

TRATAMIENTO DE ULCERAS CRONICAS EN MIEMBROS INFERIORES CON AUTOINJERTOS DE QUERATINOCITOS CULTIVADOS

Dr. med. Virginia Vivas O'Connor***
Ph D: Dr. med. Wolfgang Tolgen*****
Dr. med. Haráld Uhlemann**

Vivas O. V., Tolgen W., Uhlemann H. **Tratamiento de úlceras crónicas en miembros inferiores con autoinjertos de queratinocitos cultivados.** Derm. Venez. 1993; 31: 141 - 148

RESUMEN

El cultivo de queratinocitos humanos y su preparación como injertos abre un horizonte muy amplio para el tratamiento de heridas de la más diversa etiología. En este estudio se presentan los resultados del tratamiento de pacientes portadores

de úlceras en miembros inferiores con autoinjertos de queratinocitos cultivados.

ABSTRACT

The cultivation and grafting of human keratinocytes opens a wide horizon in the treatment of wounds of varied ethiology. In this study we present the results of the treatment of patients bearing leg ulcers with autologous cultured keratinocyte grafts.

INTRODUCCION

La mejor forma de cubrir el defecto de piel es con piel normal. Todas las técnicas de transplante de piel son efectivas para la curación de úlceras crónicas y pa-

cientes quemados, a pesar de que algunas técnicas actualmente en uso requieren de extensas zonas donantes de tejido, las cuales pueden ser dolorosas y de muy lenta curación en los ancianos, y dejan cicatrices extensas y profundas. En pacientes con altos

porcentajes de superficie corporal quemada es difícil encontrar áreas donantes de piel para autotransplante. En 1979, Howard Greeni cultivó queratinocitos humanos por y en forma exitosa a partir de una pequeña muestra de piel, y éstos crecieron para formar un epitelio estratificado adecuado para ser usado como injerto. Estos injertos han sido usados desde 1981 para cubrir quemaduras extensas de tercer grado^{2,3,4,5,6,7,8}, úlceras de miembros inferiores^{9,10,11,12,13,14} epider – molisis ampollar¹⁵ y para cirugía plástica¹⁶

* Residente Post-grado de Dermatología, Hospital Central de Valencia, Universidad de Carabobo, Venezuela.

** Laboratorio de Oncología, Clínica de Dermatología, Universidad Ruprecht Karl, Heidelberg, República Federal de Alemania.

*** Jefe de adjuntos, jefe de laboratorio, Laboratorio de Oncología, Clínica de Dermatología, Universidad Ruprecht Karl, Heidelberg, República Federal de Alemania.

APLICACIONES DE LOS TEJIDOS DE QUERATINOCITOS CULTIVADOS EN LA CLINICA

QUEMADURAS

El tratamiento de pacientes severamente quemados es una de las aplicaciones clínicas más importantes de los autoinjertos de queratinocitos. La mayor ventaja de este método reside en su alta eficiencia: a partir de una muestra de piel del cm^2 pueden ser obtenidos de 1 a 2 m^2 de injertos^{2,3,4,5,8,17,18,19,20,21,22,23,24}. Por lo tanto, los autoinjertos de queratinocitos son óptimos para el tratamiento de pacientes quemados con pocos sitios donadores para injertos fenestrados. El "prendido" del injerto (islas de epitelio creciendo en el centro de la herida en el momento del primer cambio de vendaje) oscila entre el 0 al 95%, con un promedio de 47% para pacientes menores de 18 años y 28% para el resto. La primera causa de falla de los injertos fue la infección, ya que éstos son más susceptibles a ella que los tradicionales injertos fenestrados. La segunda causa de falla fue la hemorragia en el lecho de la herida recientemente limpiado para recibir el injerto. Sin embargo esto puede ser controlado por la preparación de las heridas con 24 horas de anticipación al trasplante⁸.

ULCERAS DE MIEMBROS INFERIORES

Hefton et al⁹. y Brysk et al¹⁴. ya han reportado el uso de injertos de queratinocitos para el tratamiento de úlceras crónicas de miembros inferiores. Los mejores resultados fueron observados en aquellas debidas a insuficiencia venosa, las cuales permanecieron curadas por espacio de 2 años posterior al trasplante⁸. Sin embargo, el trasplante a pacientes ancianos puede ser difícil debido al reducido potencial de crecimiento de éstos queratinocitos, los cuales posiblemente nunca lleguen a formar un tejido confluyente estratificado²⁵. Buscando solucionar este problema, se han trasplantado queratinocitos en forma de

suspensión celular, con resultados alentadores¹⁴. La eficiencia clínica de esta técnica ha sido evaluada estadísticamente por varios autores, entre los cuales cuentan Leigh et al¹¹. quienes reportan que los injertos practicados por ellos "perdieron" en un 29%; además reportan un "efecto de borde" (crecimiento de epitelio desde el borde de las úlceras) del 44% para una serie de 70 úlceras injertadas. Phillips et al.²⁶, reportaron que el 73% de las úlceras injertadas habían curado completamente en 8 semanas. El tratamiento de úlceras con injertos de queratinocitos se ha asociado a alivio del dolor dentro de las primeras 24 horas posteriores al trasplante, a pesar de ser úlceras que habían estado presentes por décadas en estos pacientes¹¹.

