

# *Queratinocitos modificados genéticamente por vectores retrovirales*

## *Aplicaciones*

Martha Ligia Arango, Luz Marina Restrepo · Medellín

**Objetivo:** revisar la literatura relacionada con la utilización de queratinocitos como células blanco de transferencia de genes en general y utilizando vectores retrovirales como vehículo de transferencia en particular.

**Fuente de los datos:** se describen resultados obtenidos acerca del tema mencionado, publicados en las principales revistas de investigación en dermatología y terapia génica; además información obtenida de revisiones recientes publicadas por expertos en el área y algunas páginas web.

**Selección de los datos:** se seleccionaron los datos más relevantes en relación con el tema propuesto, de trabajos publicados en los últimos 10 años, en los cuales se abordara experimentalmente el tema.

**Extracción de los datos:** se incluyeron datos obtenidos de algunas páginas web especializadas en el tema de queratinocitos, transferencia de genes y vectores retrovirales (<http://info.med.yale.edu/>). ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). entre otros. Adicionalmente, datos de publicaciones y revisiones que tuvieran relevancia en áreas como: principios generales de transferencia de genes, tipos de vectores más utilizados, aplicaciones más importantes de los queratinocitos, importancia, ventajas y desventajas de estas células como células blanco de transferencia. Las bases de datos utilizadas fueron: Entrez [Home.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/). SRS:<http://srs.ebi.ac.uk/>, DBGET: [www.genome.ad.jp/dbget/dbget2.html/](http://www.genome.ad.jp/dbget/dbget2.html)

**Síntesis de los datos:** las bases de la terapia génica fueron cimentadas a principios de la década de los 60; este progreso científico continuó en los años ochenta con el desarrollo de las técnicas de clonación de genes, los vectores virales, los cultivos celulares y las técnicas de transfección *in vitro*. La comprensión de los procesos moleculares y celulares de muchas enfermedades, permitió pensar en la transferencia de genes como una herramienta terapéutica para el tratamiento tanto de enfermedades heredadas como adquiridas. Igualmente la transferencia de genes ha hecho posible introducir y expresar material genético exógeno en las células somáticas de mamíferos, proporcionando una poderosa herramienta para el estudio de la función y la regulación genética.

Los queratinocitos han sido utilizados como células blanco para transferencia de genes. Tienen un amplio espectro de aplicaciones clínicas, ya que conforman un tejido que produce diferentes factores de crecimiento y citoquinas y secretan proteínas con acciones locales y sistémicas. Pueden ser modificados por diferentes métodos, de los cuales, el más utilizado tanto para estudios preclínicos como clínicos, se basa en vectores retrovirales.

El propósito de esta revisión es describir las aplicaciones y ventajas de los queratinocitos como célula blanco para la transferencia de genes, mediada por los vectores retrovirales.

**Conclusiones:** la accesibilidad de la piel como blanco terapéutico representa un potencial excitante en el desarrollo de protocolos de terapia génica para enfermedades cutáneas y algunas enfermedades metabólicas. Se ha logrado *in vivo* la reversión fenotípica para epidermolisis bullosa y para la ictiosis laminar e *in vitro* para el xeroderma pigmentoso.

Trabajo realizado con el apoyo de los Fondos de Estampilla de la Vicerrectoría de Investigaciones (E00320 y proyectos de mediana cuantía), Universidad de Antioquia. Lie, Martha Ligia Arango R<sup>Bacterióloga</sup>, U. de Antioquia, Estudiante de Maestría Corporación Ciencias Básicas Biomédicas., Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; Luz Marina Restrepo M.: Bióloga, U. de Antioquia, Doctora en Ciencias, Universidad París VII. París-Francia Profesora Asistente, Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética. Facultad de Medicina Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia.

**Estos resultados positivos pueden llevar rápidamente a protocolos clínicos basados en la utilización del trasplante de epitelios artificiales reconstruidos *ex vivo* usando queratinocitos genéticamente modificados. Igualmente, se han obtenido resultados exitosos en algunas enfermedades metabólicas; en estas enfermedades el trasplante de epitelios artificiales autólogos que expresen los transgenes de interés representa una aproximación terapéutica potencial para la liberación sistémica de moléculas activas. A pesar de los logros alcanzados, se requiere todavía el desarrollo de protocolos eficientes para la transducción de células madres epidérmicas, al igual que información sobre la respuesta inmune producida por los queratinocitos trasplantados hacia los polipéptidos recombinantes. (Acta Med Colomb 2001; 26: 245-251)**

