

## LA PIEL COMO SISTEMA DE TERAPIA CELULAR Y GÉNICA

(dermatología/injerto/cultivo celular/úlceras cutáneas)

JOSÉ L. JORCANO

Unidad de Biología Molecular y Celular - CIEMAT. Avda. Complutense, n.º 22. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid.

Presentado por Pedro García Barreno, 7 de mayo de 1997

De todos los recientes avances farmacológicos y terapéuticos, ha sido la aparición de las terapias celular y génica la que ha despertado un mayor interés tanto en la comunidad científica como en el público y los medios de comunicación, y, aunque su desarrollo ha demostrado que el llegar a resultados reproducibles y de utilidad hospitalaria va a requerir un esfuerzo y un plazo temporal mayores que los originalmente estimados, existen pocas dudas acerca del potencial de estas nuevas disciplinas para tratar de encontrar soluciones a enfermedades inabordables por los métodos existentes en el presente.

Se entiende por terapia génica la introducción de un gen exógeno en una célula recipiente (transducción) con fines terapéuticos. A través de esta técnica se están desarrollando métodos para abordar un amplio rango de enfermedades, tanto hereditarias como adquiridas, incluyendo algunas de las de mayor incidencia en los países desarrollados, tales como las enfermedades cardiovasculares o el cáncer (1,2). La terapia celular permite, a través del trasplante al paciente de células de él mismo o de un donante, frecuentemente expandidas *in vitro*, abrir nuevas vías en el tratamiento de dolencias como la diabetes, quemaduras extensas, degeneraciones del sistema nervioso, etc... La posibilidad de llevar a cabo estas nuevas formas de terapia nace de los avances llevados a cabo en la última década en el campo de la Biología Molecular y Celular, que han conducido a un mejor entendimiento de las bases moleculares y celulares de las enfermedades, así como al perfeccionamiento de métodos que permiten introducir información genética en células y animales y regular su expresión.

La piel es un tejido de una gran importancia, objeto de un intenso estudio en los últimos años, debido a que es la barrera que nos protege de los agresores externos a la vez que el blanco de numerosas enfermedades, algunas de alta incidencia como la psoriasis o los tumores cutáneos. Este tejido consta de dos compartimentos celulares diferentes: la epidermis, que es el más externo, y la dermis. La epidermis es un epitelio estratificado formado por un tipo fundamental de células, los queratinocitos. Los tipos celulares más importantes de la dermis son los fibroblastos y las células endoteliales de los capilares sanguíneos. Estos tres tipos de células son potenciales blancos de terapia génica. Los queratinocitos han sido ob-

jeto de un intenso estudio durante los últimos años, ya que se les considera la parte más importante del sistema (3). Forman diferentes capas celulares o estratos. La capa basal está compuesta por queratinocitos con capacidad proliferativa, los cuales sufren un proceso de diferenciación terminal que les lleva a perder su capacidad de proliferación, a migrar hacia la superficie a la vez que cambian paulatinamente su programa de expresión génica y, finalmente, a morir y formar envueltas córneas. Aunque, en función de cada situación concreta, puede resultar interesante alterar genéticamente cualquier estrato epidérmico, en la mayor parte de los casos las células blanco serán las basales ya que en este estrato se encuentran las células progenitoras o *stem* del tejido, es decir, aquellas que a través de divisiones asimétricas mantienen su propio número a la vez que dan lugar a otras células que diferencian hacia los tipos más especializados propios del tejido.

Aunque se trata de un campo en sus primeras etapas de desarrollo, es unánimemente reconocido que los queratinocitos de piel poseen un gran potencial para su uso en protocolos de terapia génica y celular, tanto de enfermedades sistémicas como de enfermedades propias de la piel, bien sean éstas consecuencia directa de defectos genéticos de las células epidérmicas o efectos secundarios de otras enfermedades o debidas a traumatismos. Las razones que avalan este potencial de la epidermis como sistema de terapia génica son:

- 1) Es el más accesible de todos los tejidos somáticos, lo que facilita tanto su manipulación como la observación del resultado de ésta.
- 2) Se tiene un buen conocimiento de la biología molecular y celular de estas células.
- 3) Es posible cultivarla y expandirla *in vitro*.
- 4) Aunque todavía son insatisfactorios, los métodos para introducir información genética en piel existen y son perfeccionables.
- 5) Los queratinocitos genéticamente alterados son capaces de secretar el producto del gen exógeno en el torrente sanguíneo.