CIRUGIA PLASTICA

Las principales aplicaciones en este campo son la cobertura de heridas producidas por la extirpación de tatuajes, nevos congénitos gigantes, y sitios donantes de injertos fenestrados con injertos de queratinocitos. Este tipo de heridas, por ser estériles, incrementan el porcentaje de "prendido" de los injertos hasta un 68%. Gallico et al.¹⁶ compararon el uso de autoinjertos de queratinocitos con injertos fenestrados en cirugía plástica, reportando que los injertos fenestrados "prenden" mejor (84%) que los injertos de queratinocitos (68%). Las heridas se contrajeron un poco más con injertos de queratinocitos que con piel fenestrada, pero sin embargo, los resultados a largo plazo demuestran que las áreas tratadas con los primeros no presentan las cicatrices hipertróficas en los bordes que sí se observan en los injertos de piel fenestrada.

EPIDERMOLISIS AMPOLLAR

El tratamiento de lesiones crónicas de erosión en la cara de pacientes con epidermolisis ampollar fue reportado por Carter et al. en 1987¹⁵. Dichas lesiones, mejoraron en dos de los tres pacientes tratados.

QUERATINOCITOS DE LA MUCOSA BUCAL

De Luca et al.²⁷ reportaron haber trasplantado exitosamente injertos de queratinocitos para cubrir defectos de la mucosa bucal.

OTRAS APLICACIONES DE LOS INJERTOS DE QUERATINOCITOS

El tratamiento de la otorrea post operatoria de 2 a 32 años de duración causada por un defecto de la reepitelización de las cavidades mastoideas posterior a cirugía ha mejorado con el uso de autoinjertos de queratinocitos²⁸. Los queratinocitos en cultivo pueden ser modificados por medio de la ingeniería genética para que produzcan hormonas, las cuales podrían ser liberadas en la circulación posteriormente a haber sido trasplantados²⁹. Queratinocitos cultivados también han sido utilizados en la preparación de lentes especiales los cuales sobreviven en pacientes con córnea vascularizada³⁰. Auboeck et al.³¹ propone que también podrían ser utilizados en el tratamiento de lesiones producidas por Xeroderma Pigmentosum.

El desarrollo de esta técnica es un avance considerable, ya que provee uno de los mejores materiales para cubrir heridas. Sin embargo, la infección de las heridas recipientes, la debilidad del paciente y la toxicidad de los antisépticos³² son factores que ejercen influencias negativas sobre los injertos. La mayor desventaja que presenta esta técnica cuando se usan autoinjertos es la demora en el crecimiento en cultivo del epitelio, la cual oscila entre 7 días para donantes jóvenes hasta 5 semanas para los ancianos^{2,4,5,6,9,10,12,17,33,34,35}. Si se utilizan autoinjertos preparados comercialmente, esta demora no ocurre. Sin embargo, esto no es recomendable puesto que pueden portar infecciones desconocidas (por ej.: virus lentos). Existe evidencia de la transmisión del citomegalovirus murino por injerto de piel trasplantado inmediatamente después de la remoción quirúrgica del mismo, o a través de piel

criopreservada en modelos hechos en ratas³⁶

COMPORTAMIENTO DE AUTOINJERTOS POSTERIOR AL TRANSPLANTE

Macroscópicamente, los injertos son translúcidos durante los primeros días, haciéndose cadavez más visibles a medida que se desarrolla la queratinización, presentando una superficie finamente arrugada. En el transcurso de los años^{18,37} el defecto dérmico subyacente es rellenado y la apariencia se va normalizando. De Luca et al.⁸, O'Connor et al.³⁸ y Teepe et al.³⁹ reportan disminución en la formación de cicatrices tanto en la parte superior como en los bordes de estos injertos, además de una mínima retracción de la herida. Microscópicamente se ha demostrado que el injerto se desarrolla hasta formar una epidermis completamente estratificada e hipertrófica desde la primera semana, con una unión dermoepidérmica aplacada¹⁸.