**Palabras clave:** *queratinocito, terapia génica, vectores retrovirales, transferencia de genes, piel.*

### **Biología básica de los retrovirus**

Los primeros estudios sobre retrovirus se llevaron a cabo en retrovirus oncogénicos, aislados de huéspedes murinos y de aves (1, 2). Estos virus poseen estructuras genómicas similares y son capaces de iniciar los procesos de transformación celular que dan origen a enfermedad neoplásica en sus respectivos huéspedes naturales

Los retrovirus poseen dos cadenas idénticas de ácido ribonucleico (ARN) simple monocatenario que se encuentran, al igual que sus enzimas de replicación, contenidas dentro de una cubierta proteica viral; esta estructura está rodeada por la envoltura viral, cuya función es mediar la infección de la célula huésped (Figura 1 A).

La infección se inicia cuando el virion penetra a la célula blanco a través de interacciones específicas entre las glicoproteínas de la envoltura del virion y los receptores expresados en la superficie externa de la célula. La fusión entre la membrana celular y la envoltura viral, permite la internalización del virion ya sea por fusión directa entre estas membranas o por endocitosis; posteriormente, en el citoplasma de la célula se produce la liberación de la cubierta viral, quedando libre el ARN viral, el cual es transcrito por la transcriptasa reversa a una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) que posteriormente se transporta al núcleo de la célula.

Los mecanismos que regulan la transcripción inversa del virion y su transporte al núcleo todavía no se han dilucidado completamente (2). En el núcleo, el ADN viral es integrado establemente en el genoma de la célula blanco. Este ADN integrado se denomina pro virus, el cual se replicará durante el ciclo celular, junto con el material genético de la célula. El ADN proviral es transcrito a ARN y transportado al citoplasma de la célula donde las proteínas y las enzimas de replicación son transcritas y ensambladas junto con el ARN viral, formando una nueva partícula viral con el potencial de infectar a otras células.

### **Vector retroviral**

Los vectores retrovirales se obtienen entonces a partir de retrovirus naturales, a los cuales se les reemplaza parte de sus genes estructurales, por uno o varios genes (Figura IB).

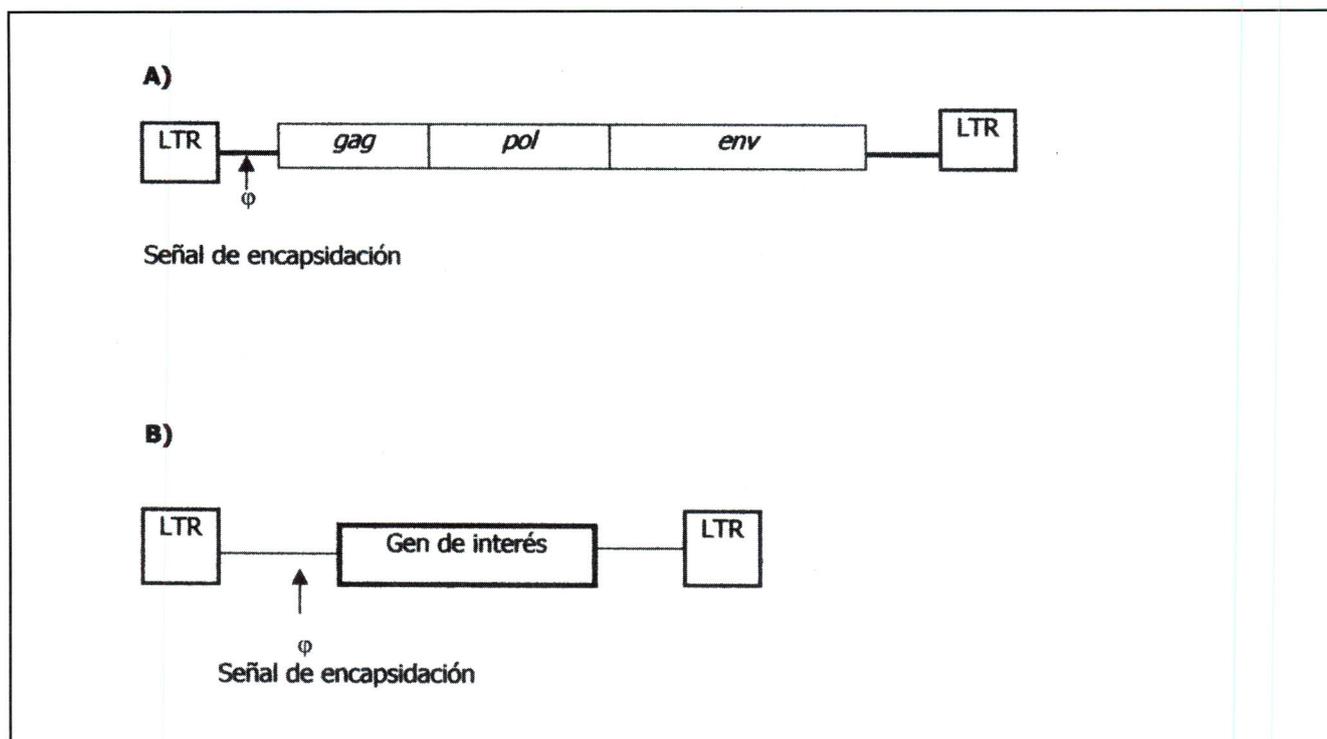
Son producidos únicamente en unas líneas celulares de empaquetamiento, que son capaces de aportar por transcomplementación las proteínas retrovirales estructurales (Figura 2).