- 6) Existe suficiente experiencia hospitalaria en el transplante de piel humana y en el de láminas de queratinocitos cultivados, siendo esta operación relativamente poco gravosa para el paciente, sobre todo si se compara con los trasplantes de médula ósea o hígado, otros dos tejidos de intensa investigación de cara a su uso en este campo y que implican operaciones que pueden comprometer la vida del paciente.

### INJERTOS DE PIEL CULTIVADA EN EL TRATAMIENTO DE HERIDAS EXTENSAS Y CRÓNICAS (LA PIEL COMO SISTEMA DE TERAPIA CELULAR)

Recientemente, el desarrollo y perfeccionamiento del cultivo *in vitro* de queratinocitos de piel humana ha permitido obtener, a partir de una pequeña biopsia, varios metros cuadrados de láminas de este epitelio para su uso en trasplantes (4) (Figura 1). En cultivo, los queratinocitos primarios dan lugar a colonias formadas por la progenie de un único queratinocito con capacidad mitótica, es decir, una célula originalmente basal. Estas colonias, al crecer, se fusionan y estratifican, dando lugar a una lámina de queratinocitos que se puede separar del frasco de cultivo mediante tratamiento con dispasa. Los holoclones, o colonias formadas a partir de una célula *stem*, tienen un gran potencial de crecimiento; un holoclón puede duplicarse unas 150 veces, dando lugar a  $1 \times 10^{40}$  células, es decir, suficiente epidermis para cubrir varias veces la superficie corporal de un adulto ( $1.5\text{-}2 \text{ m}^2$  o aproximadamente  $8 \times 10^{10}$  queratinocitos) (5,6).

Las láminas de queratinocitos fueron usadas clínicamente por primera vez en 1981 (7) con dos pacientes quemados, comprobándose que daban lugar a una epidermis estable y, desde entonces, han sido ampliamente usadas en numerosos centros alrededor del mundo (8,9,10 y referencias allí citadas), fundamentalmente con quemados extensos, para los que prácticamente constituyen la única terapia salvadora (se han llegado a salvar niños con el 90% de la superficie corporal quemada). A pesar de la fragilidad de la epidermis durante los primeros meses y de los cuidados post-operatorios requeridos, la mejora y estandarización, tanto de los cultivos como de los métodos quirúrgicos, han llevado a resultados más que aceptables tanto en términos de toma (60% en promedio) como cosméticos, similares o, a veces, superiores a los obtenidos con los injertos de piel mallada del propio paciente. Ésto ha promovido la ampliación del uso de estos autoinjertos de queratinocitos cultivados al tratamiento de problemas que no ponen en peligro la vida del paciente, tales como el nevus congénico gigante.

Estos trasplantes han permitido, además, extraer dos tipos de enseñanzas importantes: a) El hecho de que estos trasplantes hayan regenerado de un modo estable y temporalmente ilimitado la epidermis de los pacientes, demuestra que los métodos de cultivo existentes permiten preservar las células progenitoras (*stem*) del tejido. Este hecho crucial es el que permite plantearse el uso de la epidermis como un vehículo de terapia génica permanente, a partir de autoinjertos