COMPORTAMIENTO DE ALOINJERTOS POSTERIOR AL TRANSPLANTE

En los primeros tiempos de aloinjerteros de queratinocitos cultivados se asumió que estos no serían rechazados^{40,41} o por lo menos no por largos períodos⁴². Actualmente se conoce que los aloinjerteros no se mantienen permanentemente in situ desde la primera semana, sino que son reemplazados por queratinocitos del recipiente^{8,31,43,44}. Los aloinjerteros de queratinocitos actúan como una cobertura temporal, la cual estimula a los propios queratinocitos a crecer y reepitelizar desde los apéndices cutáneos y los bordes de la herida^{11,19,26}. Posiblemente la secreción de proteínas de la membrana (basa) y de la matriz extracelular por los injertos facilita la migración de las propias células epidérmicas^{45,46}. Por otra parte, los queratinocitos en cultivo y en los injertos sintetizan factores de crecimiento, los cuales son responsables de acelerada curación de las he-

ridas^{47,48} migración de queratinocitos⁴⁹, angiogénesis⁵⁰, diferenciación y producción de fibronectina^{51,52}. Por último, los injertos de queratinocitos actúan como una barrera mecánica, previniendo la deshidratación de la herida⁵³

MATERIALES Y METODOS

2 pacientes con úlceras crónicas de miembros inferiores fueron transplantados con autoinjertos de queratinocitos cultivados. La primera paciente con una historia clínica de úlcera post-trombosis en miembro inferior de un año de evolución y tratamiento conservador sin mejoría. La segunda paciente con una historia clínica de insuficiencia arteriovenosa, tiroiditis de Hashimoto y diabetes mellitus, con una úlcera de miembro inferior de 5 años de evolución y tratamiento conservador sin mejoría.

Se requirió de 1 muestra de piel de 1 cm², la cual se tomó del tercio superior del muslo en cada uno de los pacientes tratados. Se sembraron 6 cultivos primarios con las células epidérmicas obtenidas de cada una de las muestras de piel arriba mencionadas, las cuales fueron procesadas en una cámara de flujo vertical, estéril. La piel fue lavada en PBS y la epidermis fue separada mecánicamente. Las células epidérmicas se obtuvieron por tripsinización. Dichas células fueron contadas y posteriormente sembradas a una densidad de 2,61 x 10³ por cm² en los platos de cultivo conteniendo las células 3T3 irradiadas en medio de cultivo para queratinocitos (KGM).

SUSPENSION DE QUERATINOCITOS PARA TRANSPLANTE

Los cultivos fueron incubados con tripsina al 0,25% y EDTA al 0,2% 1:1 para obtener una suspensión de células aisladas. Esta suspensión concentrada de queratinocitos se aplica directamente sobre el lecho de la úlcera en forma estéril y en el quirófano, cubriéndose posteriormente con gasa vaselinada estéril y vendaje de com-

presión ligera por 3 a 5 días. Posteriormente, los cambios de vendaje se hacen en días alternos.

PREPARACION DEL INJERTO DE QUERATINOCITOS

Cultivos confluentes de queratinocitos fueron incubados por 20 a 30 minutos con 20 ml de Dispasa 11. Se coloca gasa vaselinada estéril sobre el injerto y se transporta (capa basa) hacia arriba nadando en medio sin suero hasta el sitio de transplante.

RESULTADOS

MORFOLOGIA DE LOS CULTIVOS

Los queratinocitos humanos obtenidos luego de tripsinización de las muestras de piel se fijaron al fondo de las botellas de cultivo tapizadas con células 3T3 luego de 3 a 4 días. Los queratinocitos eran fácilmente identificables por la formación de desmosomas entre las células, y la forma cuboidal que éstos adoptan en cultivo.

Posteriormente, éstos formaron colonias originadas a partir de una sola célula, penetraron entre células 3T3 adyacentes desplazándolas, formando un borde elevado alrededor de las colonias debido a la mayor capacidad de adhesión de los queratinocitos. Estos últimos, luego de estar fijos comenzaron a estratificarse, evidenciándose esto por la pérdida de los límites celulares y el engrosamiento del centro de la colonia. Normalmente, las colonias crecen hasta formar un epitelio que se extiende por el fondo de la botella de cultivo. Sin embargo, los queratinocitos mostraron crecimiento retardado, con colonias pequeñas, de bordes irregulares, muy estratificadas, y algunos cultivos no alcanzaron nunca la confluencia. En cultivos secundarios, las colonias fueron visibles a partir de las 24 horas posteriores al subcultivo.

PACIENTES TRANSPLANTADOS

En ambas pacientes tratadas con autoinjerto de queratinocitos cultivados fue exitoso el método, con diferentes grados de respuesta en cada una.