### **Ventajas de los vectores retrovirales**

Tienen la capacidad de integrarse en el genoma de la célula blanco infectada y de transmitir la información genética de generación en generación, permitiendo la expresión temporal y en ocasiones definitiva del gen o genes insertados, evitando infecciones repetidas (3); el tamaño del gen insertado puede ser de hasta 8 Kb; una vez integrado en la célula blanco el genoma viral es estable, lo cual reduce la posibilidad de rearrreglos genéticos que puedan potencialmente dar origen a mutaciones o reestructuraciones cromosómicas que afectan la expresión de otros genes (4); son poco inmunogénicos (5); son ideales para aplicaciones *ex vivo*, es decir, en tejidos explantables que son reintroducidos en el individuo una vez modificados (6). Además, poseen un amplio espectro de hospederos e infectan células que están activas mitóticamente (7). Su biología ha sido bien comprendida y por esto su utilización en protocolos experimentales y terapéuticos se incrementa día a día.

### **Queratinocitos como célula blanco para la transferencia de genes con vectores retrovirales**

Los queratinocitos son las células más abundantes de la epidermis; han sido cultivados desde comienzos del siglo, pero fueron Rheinwald y Green quienes en 1975 (8) desarrollaron la técnica que en la actualidad, con algunas modificaciones, permite su crecimiento y proliferación con un alto grado de expansión celular y la formación de un epitelio estratificado y queratinizado (9). Los queratinocitos se obtienen fácilmente por pequeñas biopsias de piel, su crecimiento en cultivo es rápido y son capaces de diferenciarse generando distintas poblaciones celulares (10). Los clones con un alto potencial de crecimiento, formados por los queratinocitos basales o células madres proliferativas se denominan holoclones; los meroclones son células que experimentan varios ciclos de división antes de llegar a la



**Figura 1.** Representación esquemática simple de un vector retroviral:

**A)** *Gag* y *pol* codifican para proteínas que forman la cápside y para las enzimas de replicación respectivamente. El gen *env* codifica para glicoproteínas de la envoltura. Estos genes estructurales están localizados entre dos secuencias idénticas denominadas LTR (por long terminal repeat) localizadas a cada extremo del genoma viral. **B)** Los genes que codifican para las proteínas estructurales son eliminados y reemplazados por un gen de interés, el cual puede ser un gen marcador (reportero), un gen terapéutico o ambos. El vector resultante es defectuoso o incompetente para la replicación sin estas proteínas estructurales, pero conserva la señal de encapsidación.