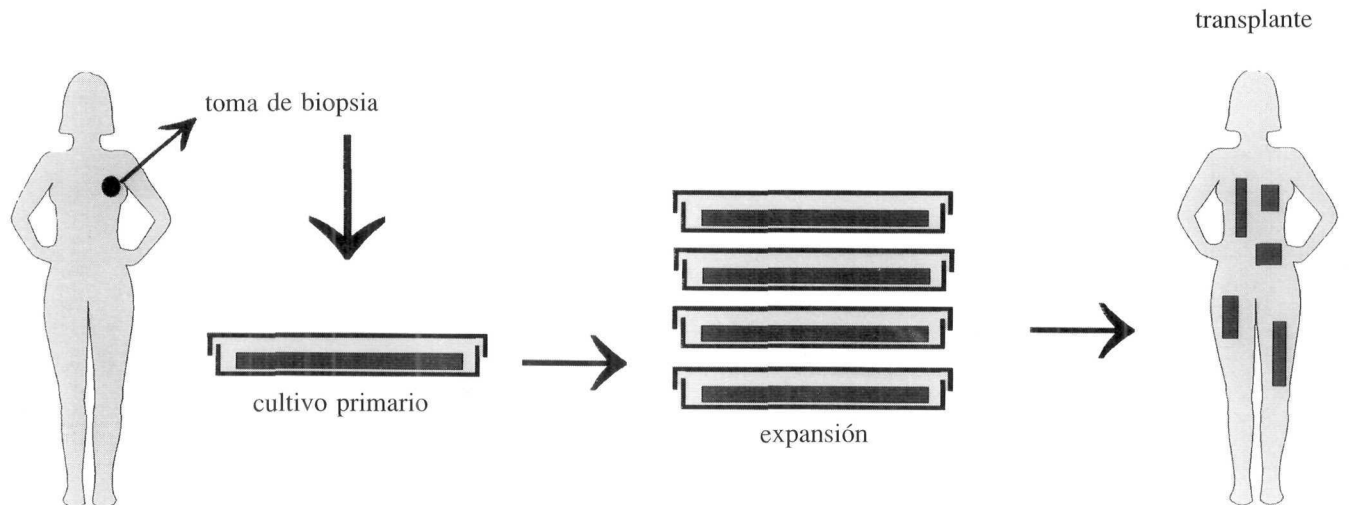
de queratinocitos del propio paciente debidamente modificados genéticamente. b) Tanto para mejorar la estabilidad y manejo mecánico del propio injerto como, sobre todo, para incrementar el porcentaje de toma así como la velocidad de la normalización y el resultado cosmético del trasplante, es muy importante incluir en éste un componente dérmico. Varios tipos de componentes dérmicos han sido ensayados y se siguen ensayando en la actualidad, siendo los más comunes los que contienen fibroblastos dentro de geles de colágeno, aunque también se han usado matrices a base de fibrina o conteniendo células endoteliales o melanocitos además de fibroblastos (8,9,10). Estos equivalentes de piel total han sido todavía poco ensayados en pacientes, con resultados prometedores aunque poco reproducibles, por lo que, siendo evidentemente el método de elección en el futuro, necesitan ser perfeccionados.

Los trasplantes de piel total entre dos individuos (aloinjertos) dan lugar a una respuesta clásica de rechazo que en algunos casos ha sido controlada por tratamientos inmunosupresores. En los cultivos de queratinocitos *in vitro* no se observa la presencia de células de Langerhans (células linfocitarias de la piel), lo que dió pie a creer que estos cultivos no serían rechazados. Aunque este aspecto fué objeto de discusión durante varios años, datos recientes demuestran que, en humanos, los aloinjertos de láminas cultivadas son progresivamente sustituidos por queratinocitos del paciente, aunque sin mostrar una respuesta clásica de rechazo (8). Este hecho, unido a la observación de que los queratinocitos del aloinjerto estimulan el crecimiento de los del propio paciente, probablemente a través de la secreción de factores, ha permitido aplicar con notable éxito estos cultivos a la curación de úlceras crónicas (o tórpidas) (8,13,14,25), que afectan al 0.5-2% de la población en países desarrollados y constituyen un serio problema social, económico y hospitalario. Los aloinjertos hacen posible que, a partir de biopsias de unos pocos donantes, preferentemente niños, puedan prepararse láminas cultivadas para muchos pacientes. Esta ventaja técnica se ve aún incrementada por el hecho de que las láminas cultivadas pueden conservarse congeladas bajo ciertas condiciones sin aparentemente perder su viabilidad y eficacia, aunque este aspecto ha sido cuestionado (13,15). Por otra parte, aloinjertos de queratinocitos genéticamente modificados permitirían abordar terapias génicas temporales en las que la acción del gen terapéutico sólo es necesaria durante un cierto tiempo, evitando los riesgos de portar indefinidamente un gen exógeno cuya función ya no es necesaria pero que podría activarse accidentalmente.