La primera pacientes, femenina de 58 años de edad, con historia clínica de insuficiencia venosa a consecuencia de una trombosis venosa posttraumática. Presentó una úlcera medial supramaleolar que medía 5 x 7 cm (Fig. 1) la cual no mejoró con tratamiento convencional aplicado durante un año ni luego de tres meses de hospitalización. Dicha paciente recibió tres trasplantes en un lapso de 15 días tanto en forma de epitelio como de suspensión los cuales cubrieron completamente el área de la úlcera.

Luego de 1 semana del último trasplante, se evidenció un 85% de "prencido" del injerto. Fue dada de alta y asistió a controles ambulatorios. El 90% de la úlcera curó en un mes. Es evidente la homogeneidad de la cicatrización en la periferia de la úlcera, en la cual no se observa hipertrofia cicatricial (Fig. 2)

La segunda paciente, femenina de 72 años con historia clínica de tiroiditis de Hashimoto y 5 años de insuficiencia arteriovenosa con una úlcera supramaleolar que medía 14x 17 cm y circundaba el tercio inferior de la región tibia (Fig. 3). Recibió en cuatro oportunidades trasplante de queratinocitos, tanto en forma de epitelio como en forma de suspensión. A pesar de infecciones repetidas del lecho ulceroso y un fondo de osteomielitis del tercio inferior de la tibia, el diámetro de la úlcera decreció a 10 x 9 cm luego de 45 días del último trasplante (Fig. 4)

DISCUSION

MORFOLOGIA DE LOS QUERATINOCITOS

Los queratinocitos que crecieron de los homogeneizados de piel preservaron todas las características

descritas con anterioridad
25,33,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63

En cultivos de queratinocitos destinados a la preparación de injertos, es importante que las colonias se expandan horizontalmente para alcanzar la confluencia antes de que se

acentúela la estratificación (cierto grado de estratificación siempre existe). Sin embargo, colonias que se estratifiquen intensamente durante la fase proliferativa pueden abortar y los cultivos nunca alcanzan la confluencia⁶². El aumento de tamaño de los queratinocitos en una colonia es un

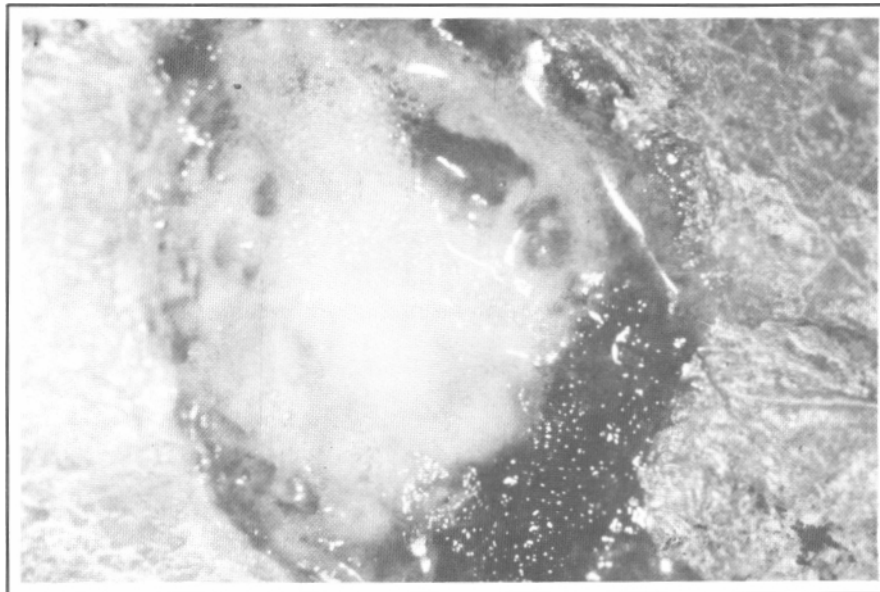


Fig. 1
Úlcera medial supramaleolar en una paciente de 58 años antes del injerto de queratinocitos.