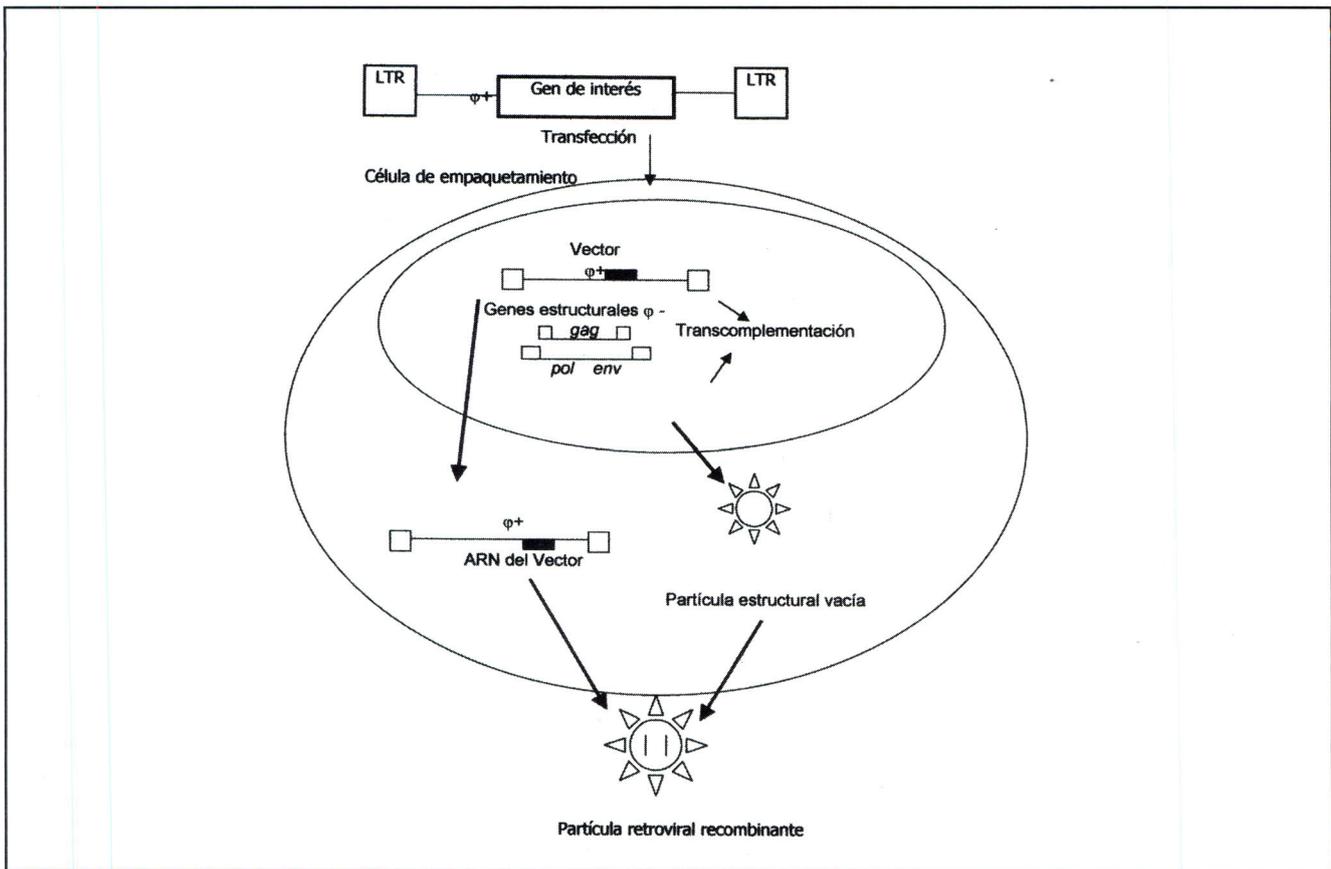
senescencia y la tercera población celular son los paraclones con un potencial de crecimiento limitado.

Los queratinocitos hacen parte de un tejido productor de diferentes factores de crecimiento y de citoquinas; esto les confiere la propiedad de ser muy eficientes en la expresión y secreción de proteínas, que pueden ejercer acción tanto local como sistémica (11). Modificados genéticamente por vectores retrovirales, han expresado exitosamente genes humanos como el gen que codifica para la hormona de crecimiento humana (hGH) (12), para el factor IX de la coagulación (13), para la apolipoproteína (apoE) (14), y para la enzima adenosina desaminasa (ADA) (15).

La expresión local de genes en la epidermis, puede ser utilizada en la corrección de genes defectuosos que causan enfermedades de la piel tales como la epidermolisis bulosa, la cual comprende una familia de enfermedades ampollas de la piel, que involucra disociación de la unión dermoepidérmica y resulta de mutaciones en genes que codifican para proteínas estructurales vitales de los hemidesmosomas como la BP180 (*bullous pemphigoid antigen* 180). En 1999 mediante un vector retroviral, se modificaron genéticamente cultivos de queratinocitos primarios provenientes de pacientes con deficiencia en la proteína BP180, lo cual llevó a la restauración completa de la proteína mencionada *in vitro* (16). Otra enfermedad de la

piel en la que se han realizado ensayos experimentales *in vitro* y posteriormente en ratones atómicos *in vivo*, es la ictiosis laminar. Esta enfermedad ocasionada por la falta de expresión de la enzima transglutaminasa 1 (TGasa 1), lleva a que los pacientes tengan una diferenciación epidérmica anormal y sufran severos episodios de deshidratación. La modificación de cultivos primarios de queratinocitos provenientes de pacientes con deficiencia en la enzima TGasa 1 con el vector retroviral LZRS, el cual contenía el gen para esta enzima, evidenció *in vitro* la transferencia exitosa del gen y la restauración de la expresión de la proteína en los queratinocitos; al injertar los cultivos en ratones atómicos se observó histológicamente la corrección de la arquitectura epidérmica (17).