### LA PIEL COMO SISTEMA DE TERAPIA GÉNICA

Como se ha comentado, en los últimos años, estos trasplantes de queratinocitos han sido aplicados con notable éxito a quemados extensos demostrando que los métodos de cultivo existentes permiten preservar las células progenitoras (*stem*) del tejido, lo que permite plantearse el uso de la epidermis como un vehículo de terapia génica permanente, a partir de autoinjertos de queratinocitos del propio paciente debidamente modificados genéticamente. Por otra parte,

- Recientemente, se han puesto a punto condiciones experimentales que permiten cultivar y expandir «in vitro» los queratinocitos de la epidermis humana.
- A partir de una biopsia de piel de 1 cm<sup>2</sup> se puede generar en poco tiempo (2-4 semanas) el equivalente a la superficie corporal.
- La epidermis cultivada «in vitro» se utiliza en trasplantes para tratar quemaduras extensas, grandes lesiones cutáneas y úlceras crónicas. EL CIEMAT colabora con diversos hospitales (Gregorio Marañón, del Aire, Cruz Roja) en el desarrollo y aplicaciones de esta tecnología.



**Figura 1.** La piel como sistema de terapia celular

aloinjertos de queratinocitos genéticamente modificados permitirían abordar terapias génicas temporales.

Además de las anteriormente mencionadas, otra de las ventajas de los queratinocitos para estos propósitos es que, debido a que en la última década han sido objeto de una intensa investigación básica, los laboratorios especialistas poseen métodos que, debidamente puestos a punto, permitirán en principio regular la actividad de los genes introducidos, tanto espacialmente (a diferentes estratos de la epidermis o a diferentes regiones corporales) como temporalmente o en su intensidad.

A pesar de estas evidentes ventajas, en el año 1996 no existía ningún ensayo en humanos aprobado por los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de los EE.UU. utilizando queratinocitos alterados genéticamente. La razón fundamental reside precisamente en que no están suficientemente bien puestos a punto métodos eficaces, flexibles y reproducibles de introducir genes en estas células y de controlar su expresión una vez dentro de ellas (expresión transitoria o permanente, alta o baja, constitutiva o inducible).

Aunque la opción más atractiva, por múltiples razones prácticas, sería desarrollar terapias *in vivo*, es decir, la introducción directa del gen terapéutico en la piel del propio paciente, los experimentos desarrollados en esta dirección no han producido resultados demasiado alentadores (revisado en 16) y, a pesar de la continua mejora de los vectores y sis-

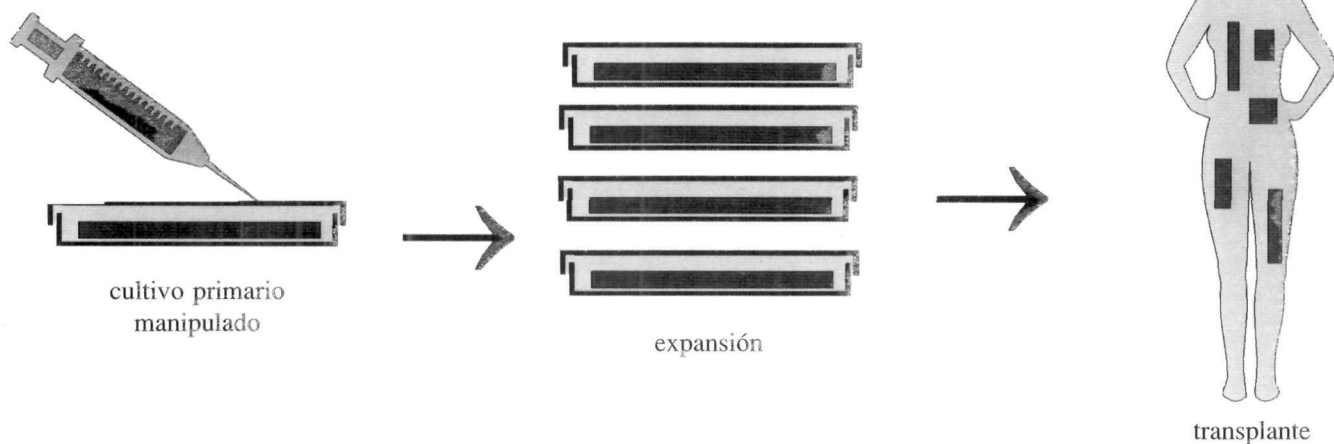
temas de transducción disponibles, los métodos más prometedores en el momento presente implican la alteración de queratinocitos *ex vivo* (es decir, en cultivos primarios) con vectores virales, seguida de un aloinjerto o autoinjerto en función del problema considerado (Figura 2).

