

48 Cultivos de queratinocitos derivados de piel humana modificados genéticamente

Martha Arango¹, Clara Chamorro², Luz Restrepo³

PALABRAS CLAVE

QUERATINOCITOS
RETROVIRUS
TRANSDUCCIÓN
ÚLCERAS CRÓNICAS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Existen diversos métodos para modificar los queratinocitos (1). Uno de ellos, los vectores retrovirales, ha mostrado mayor eficiencia en la modificación genética de estas células, las cuales pueden ser establemente transducidas con estos vectores y ser un blanco atractivo para la terapia génica en la piel (2).

El objetivo fue evaluar, en cultivos primarios de queratinocitos, la eficiencia de la transducción mediada por el vector retroviral FOCH29-NeoR.

METODOLOGÍA

1) Obtención de queratinocitos a partir de biopsias, por fragmentación mecánica y tratamiento con tripsina-EDTA 0.25%. 2) Siembra de las células en medio KGM (Clonetics) o sobre fibroblastos 3T3-J2 irradiados (6.000 rads) (3) en DMEM: Ham's F12 3:1, suplementado. 3) Producción de equivalente dérmico: sobre dermis artificial de plasma y fibroblastos, siembra de queratinocitos obtenidos a partir del cultivo primario. 4) Transducción con el vector: queratinocitos primarios entre un 40%-60% de confluencia fueron modificados mediante sobrenadante viral en presencia de polibreno (2) con uno y dos ciclos de infección; se incluyeron controles negativos no modificados.

Posttransducción las células fueron seleccionadas durante 14 días con 400 mg/ml de G418; se utilizó un duplicado para extraer DNA y verificar por PCR la transducción.

RESULTADOS

En medio KGM se obtuvo cultivo primario en 23/49 muestras procesadas.

Del cultivo sobre 3T3-J2 se generaron 10/12 cultivos primarios. El 100% de estos cultivos se utilizaron para la producción de equivalente dérmico sobre láminas de plasma y fibroblastos, el cual fue aplicado con éxito en tres pacientes con úlceras crónicas.

Se evidenció la transducción por PCR y por selección en 75% de los experimentos de modificación de queratinocitos.

CONCLUSIONES

Cultivos de buena calidad se obtienen de donantes menores de 40 años; por lo tanto, para la producción de equivalentes dérmicos que se van a utilizar posteriormente en pacientes con úlceras crónicas, será necesaria la utilización de aloinjertos.

Los resultados de las transducciones sugieren la posibilidad de utilizar este vector para introducir genes de factores de crecimiento (PDGF, EGF, VEGF, etc.) en cultivos primarios lo que potenciaría la efectividad de estos sustitutos cutáneos.

REFERENCIAS

1. JIANG K, CONNOLLY D, BLUMENBERG M. Comparison of methods for transfection of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 969-973.
2. GARLICK J, MORGAN J. Retrovirus-mediated transduction of cultured epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 824-829.
3. 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.

.....
Grupo de Inmunología celular e inmunogenética, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

¹ Estudiante de Maestría, posgrado en Ciencias Básicas Biomédicas

² Estudiante de Biología- pregrado, Universidad de Antioquia.

³ Profesor CIM, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia
maliarco@yahoo.com, martala@medicina.udea.edu.co