Los queratinocitos genéticamente modificados pueden ser usados para metabolizar sustancias tóxicas que se acumulan en la sangre en ciertas enfermedades como es el caso de la deficiencia de la enzima adenosina desaminasa (ADA), donde la acumulación de adenosina (Ado) y deoxiadenosina (dAdo) son tóxicas para los linfocitos y llevando al paciente a sufrir un síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID). Esta propiedad de la epidermis como reservorio de producción continua de una enzima, fue confirmada en un ensayo realizado en cultivos primarios de queratinocitos provenientes de prepucios de niños con deficiencia de ADA, los cuales fueron transducidos con el



**Figura 2. Partícula retroviral recombinante. Línea celular de empaquetamiento.** El vector retroviral defectuoso es transfectado en una línea celular (célula de empaquetamiento) que ha sido modificada previamente para expresar las proteínas virales estructurales (partículas vacías). Por transcomplementación con el vector retroviral se encapsidan partículas infecciosas portadoras del vector. Este infecta la célula blanco, se integra en el genoma de la misma y el ciclo de infección se detiene allí, pues el vector sin las proteínas estructurales que aporta la línea de encapsidación es incapaz de replicarse.

vector retroviral LASN que transportaba el gen humano para la ADA. Los resultados confirmaron la capacidad de estos queratinocitos modificados para desaminar 5.5 veces más eficientemente la desoxiadenosina *in vitro*, comparados con los cultivos de queratinocitos provenientes de niños no deficientes. Se observó además, que los queratinocitos transducidos expresaron actividad ADA durante 5 subcultivos, lo que sugirió una integración y expresión estable del gen (15).

Otra enfermedad en la cual los queratinocitos son utilizados como catabolizadores metabólicos es la atrofia gyrata, una enfermedad progresiva que conlleva a la ceguera. Está asociada con la deficiencia de una enzima, la ornitina aminotransferasa (OAT). Queratinocitos autólogos de pacientes que carecen de esta enzima fueron modificados con un vector retroviral para expresar altos niveles de OAT para el catabolismo de la ornitina; los cultivos modificados expresaron más de 75 veces OAT que los cultivos sin modificar y metabolizaron *in vitro* la ornitina en un porcentaje significativamente más alto que los queratinocitos sin modificar (18).

Una de las aplicaciones más importantes y que ha generado más interés, ha sido el uso de cultivos de

queratinocitos en el tratamiento de quemaduras. El uso de cultivos de queratinocitos genéticamente modificados como sustitutos de piel, permite la síntesis local y la liberación de factores de crecimiento epidérmicos para el tratamiento de pacientes con quemaduras severas y úlceras crónicas. Esto ha sido evaluado en algunos estudios, donde utilizaron vectores retrovirales que transfirieron copias estables de genes que codifican para diferentes factores de crecimiento como el factor derivado de plaquetas (PDGF-A) y el factor de crecimiento insulinoide (IGF-1). Posterior a la integración estable de estos genes, las células secretaron niveles significativos de estos factores y crecieron formando una monocapa, la cual fue trasplantada a ratones atímicos; siete días después del trasplante, los injertos de piel secretaban PDGF- A o IGF-1 y se observó que la síntesis de tejido conectivo subyacente al injerto, fue significativamente más gruesa y mostró un incremento en la celularidad y vascularidad (19). Esto demuestra que la función de los sustitutos de piel puede ser incrementada por modificación genética, favoreciendo la cicatrización, mejorando la reparación del tejido, reduciendo la estancia hospitalaria y aumentando la sobrevida del paciente (20).

## Dificultades en la expresión de genes en los queratinocitos

Un estudio llevado a cabo en 1987 con un vector retroviral que contenía el gen para la hGH, mostró la modificación exitosa de los queratinocitos en cultivo con este vector, produciendo alrededor de 72 ng de hGH en  $10^6$  células por día; pero cuando estos cultivos se injertaron posteriormente en ratones atímicos, no se detectaron niveles de la hGH en los sueros de los ratones (12). Esta pérdida temprana de la expresión del gen *in vivo* se atribuye a la inactivación por las células de promotores exógenos como los LTR del vector retroviral.