Los vectores virales más extensamente ensayados en queratinocitos *in vitro* son los retrovirales. Aunque estas células son transducidas con alta eficiencia y la expresión del transgén se mantiene por largos periodos de tiempo en estas condiciones (5 y referencias allí citadas), el transgén se inactiva pocos días después de que los queratinocitos se injerten en ratones inmunodeficientes, que son el sistema modelo más comúnmente usado (5, 17). Esta inactivación puede ser achacable a diferentes causas:

- 1) Mecanismos poco identificados inactivan específicamente los promotores retrovirales en ciertos tipos celulares en injertos heterólogos (5). Si ésta fuera la razón, este problema no debería presentarse en auto o aloinjertos. Nuestro laboratorio está estudiando este problema utilizando cerdos singénicos como sistema modelo, aunque datos publicados por otros laboratorios no parecen avalar esta hipótesis (18).
- 2) Inactivación intrínseca del promotor del LTR retroviral, probablemente por metilación (17 y referencias allí citadas). Esto podría subsanarse introduciendo en el virus promotores eucarióticos de genes funcionales en piel, tales como los de las queratinas, en cuyo

Adicionalmente, es posible introducir genes exógenos en las células epidérmicas en cultivo con el fin de incrementar sus propiedades terapéuticas. EL CIEMAT está desarrollando, junto con el Hospital Gregorio Marañón, un programa de terapia génica para el tratamiento de úlceras crónicas que afectan a 1-2% de la población y representan un grave y costoso problema hospitalario.

### GENES TERAPÉUTICOS



**Figura 2.** La piel como sistema de terapia génica

uso nuestro laboratorio tiene una gran experiencia tanto *in vitro* como *in vivo* (19).

- 3) Poca capacidad de los retrovirus, que infectan exclusivamente células proliferantes, para transducir las células progenitoras de la piel, que, en general, están quiescentes. Este hecho afecta a todos los tejidos que se renuevan y ha sido muy bien estudiado y parcialmente resuelto en el sistema hematopoyético, quizás por ser éste el tejido pionero en experimentación de terapia génica (20). Este es un problema esencial a la hora de plantearse protocolos de larga duración ya que las células progenitoras son las responsables de mantener la normal renovación del tejido a lo largo del tiempo. Sin embargo, para protocolos de corta duración, este problema podría no ser importante. Para resolverlo, probablemente habrá que seguir los pasos del sistema hematopoyético, a base de cultivar los queratinocitos en presencia de combinaciones de interleuquinas y factores de crecimiento que hagan entrar en ciclo a las células progenitoras, lo que permitiría su transducción por el retrovirus, sin que pierdan su carácter *stem* (20).

Una complicación adicional que presentan los vectores retrovirales es que, debido a que se integran al azar en el genoma receptor, pueden potencialmente alterar de manera indeseada la expresión de genes importantes, tales como oncogenes o genes supresores de tumores. Aunque este fenómeno prácticamente no ha sido observado, su existencia es una de las razones que pone límites al uso de retrovirus en terapia génica humana (véase la ref. 21). Los vectores basados en adenovirus, de más reciente desarro-

llo, aunque, por permanecer episomales en el núcleo de las células infectadas, no presentan este problema, no han sido aún suficientemente ensayados en queratinocitos de piel. Sin embargo, los resultados conocidos muestran que son capaces de infectar estas células con alta eficiencia (23; D. Roop, comunicación personal; resultados no publicados de nuestro laboratorio). Dado que por su naturaleza sólo van a producir una expresión transitoria de los genes introducidos, podrían ser adecuados para terapias de esta índole. En el haber de estos vectores hay que anotar algunas propiedades que los hacen francamente superiores a los retrovirales en aquellos casos en que su aplicación sea adecuada: 1) su capacidad de empaquetar mayores segmentos de DNA exógeno; 2) los mayores títulos que con ellos se obtienen, lo que explica la eficacia con que infectan los cultivos de queratinocitos e, incluso, abre la posibilidad de usarlos en terapias *in vivo*; 3) su capacidad de infectar células tanto quiescentes como proliferativas. Sin embargo, usando estos vectores, está por resolver satisfactoriamente el problema de la respuesta inmunológica disparada por las proteínas que se expresan del adenovirus, que puede acabar destruyendo las células del injerto. Es posible que los vectores adenovirales de última generación, en los que ya no está presente ninguna proteína viral por ser proveídas *in trans* por las células empaquetadoras, sean la solución a este problema.