Fig. 2
La misma paciente un mes posterior al trasplante

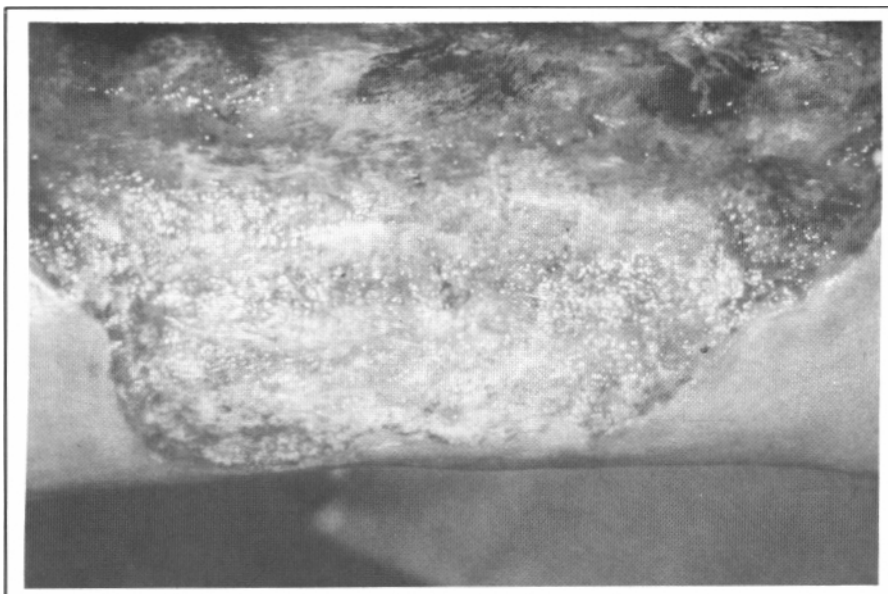


Fig. 3

Úlcera supramaleolar en una paciente de 72 años antes del injerto de queratinocitos

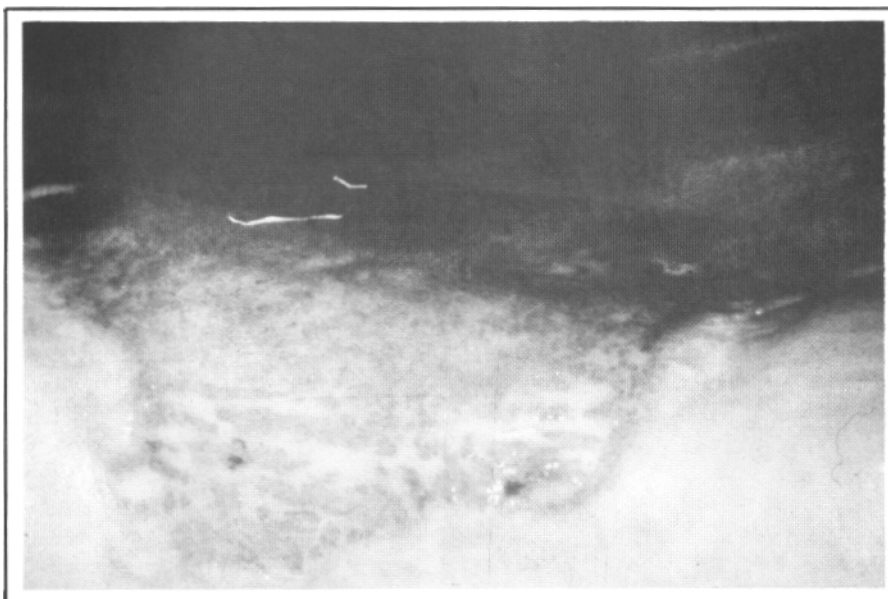


Fig. 4

La misma paciente 20 días después del último trasplante

signo de estratificación, el cual se opone a la multiplicación de las células y la expansión horizontal de la colonias^{59,64,65}. Por el contrario, colonias compuestas predominantemente de células pequeñas y homogéneas presentan la rata mayor de crecimiento y multiplicación, y estos cultivos

alcanzan la confluencia más rápido⁶².

Luego de alcanzarla confluencia, las colonias dejan de expandirse horizontalmente para acentuar su estratificación, lo que les confiere la similitud con la epidermis humana, lo cual es necesario para la integridad

del injerto. Sin embargo, los queratinocitos de donantes ancianos, pocas veces alcanzan la confluencia, ya que sus colonias están compuestas predominantemente de paraclonos y meroclonos⁶², y es necesario en estos casos transplantar los queratinocitos en forma de suspensión.

Los estudios in vitro concernientes al comportamiento biológico de queratinocitos humanos se han llevado a cabo principalmente en muestras de piel de prepucio, los cuales han demostrado que crecen mejor en cultivo. Sin embargo, para autoinjertos aplicados clínicamente, la piel puede ser obtenida de otros sitios del cuerpo, tales como cara interna del muslo.

CRECIMIENTO DE QUERATINOCITOS DE DONANTES ANCIANOS

Los queratinocitos cultivados en este estudio fueron provenientes de donantes ancianos, por lo cual mostraron unatendencia a bajos índices de crecimiento, estratificación temprana y formación de colonias de meroclonos y paraclonos, las cuales nunca alcanzaban confluencia. Para transplantar queratinocitos autólogos a estos pacientes, fue necesario preparar suspensiones muy densas a partir de los cultivos que pudieran ser aplicados directamente sobre el lecho de las úlceras.

PACIENTES TRANSPLATADOS

Los resultados preliminares fueron alentadores, ya que una de las pacientes que recibieron dicha suspensión mostró una cicatrización rápida de la úlcera, mientras que la segunda paciente, a pesar de repetidas infecciones del lecho de la úlcera, mostró una disminución del diámetro de la misma.