Otro trabajo que corrobora esta pérdida temprana en la expresión del gen en queratinocitos humanos, fue realizado con el vector retroviral LIXSN que contenía el gen para el factor IX de la coagulación. En cultivo, se observó que la expresión del factor IX era estable durante 10 semanas; sin embargo *in vivo*, se detectó una disminución del factor IX en el suero de los ratones en los primeros días postinjerto (13). Estos y otros resultados han llevado a la búsqueda de alternativas para contrarrestar la pérdida temprana de la expresión del gen *in vivo*, empleando promotores específicos de tejidos, a partir de los cuales se puedan expresar genes exógenos por un período más prolongado. Uno de estos trabajos se realizó con un vector retroviral que contenía el gen para la hGH, expresado a partir del promotor de la queratina 14. Su expresión fue detectada inicialmente en cultivo y posteriormente *in vivo*. Cuando se injertaron estos cultivos en ratones atímicos, la hormona se produjo, se secretó y se transportó exitosamente a la circulación (21). Otro estudio utilizando los promotores endógenos de las queratinas K5 y 14, fue realizado en 1997 con un vector retroviral que contenía el gen para el factor IX de la coagulación; este vector se utilizó para modificar cultivos de queratinocitos humanos; cuando estos cultivos modificados fueron injertados en ratones atímicos se detectó en el plasma de los mismos niveles del factor IX, desde 0.02-9 ng/ml durante el tiempo de sobrevida del injerto (cuatro a cinco semanas); esto demuestra la efectividad y utilidad de estas células como biorreactores para el suministro de factores con acción sistémica (22).

## Perspectivas

El papel potencial de la terapia génica en dermatología incluye varias posibilidades como son: la corrección de enfermedades tanto heredadas como adquiridas, la liberación sistémica de citoquinas, enzimas y moléculas solubles por queratinocitos modificados (1), y el desarrollo de nuevos protocolos experimentales y clínicos para tratar otras enfermedades de la piel como son la psoriasis, la hiperqueratosis epidermolítica y el cáncer de piel (melanoma y carcinoma de las células escamosas) (23). La psoriasis, una alteración hiperproliferativa de los queratinocitos podría ser tratada con un inhibidor de crecimiento como es el factor transformante de crecimiento (TGF $\beta$ ) (24); la hiperque-

ratosis epidermolítica, causada por una mutación en las queratinas 1 o 10 (KI, 10) podría ser tratada con vectores diseñados para inhibir la expresión del alelo mutado o sobreexpresar el gen de la queratina normal (23). Aunque en el cáncer de piel existen varios procedimientos quirúrgicos para eliminar las neoplasias, se ha pensado que la terapia génica podría ser una alternativa terapéutica especialmente en tumores diseminados, metastásicos, aumentando la vigilancia inmunológica (1) e induciendo la muerte en las células tumorales, o una terapia específica, en la cual el gen responsable de la neoplasia sea el blanco de modulación o inactivación (24).

Varios grupos de investigación están tratando de aislar por medio de marcadores de superficie celular específicos como las  $\beta$ 1 integrinas y proteínas específicas basales como la basonucleína, las células madres proliferativas de la epidermis responsables de toda la renovación celular, tanto de células especializadas como de sí mismas a través de toda la vida del individuo (25-27). Una de las ventajas de utilizar cultivos de células madres proliferativas en pacientes quemados o con úlceras crónicas, es la sobrevida del injerto por un tiempo más prolongado (25, 28).

Una condición importante para la expresión estable del transgen es la respuesta inmune limitada o ausente contra los polipéptidos producidos por las células modificadas. Este riesgo potencial existe especialmente en desórdenes como la epidermolisis bullosa, asociada con producción defectuosa de laminina-5 o colágeno XVII, ya que estas moléculas de adhesión que son secretadas en la matriz extracelular están también involucradas en desórdenes autoinmunes. Es necesario evaluar la tolerancia del huésped a los productos génicos liberados y determinar los riesgos que las reacciones inmunes pueden representar antes de pasar de los modelos preclínicos a los clínicos (29). Los modelos animales pueden proveer información sobre la respuesta inmune a largo plazo contra la laminina-5 y sobre la persistencia del tejido regenerado (30).