Otros vectores virales que se están desarrollando son los basados en el virus asociado al adenovirus (AAV). Cuando estén debidamente puestos a punto, estos vectores podrán ser considerados como ideales, ya que a los altos títulos de los adenovirus unen la propiedad de los retrovirus de integrarse en el genoma receptor, pero esta integración se realiza en

una región definida del cromosoma 19 que no parece contener ningún gen esencial, evitándose así los peligros de mutagénesis insercional propios de los retrovirus. El único inconveniente de este vector sería su baja capacidad de empaquetar DNA exógeno (5 kilobases). Por el contrario, vectores plasmídicos basados en su eficiente y preciso sistema de integración cromosómica, que se están desarrollando en el momento presente (22; datos no publicados de nuestro laboratorio), podrían ser los futuros vectores de elección en muchas situaciones ya que los plásmidos permiten usar muy largos segmentos de DNA foráneo, incluyendo regiones reguladoras de expresión génica muy bien caracterizadas y que serían de gran utilidad a la hora de dirigir la expresión de los genes exógenos pero que, debido a su tamaño, no pueden introducirse en vectores retrovirales. Por desgracia, hasta el presente no existen datos publicados acerca de la capacidad del AAV para infectar células epidérmicas, aunque el rango de tipos celulares que es capaz de infectar es muy amplio (16, 23).

Los papilomavirus humanos son también potenciales candidatos futuros a vectores de terapia génica epidérmica, dado que infectan específicamente epitelios estratificados y que, como los adenovirus, permanecen episomales. La observación de que estos virus son capaces de replicarse en queratinocitos humanos en cultivo permite suponer que, aunque aún tienen que ser desarrollados, los vectores en ellos basados pueden llegar a ser muy útiles en la terapia génica cutánea (16, 23).

Finalmente, como se ha comentado, recientemente se están desarrollando métodos de cultivo *in vitro* que pueden ser considerados como auténticos equivalentes cutáneos ya que, además de los queratinocitos, también incluyen otros componentes dérmicos tales como fibroblastos, células endoteliales o, incluso, melanocitos. En el futuro, esto abrirá la posibilidad de modificar genéticamente uno o varios de estos componentes a la hora de diseñar un protocolo de terapia génica cutánea, en función de las características del problema a resolver. De hecho, fibroblastos dérmicos murinos transducidos con un retrovirus que expresaba el factor IX de coagulación y embebidos en un gel de colágeno, tras ser implantados en ratones inmunosuprimidos fueron capaces de producir el factor a niveles detectables en sangre, aunque por pocos días (24).

## TERAPIA GÉNICA DE ÚLCERAS CRÓNICAS

La rápida curación de heridas agudas y crónicas es un objetivo para cirujanos, dermatólogos y, en general, para el sistema sanitario. El tratamiento de úlceras cutáneas en pacientes viejos, diabéticos, parapléjicos o debilitados por otras razones supone un serio problema clínico y económico. En personas mayores estas úlceras cicatrizan siempre con mucha mayor lentitud que en jóvenes, pero úlceras de tipo venoso o decúbito pueden tardar años en curar. Dado el amplio sector de la población afectado (0.5-2% en Europa) y el envejecimiento progresivo de la población en los países desarrollados, se entiende la magnitud del problema y el inte-

rés en encontrarle soluciones. Por ello, aunque no se trata de una enfermedad que ponga en peligro la vida del paciente, nuestro laboratorio está explorando la posibilidad de aplicarle los métodos de la terapia génica.