La aplicación de injertos de queratinocitos autólogos en suspensión ahorra tiempo en el tratamiento de pacientes ancianos cuyos cultivos probablemente nunca alcanzarán la confluencia.

INFECCION DEL LECHO ULCEROSO Y APLICACION DE INJERTOS DE QUERATINOCITOS

De acuerdo con reportes previos^{5,11,32,34,35} los injertos de queratinocitos son muy susceptibles a la infección del lecho de las heridas, la cual dificulta que dichos injertos "prendan". Además, el cubrir una herida infectada con un injerto empapado en medio de cultivo por 3 a 5 días agrava la infección y está contraindicado. Estas razones explican la limitada mejoría presentada por la segunda paciente transplantada, la cual presentaba infección del lecho ulceroso.

CONCLUSIONES

TRANSPLANTE DE QUERATINOCITOS PARA ULCERAS DE MIEMBROS INFERIORES

El número de pacientes estudiados es muy pequeño para establecer conclusiones, pero basados en éxitos reportados anteriormente y a los resultados alentadores obtenidos, merece la pena continuar con este tema de investigación.

CRECIMIENTO Y TRANSPLANTE DE QUERATINOCITOS PROVENIENTES DE DONANTES ANCIANOS

Los queratinocitos provenientes de donantes ancianos que no crezcan hasta la confluencia pueden ser transplantados en forma de una suspensión densa, con buenos resultados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:5665-5668.
- 2.- O'Connor N, Mulliken J, Banks-Schlegel O, Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. Lancet 1981; 1:75-78.
- 3.- O'Connor N, Gallico G, Compton C, Kehinde O, Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells II: intermediate term results in three pediatric patients 283-292. In: Soft and Hard tissue repair, Biological and clinical aspects. Vol. 11, TK HUnt, KB Heppenstall, E Pines & D Rovee, eds, 1984.
- 4.- Gallico G, O'Connor N, Compton C, Kehinde O, Green H. Permanent wound coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. N Eng J Med 1984, 331:448-451.
- 5.- Cuono C, Landon R, Mc Guire J. Use of cultured epidermal autograft and dermal allografts as skin replacement after burn injury. Lancet 1986; 1:1123-1124.
- 6.- Madden M, Finkelstein J, Staiano-Coico L, Goodwin C, Shires T, Nolan E, Hefton J. Grafting of cultured allogenic epidermis on second and third degree burn wounds on 26 patients. J Trauma 1986; 26:955-962.
- 7.- Kumagai N, Nishina H, Nabe H, Hosaka T, Ishida H, Ogino Y. Clinical application of autologous cultured epithelia for the treatment of burn wounds and burn scars. Pl Rec Surg 1988; 82:99-110.
- 8.- De Luca M, Albanese E, Bondanza S, Megna M, Ugozoli L, Molina F, Cancedda R, Santi P, Bormioli M, Stella M, Magliacani G. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium fresh or preserved in a frozen state. Burns 1989; 15:303-309.
- 9.- Hefton J, Caldwell D, Biozes D, Balin A, Carter M. Grafting of skin ulcers with cultured autologous epidermal cells. J. Am Acad Dermatol 1986; 14:399-405.
- 10.- Leigh I, Purkis P. Cultured grafted leg ulcers. Clin Exp Dermatol 1986; 11:650-652.
- 11.- Leigh I, Purkis P, Navsaria H, Phillips T. Treatment of chronic venous ulcers with sheets of cultured allogeneic keratinocytes. Br. J Dermatol 1987; 117:591-597.
- 12.- Leigh I, Purkis P, Navsaria H, Brain A, Hackett M. The use of cultured keratinocytes in wound healing including cultured epithelium in leg ulcers. In: Beyond occlusion: wound care proceedings. Royal Society of Medicine Services International Congress and Symposium Series No. 136 TJ Ryan, 1988.
- 13.- Teepe R, Koebrugge E, Ponc M, Vermeer B. Fresh versus cryopreserved cultured allografts for the treatment of chronic skin ulcers. Br. J. Dermatol 1990; 122:81-89.
- 14.- Brysk M, Raimer S, Pupo R, Bell T, Rajataman S. Grafting of leg ulcers with undifferentiated keratinocytes. J Am Acad Dermatol 1991; 25:2382-244.
- 15.- Carter M, Lin A, Varghese M, Caldwell D, Pratt L, Eisinger M. Treatment of junctional epidermolysis bullosa with epidermal autografts. J. Am Acad Dermatol 1987; 17:246-250.
- 16.- Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Remensnyder JP, Kehinde O, Green H. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. Plast Reconstr Surg 1989; 84:1-9.
- 17.- Teepe R, Ponc JA, Kempenar B. Clinical, histological and ultrastructural aspects of cultured epithelium. Proceedings of the International Symposium on the clinical use of Cultured Epithelium in Surgery and Dermatology. Leiden. (Teepe R, ed) Wheathampstead: Medical and Scientific Conferences Ltd, 1987.
- 18.- Compton C, Gil J, Bradford D. Skin regenerated from cultured epithelial on full thickness burn wounds from a year to five years after grafting. Lab Invest 1989; 60:600-612.
- 19.- Soehnchen R, Braun - Falco O. Epitheltransplantation mit kultivierten Keratinozyten. Hautarzt 1988; 39:701-707.
- 20.- Zhi-Ren G, Zhi-quan H, Lan Uan N. Coverage of full skin thickness burns with allograft inoculated with autologous epithelial cells. Burns 1986; 12:200-224.