En nuestro grupo de investigación estamos implementando actualmente la tecnología para la transferencia de genes, utilizando queratinocitos como célula blanco de modificación genética, por sus numerosas ventajas y por sus posibles aplicaciones en el futuro. El modelo nos permitirá igualmente el estudio de muchos procesos biológicos básicos.

Hemos iniciado los protocolos de modificación genética en cultivos de queratinocitos derivados del material sobrante de procedimientos quirúrgicos básicamente de circuncisiones. La modificación se lleva a cabo con el vector retroviral FOCH29-NeoR derivado del virus de Friend, que posee el gen de resistencia a la neomicina y el cual ha mostrado en células madres hematopoyéticas una alta eficiencia de transducción (31). Una vez establecido el modelo, nuestro objetivo principal estará dirigido a la modificación de queratinocitos con factores de crecimiento y la determinación de su posible utilización en el tratamiento de

pacientes con quemaduras severas o con úlceras crónicas difíciles de cicatrizar.

### Summary

**Objective:** to review recent literature concerning the utilisation of keratinocytes as target cells for gene transfer and retroviral vectors as modifying systems for these cells.

**Source of data:** papers published in the major dermatology and gene therapy journals addressing directly the issue were selected, as well as comprehensive reviews published by leading experts in the specific area of research.

**Data selection:** all data were collected from original papers addressing skin, keratinocyte gene therapy and retroviral vectors published in the last 10 years.

**Extraction of data:** the information was selected from some specialized web pages in keratinocytes, gene transfer, retroviral vectors, by its relevance to the topic (<http://info.med.vale.edu/>), ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)). Additionally, data from publications and reviews in areas such as gene transfer principles, vectors types, keratinocyte applications, importance, advantages and disadvantages of these cells as targets for gene transfer were also reviewed. The data base used were: Entrez [Home.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/). SRS:<http://srs.ebi.ac.uk/>, DB GET: [www.genome.ad.jp/dbget/dbget2.htm](http://www.genome.ad.jp/dbget/dbget2.htm) /

**Summary of the data:** gene therapy has received much attention during last decade as a novel method for treating inherited and acquired diseases. The introduction and expression of a foreign gene provide a powerful tool for studying the basic processes of a particular type of cell. Keratinocytes have been used as suitable target cells for gene therapy. They have a wide spectrum of clinical applications since keratinocytes produce different growth factors, cytokines, and secreted proteins with local and systemic action. Keratinocytes can be modified by different methods; being the retroviral vector system the most extensively studied and used for preclinical and clinical gene transfer trials. Most of the retroviral vectors are derived from murine oncogenic retroviruses that have shown successful expression in human gene transfer. In this review, the authors describe some applications of keratinocytes retroviral transduction and the advantages of these cells as targets for gene transfer.

**Conclusions:** the easy accessibility of the skin as a therapeutic target provides an exciting potential for the development of gene therapy protocols for some cutaneous and metabolic disorders. Phenotypic reversion has been achieved *in vivo* for junctional epidermolysis bullosa and lamellar ichthyosis and *in vitro* for xeroderma pigmentosum. These positive results should prompt clinical trials based on transplantation of artificial epithelia reconstructed *ex vivo* using genetically modified keratinocytes. Promising results have also been obtained in metabolic diseases. In these diseases, transplantation of autologous artificial epi-

thelia expressing the transgenes of interest represents a potential therapeutic approach for the systemic delivery of active molecules. However, it is necessary to develop protocols for efficient gene transfer to epidermal stem cells and information about the host immune response to the recombinant polypeptides produced by the implanted keratinocytes.

**Key-words:** *keratinocytes, genetherapy, retroviral vectors, skin.*

### Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de los Fondos de Estampilla de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Antioquia. Igualmente, a los profesores del Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética por la lectura y comentarios realizados al manuscrito.

