. Suppression of fibroblast cell cycle progression in G1 phase by N-acetylcysteine. *Toxic Appl Pharmacol* 1998; 149: 210-216.
25. RIVOLTINI L, RADRIZZANI M, ACCORNERO P, SQUARCINA P, CHIODONI C, MAZZOCHI A et al. Human melanoma-reactive CD4+ and CD8+ CTL clones resist Fas ligand-induced apoptosis and use Fas/Fas ligand-independent mechanisms for tumor killing. *J Immunol* 1998; 161: 1220-1230.