- 21.- Pittelkow M, Scott R. New techniques for the in vitro culture of human skin keratinocytes and perspectives on their use for grafting of patients with extensive burns. *Mayo Clin Proc* 1986;61:771-777.
- 22.- Teepe R, Ponce M, Kreis R. (1986). Improved grafting method for the treatment of burns with autologous cultured human epithelium (Letter) *lancet* 1986;1:385.
- 23.- Eldad A, Burt A, Clark J. Cultured epithelium as skin substitute. *Burns* 1987;13:173-180.
- 24.- Bettex-Galland M, Slongo T, Hunyiker T, Use of cultured keratinocytes in severe burns. *Z Kinderchir* 1988; 43:224-228.
- 25.- Gilchrest B. Relationship between actinic damage and chronologic aging in Keratinocyte cultures of human skin. *J Invest Dermatol* 1979;72:219-233.
- 26.- Phillips T, Kehindi O, Green H, Glichrest B. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. *J Am Acad Dermatol* 1989;21:191199.
- 27.- De Luca M, Albanese E, Megna M. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and trasplanted onto patients with defects in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Tranplantation* 1990; 50:454-459.
- 28.- Premachandra DJ, Woodward BM, Milton CM, Serjeant RJ, Fabre JW Treatment of postoperative otorrhoea by grafting of mastoid cavities with cultuied autologous epidermal cells. *Lancet* 1990;i:365-367.
- 29.- Morgan JR, Barrandon Y, Green H. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science* 1987;237:1476-1479.
- 30.- Franztz J, Gebhardt B, Reidy J, McDonald M. Immunogenicity of epikeratophakia tissue lenses containing living donor keratinocytes. *Refract Corneal Surg* 1991;7:141-145.
- 31.- Aotoeck J, Romani N, Kompatscher P. Keratinozytenexpansionskultur zur deckung von Hautdefekten. In: Braun Falco O, Schill WB (Hrsg). *Forscrite der praktischen Dermatologie und Venerologie*, Bd 11. Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1987.
- 32.- Tatnall F, Leigh 1, Gibson J. Comparative toxicity of antimicrobial agents in transformed human keraatinocytes. *J. Invest Dermatol* 1987; 89:316-317.
- 33.- Green H, The keratinocytes as a differentiated cell type. *The Harvey Lectures*, Series 74, 1979.
- 34.- Cuono C, Langdon R, Birchall N, Bartellbort S, McGuire J. Composite autologous-allogeneic skin replacement: Development and clinical application. *Pl Rec. Surg* 1987;80:80626-634.
- 35.- Faure M, Maduit G, Schmitt D, Kanitakis J, Demidem A, Thivolet J. Growth and differentiation of human epidermal cultures used as auto.and allografts in humans. *Br. J Dermatol* 1987;H6:161-170.
- 36.- Shelby J, Saffle J, Kern R. Transmission of cytomegalovirus infection in mice by skin graft. *J Trauma* 1988; 28:203-206.
- 37.- Gilchrest B. In vitro assessment of Keratinocyte aging. *J Invest Dermatol* 1983;81:33-40.
- 38.- O'Connor NE, Gallico GG, Compton CC. Modification of hypertrophic sears and keloids with cultured epithelial autografts. In: *Proccedins of the American Burn Association meeting*. p. 174,1990.
- 39.- Teepe R, Kreis R, Koebrugge E. The use of cultured autologous epidermis in the treatment of extensive burn wounds. *J Trauma* 1990;30:269-275.
- 40.- Morhenn V, Benike C, Cox A. Cultured human epidermal cells do not synthesize HLA-DR. *J. Invest Dermatol* 1982;78:32-37.
- 41.- Granstein R, Smith L, Parrish J. Prolongation of murine skin allograft survival the systhemic effects of 8 metoxipsoralen and long wave ultraviolet radiation (PUVA). *J Invest Dermatol* 1987;88:424-429.
- 42.- Thivolet J, Faure M, Demidem A, Madulit G. Cultured human epidermal allografts are not rejected for a long period. *Arch Dermatol Res* 1986;278:252-254.
- 43.- Brain A, Purkis P, Coates P. Survival of cultured allogeneic keratinocytes tranplanted todeep dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome. *Br. Med J* 1989;298:917-919.
- 44.- Burt A, Pallet C, Sloane J. Survival of cultured allograft in patients with burns assessed with probe specific for Y- chromosome. *Br. Med J* 1989;298:915-917.
- 45.- Clark D, Denver Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. *J Am Acad Dermatol* 1985;13:701-725.
- 46.- Carver N, Leight 1. Keratinocytes grafts and skin equivalents. *Int J Dermatol* 1991;30:540-551.
- 47.- Van Brunt J, Klausner A. Growth factors speed wound healing *Biotechnology* 1988;6:25-30.
- 48.- Lynch S, Colvin R, Antionades H. Growth Factors in wound healing. *J Clin Invest* 1989;84:640-646.
- 49.- Barrandon Y, Green H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocytes colonies: The roles of transforming groeth factor and apidermal growt factor. *Cell* 1987;50:1131-1137.
- 50.- Folkman K, Klagsburn M. Angiogenic Factors. *Science* 1987;235:442-447.
- 51.- Reiss M, Sartorelli A. Regulation of growth and differentiation of human keratinocytes by TGF and EGF. *Cancer Res.* 1987;47:6705-6709.
- 52.- Wikner N, Persichitte K, Baskin J. TGF Alpha stimulates the expression of fibronectin by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1988;1:207-212.
- 53.- Woodley D, O'Keefe E, Prunieras M. Cutaneous wound healing: a model for cell matrix interactions. *J Am Acad Dermatol* 1985;12:420-433.