### REFERENCIAS

1. Katz S. Prospects for targeted gene therapy. *Clin Exp Dermatol* 2000; 25:157-159.
2. Gary L, Buchsacher J, Flossie W. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 2000; 95:2499-2504.
3. Fenjves E. Approaches to Gene Transfer in Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1994;103:70s-75s.
4. Barrandon Y, Morgan J, Mulligan R. Restoration of growth potential in paraclones of human keratinocytes by a viral oncogene. *Proc Natl Acad sci USA* 1989;84:4102-4106.
5. Dusty A. Retrovirus Packaging Cells. *Hum Gene Ther* 1990;1:5-14.
6. Varmus H. Retroviruses. *Soc* 1998; 240:1427-1434.
7. Miller D, Mohammed A, Miller D. Gene Transfer by Retrovirus Occurs Only in cells That Are Actively Replicating at the Time of Infection. *Molecular And Cellular Biology* 1990;10:4239-4242.
8. 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.
9. Green H. El tratamiento de enfermedades mediante cultivos celulares. *Investigación y ciencia* 1992; 62-69.
10. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad sci USA* 1987;84:2302-2306.
11. Krueger G, Morgan J, Jorgensen M. Genetically Modified Skin to Treat Disease: Potential and Limitations. *J Invest Dermatol* 1994;103:76s-84s.
12. Morgan J, Barrandon Y, Green H. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Sen* 1987; 237:1476-1479.
13. Fenjves E, Kurachi K, Taichman L. Loss of Expression of a Retrovirus-Transduced Gene in Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1996;106:576-578.
14. Meng X, Sawamura D, Tamai K. Keratinocyte Gene Therapy for Sistemic Diseases. *J Clin Invest* 1998; 101:1462-1467.
15. Pauline M, Schwartz R, Blaese M. Keratinocyte gene therapy for adenosine deaminase deficiency: A model approach for inherited metabolic disorders. *Hum Gene Ther* 1997; 911-917.
16. Vailly J, Gagnoux P, Ambra , Romero C, Pinolo M, Zambruro G, et al. Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia. *Gene Ther* 1998;5:1322-1332
17. Choate K, Medalie D, Morgan J. Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. *Nat Med* 1996; 2:1263-1267.
18. Jensen T, Sullivan D, Morgan R, Taichman L, Blaese R, Csaky H, et al. Retrovirus mediated gene transfer of ornithine-delta-aminotransferase into keratinocytes from gyrate atrophy patients. *Hum Gene Ther* 1997;8:2125-213215
19. Eming S, Yarmush M, Morgan J. Enhanced Function of cultured epithelium by genetic modification: cell-based synthesis and delivery of growth factors. *Biotech and Bioeng* 1996;52:15-23.
20. Harcuch W. La epidermis humana cultivada *in vitro* para el tratamiento de quemaduras. *Gac Med Mex* 1995;133:571-576.
21. Wang X, Zinkel S, Polonsky K. Transgenic studies a keratin promoter-driven growth hormone transgene:Prospects for gene therapy. *Proc Natl Acad sci USA* 1997;94:219-226.

22. **Page S, Brownlee G.** An *ex vivo* keratinocyte model for gene therapy of hemophilia B. *J Invest Dermatol* 1997; **109**:139-145.
23. **Greenhalgh D, Rothnagel J, Roop D.** Epidermal An Attractive Target tissue for Gene Therapy. *J Invest Dermatol* 1994; **103**:63s-69s.
24. **Krueger G, Morgan J, Jorgensen M, Schmidt L, Kwan K, Boyce T, et al.** Genetically Modified Skin to Treat Disease: Potential and Limitations. *J Invest Dermatol* 1994; **103**:76s-84s.
25. **Pellegrini G, Bondanza S, Guerra L, De Luca M.** Cultivation of human Keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput* 1998; **36**:778-790.
26. **Pellegrini G, Ranno R, De Luca M.** The control of epidermal Stem Cells (Holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultures on fibrin. *Transplantation* 1999; **68**:868-879.
27. **Mathor M, Ferrari G, De Luca M.** Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc Natl Acad sci USA* 1996; **93**:10371 - 10376.
28. **Dellambra E, Pellegrini G, Guerra L, Ferrari G, Zambruno G, Mavilio F, De Luca M.** Toward epidermal stem cell-mediated *ex vivo* gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 2000; **11**:2283-2287.
29. **Spirito F, Meneguzzi G, Danos O, Mezzina M.** Cutaneous gene transfer and therapy: the present and the future. *J of Gene Medecine* 2001 ;**3**:21-31.
30. **Spirito F, Capt A, Ortone J, Guaguere E, Meneguzzi G.** Mild junctional epidermolysis bullosa in dogs. A natural model for experimental gene therapy of the condition. *J Invest Dermatol* 1999; **113**:445.
31. **Restrepo LM, Bayer J, Masset M, Pellerain N, Marolleau J, Marty M, et al.** Transduction of CD34+ PBSC Mobilized in Cancer Patients using a Novel FrMuLV Retrovirus Vector Derived from FB29 Highly Titrating Strain. *Gene Ther* 1998; **105**:83-90.