Como se ha comentado anteriormente, este tipo de úlceras ha sido tratado con resultados muy prometedores a través de aloinjertos de cultivos queratinocitos provenientes de donantes jóvenes, los cuales consiguen inducir el crecimiento de los queratinocitos del propio paciente, que son los que eventualmente cierran la úlcera. Se supone que esta inducción es debida a que los queratinocitos del donante secretan factores que actúan sobre los del paciente. La regeneración de una herida cutánea es un proceso complejo que requiere la acción coordinada de diferentes tipos de células, las cuales, entre otras funciones, producen y secretan más de 20 factores diferentes de crecimiento identificados hasta el momento (26). Una buena parte de ellos son mitógenos de los queratinocitos producidos por los fibroblastos dérmicos o por la variedad de células hematopoyéticas que se concentran en la herida. Este es el caso del KGF, del EGF y del TGF- $\alpha$  (también sintetizado por los queratinocitos). Experimentos con ratones transgénicos en los que se ha bloqueado la función del receptor del KGF así como con ratones tratados con glucocorticoides y con ratones diabéticos que tienen una cicatrización defectuosa y expresan bajos niveles de KGF, sugieren que este factor podría jugar un papel relevante en la reepitelización de heridas (27,28). Por otra parte, experimentos con ratones transgénicos deficientes en TGF- $\alpha$  o en el receptor del EGF (que lo es también del TGF- $\alpha$ ) sugieren que estos factores, mitógenos clásicos de queratinocitos en cultivo, no parecen ser tan importantes *in vivo* como se esperaba (29, 30 y datos no publicados de nuestro laboratorio).

Obviamente, es imposible pensar en actuar a través de experimentos de terapia génica sobre toda la multitud de factores potencialmente importantes para la cicatrización cutánea. Dada la acción estimulante de los aloinjertos de queratinocitos sobre los del paciente, podría pensarse que los factores determinantes para la epitelización de úlceras crónicas son producidos por los propios queratinocitos. De estos factores llama especialmente la atención el de crecimiento del endotelio vascular o VEGF, que promueve la angiogénesis, etapa temprana y fundamental del proceso de cicatrización (26). Por una parte, los ratones diabéticos deficientes en cicatrización lo son también en la producción de este factor (27). Por otra parte, más del 80% de los pacientes con úlceras crónicas, típicamente de pierna, padecen insuficiencia venosa. Finalmente, una estrategia global para aportar a una herida los nutrientes y la multitud de factores que necesita para su cicatrización sería incrementar su vascularización local. Esta estrategia tendría el valor añadido en el caso de las úlceras venosas de que, debido a la estabilidad de los vasos generados, se mejoraría durante un tiempo la condición de la región bajo la influencia del trasplante, previniendo procesos de reulceración. Todo esto hace del VEGF un candidato idóneo para la terapia génica de la regeneración cutánea y, en particular, de las úlceras crónicas venosas, campo en el que nuestro laboratorio trabaja activamente.