- 54.- Rheinwald J, Green H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* 1975;6:317-330.
- 55.- Rheinwald J, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes. The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-344.
- 56.- Rheinwald J, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*. 1977;265:421-424.
- 57.- Sun T, Green H. Differentiation of cultured human epidermal cells; formation of intermolecular disulphide bonds during terminal differentiation. *J Biol Chem* 1978;252:2053-2060.
- 58.- Fuchs E, Green H. Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 1981;25:617-625.
- 59.- Watt F, Green H. Stratification and terminal differentiation of cultured epidermal cells. *Nature* 1982;295:434-436.
- 60.- Fusening N. Mammalian apidermal cells in culture. In Bereiter-Hahn J, Matolsky A, Richards K. *Biology of the Integument. Vol 2p 409-442. Vertebrates; Springer Verlag Berlin Heidelberg.* 1986.
- 61.- Lewis L, Barrandon Y, Green H. The reorganization of microtubules and microfilaments in differentiating Keratinocytes. *Differentiation* 1987;36:228-233.
- 62.- Barrandon Y, Green H, Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2302-2306.
- 63.- Watt F, Jordan P, O'Neill C. Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5576-5580.
- 64.- Hennings H, Hoolbrook K, Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture exp. *Cell Res* 1983;143:127-142.
- 65.- Willie J, Pittelkow M, Shipley G, Scott R. Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium: clonal analyses, growth kinetics, and cell cycle studies. *J Cell Physiol* 1984;121:31-44.

NOTA DE DUELO

En el mes de septiembre de 1993, murió tragicamente en Sao Paulo Brasil, el eminente dermatólogo Raymundo Martins de Castro, conocido por los venezolanos cuando asistió como conferencista Martín Vegas en la reunión de la Sociedad Venezolana de Dermatología que se realizó en Mérida, allí dictó 2 conferencias magistrales que son recordadas por la forma clara, amena y de una gran actualidad.

El profesor Raymundo era una persona alegre, sencilla y comprensiva en su trato y mantenía una conversación fluida, basada en su gran cultura humanística y dermatológica; hablaba muy bien el castellano. No creo que alguien pueda olvidar su conferencia sobre las enfermedades dermatológicas en algunos animales, por lo original e interesante de dicha exposición. Se distinguió a nivel Brasilerero y mundial por el estudio de la Paracoccidioidomycosis y el Pénfigo. Trabajó en el Hospital Das Clínicas hasta hace pocos años y luego fue Jefe de Servicio en el Hospital Paulista en Sao Paulo Brasil. Deja esposa y 5 hijos, dos de ellos médicos, uno es dermatólogo.

En Venezuela hay varios alumnos que se formaron, quienes no olvidarán su sencillez, su comprensión y su sabiduría; además deja muchos amigos que lo recordaremos siempre.

Paz a sus restos.

Dr. Antonio José Rondón Lugo.