Con el fin de verificar experimentalmente esta hipótesis, nuestro laboratorio ha generado ratones transgénicos en los cuales el gen del VEGF se encuentra bajo el control de un segmento del promotor del gen de la queratina K6, desarrollado por nosotros (31), que le confiere la propiedad de que solamente se expresa en queratinocitos suprabasales de piel sometida a estímulos hiperproliferativos, tales como procesos de reepitelización, tumores y tratamientos con ésteres de forbol o ácido retinoico. El factor producido por estos queratinocitos es exportado y genera un claro incremento en la angiogénesis dérmica. Por otra parte, injertos de piel de estos ratones en la espalda de ratones inmunosuprimidos, una situación más parecida a lo que sería una terapia génica, también inducen una mayor vascularización local (datos no publicados de nuestro laboratorio). A la vista de estos prometedores resultados, estamos procediendo a introducir el gen del VEGF en cultivos de queratinocitos humanos y porcinos para evaluar su capacidad de acelerar la cicatrización de heridas en ratones diabéticos y en cerdos como paso previo a considerar su ensayo en pacientes humanos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Morgan, R. A. & Anderson, W. F. (1993) Human gene therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 191-217.
2. Mulligan, R. C. (1993) The basic science of gene therapy. *Science* **260**, 926-932.
3. Fuchs, E. V. (1990). Epidermal differentiation : the bare essentials. *J. Cell Biol.* **111**, 2807-2814.
4. Green, H. (1991) Cultured cells for the treatment of disease.. *Scientific American* **265**, 64-70 (nov).
5. Mathor, M.B. , Ferrari, G., Dellambra, E., Cilli, M., Mavilio, F., Cancedda, R. & De Luca, M. (1996). Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10371-10376.
6. De Luca, M. & Pellegrini, G. (1997) The importance of epidermal stem cells in keratinocyte-mediated gene therapy. *Gene Therapy* **4**, 381-383.
7. O'Connor , N.E., Mulliken, J.B., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O. & Green, H. (1981) Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*, **i**, 75-78.
8. Leigh, I. M. (1994). En: *The Keratinocyte Handbook*. Ed.: Leigh, I.M., Lane E.M. & Watt, F.M. Cambridge University Press, Cambridge, p. 503.
9. Gallico, G. G., O'Connor, N.E. & Compton, C.C. (1994) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* **311**, 448-451.
10. Navsaria, H. A. Myers, S.R., Leigh, I.M. & McKay, I.A. (1995) Culturing skin in vitro for wound therapy. *TIBTECH* **13**, 91-100.
11. Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F. & Parenteau, N.L. (1993). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnology and Bioengineering* **43**, 747-756.
12. Compton, C. (1994). En: *The Keratinocyte Handbook*. Ed.: Leigh, I.M., Lane E.M. & Watt, F.M. Cambridge University Press, Cambridge, p. 513.
13. Phillips, J.J., Kehinde, O., Green, H. & Gilchrist, B.A., (1989) Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 191-199.
14. De Luca, M., Albanese, E., Cancedda, R., Viacaba, A., Faggioni, A., Zambruno, G. & Giannetti, A. (1992) Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogenic cultured epithelium. A multicenter study. *Arch. Dermatol.* **128**, 633-638.
15. Teepe, R.G.C. Koebrugge, M., Ponc, M., & Vermeer, B.J. (1990) Fresh versus cryopreserved cultured allografts for the treatment of chronic skin ulcers. *Br. J. Dermatol.* **122**, 81-89.
16. Greenhalgh, D.A., Rothenberg, J.A. & Roop, D.R. (1994) Epidermis: An attractive target tissue for gene therapy. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 63S-69S.
17. Choate, K.A. & Khavari, P.A. (1997) Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival in vivo. *Human Gene Ther.* **8**, 895-901.
18. Vogt, P.M., Thompson, S., Andree, C., Liu, P., Breuing, K., Hatzis, D., Brown, H., Mulligan, R.C. & Erikson, E. (1994) Genetically modified keratinocytes transplanted to wounds reconstitute the epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9307-9311.
19. Ramírez, A., Vidal, M., Bravo, A., Larcher, F. & Jorcano, J.L. (1995) A 5' upstream region of bovine keratin 6 gene confers tissue-specific expression and hyperproliferation-related induction in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 4783-4787.
20. Bernad, A., Varas, F., Gallego, J.M., Almedral, J.M. & Bueren, J.A. (1994) Ex vivo expansion and selection of retrovirally transduced bone marrow: An efficient methodology for gene-transfer to murine lymphohaemopoietic stem cells. *Br. J. Hematology* **87**, 6-17.
21. Taichman, L.B. (1994), *The Keratinocyte Handbook*. Ed.: Leigh, I.M., Lane E.M. & Watt, F.M. Cambridge University Press, Cambridge, p. 543.
22. Balagué, C., Kalla, M. & Zhang, W.W. (1997) Adeno-associated virus rep78 protein and terminal repeats enhance integration of DNA sequences into the cellular genome. *J. Virol.* **71**, 3299-3306.
23. Fenjves, E.S. (1994) Approaches to gene transfer in keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* **103**, 70S-75S.
24. Scharfman, R., Axelrod, J.H., & Verma, I.M. (1991) Long-term in vivo expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 4626-4630.
25. Phillips, T.J., Kehinde, O., Green, M.B. & Gilchrist, B.A. (1989) Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 191-199.
26. Martín, P. (1997) Wound healing-Aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81.
27. Brauchle, M., Fässler, R. & Wener, S. (1995) Suppression of keratinocyte growth factor expression by glucocorticoids in vitro and during wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 579-584.

28. Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M.T., Krieg, T., Hofschneider, P.H. & Williams, L.T. (1994) The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* **266**, 819-822.
29. Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Olivar, P., Smithles, O. & Lee, D.C. (1993) TGF $\alpha$  deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* **73**, 263-278.
30. R. Murillas Larcher, F. Conti, C.J., Santos, M., Ultrich, A. & Jorcano, J.L. (1995). Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. *EMBO J.*, **14**, 5216-5223.
31. Ramírez, A., Vidal, M., Bravo, A. & Jorcano, J. L. (1998) Analysis of the sequences controlling tissue-specific and hyperproliferation-related keratin 6 gene expression in transgenic mice. *DNA and Cell Biol.*, en presa.

