

## **8. Aspectos biotecnológicos: Aplicaciones preclínicas y clínicas de piel generada a partir de células madre epidérmicas**

JOSÉ LUIS JORCANO NOVAL

### RESUMEN

A la vista de la rapidez con que se avanza en el esclarecimiento de las propiedades de las células madre, tanto embrionarias como adultas, y en su manejo, es de prever que, en un plazo no excesivamente largo, se llegue a generar a partir de ellas terapias innovadoras para enfermedades que en el momento presente no tienen tratamiento. Junto al sistema hematopoyético, la epidermis es uno de los tejidos cuyas células madre se han caracterizado mejor en los últimos años, tanto *in vitro* como *in vivo*. Este conocimiento ha dado lugar a aplicaciones clínicas tanto de Terapia Celular como de Terapia Génica. En este capítulo se pretende examinar la situación en este campo basándose en la experiencia que el autor y sus colaboradores tienen en él.

### ABSTRACT

Given the celerity with which essential steps toward understanding the properties of both embryonic and adult stem cells as well as our ability to handle these in the lab is advancing, innovative therapies will, not too long from now, be developed for those diseases with no treatment to date. The epidermis is one of the tissues whose stem cells have been best described in recent years, both *in vitro* and *in vivo*, along with the haematopoietic system. Moreover, this understanding has given rise to clinical applications for both cell and gene therapies. Based on the

author's and his collaborators' experience, this chapter discusses the state-of-the-art of the field.

## INTRODUCCIÓN

La piel recubre el cuerpo en su totalidad y es el órgano más grande en cuanto a su peso y superficie. Cubre un área de aproximadamente 1,5-2 m<sup>2</sup> en un adulto y representa aproximadamente el 10% del peso corporal. La piel tiene una estructura muy compleja que consiste, además de la piel propiamente dicha o piel interfolicular (PIF), de varios componentes y anexos tales como los folículos pilosos (FP), las glándulas sebáceas (GS) y las glándulas sudoríparas, que se desarrollan a partir de ella. La principal función de la piel es la de actuar como una barrera protectora frente a un medio ambiente exterior muy agresivo, tanto desde el punto de vista físico, como del químico y biológico. Su flexibilidad y resistencia protegen al cuerpo de la fricción y del daño mecánico. Asimismo, evita la pérdida de agua y regula la temperatura corporal mediante la circulación sanguínea y la evaporación de la transpiración. Concentra en ella y, por lo tanto controla, los efectos de agresores tales como agentes químicos, bacterias, virus y la luz ultravioleta (UV; el mutágeno causante de la mayoría de los tumores cutáneos, que son los más numerosos de todos los tumores). Más aún, la piel tiene numerosos nervios y terminaciones nerviosas que le confieren la función de órgano sensorial. En presencia de rayos solares, la piel produce Vitamina D, una molécula crítica en el metabolismo del calcio. Finalmente, estudios recientes están poniendo claramente de relieve el importante papel de la piel como órgano inmunocompetente, por su capacidad de actuar sobre nuestro sistema inmune, y antiinfeccioso, a través de los péptidos antimicrobianos que produce.

Por ello, la piel es un órgano *organizado*, tanto estructural como funcionalmente, para llevar a cabo tan importantes misiones. Por ejemplo, tiene un especial control y compartimentalización de sus procesos de proliferación y diferenciación celular normal (homeostasis), así como de su respuesta reparadora ante las agresiones externas. Además, es un excelente sistema experimental dado que su localización externa permite seguir fácilmente, y dañando mínimamente al paciente o al animal de experimentación, los fenómenos bajo estudio.

A pesar de su importancia, la piel fue durante mucho tiempo un órgano «olvidado», en comparación con otros a los que se dedicó mucho más esfuerzo de investigación; éste es uno de los motivos fundamentales de la paradoja de que, figurando las enfermedades cutáneas entre las de más alta incidencia, tengamos relativamente pocas terapias específicas contra ellas. Esta situación ha cambiado en la última década y la piel se ha convertido en uno de los sistemas de estudio más relevantes de la Biomedicina, incluyendo el campo de la terapia regenerativa y las células madre.

La piel está compuesta de dos tejidos distinguibles en cuanto a su anatomía, función y desarrollo: la epidermis y la dermis. A su vez, estas capas están compuestas por distintos tipos celulares y tienen grandes diferencias en estructura y función (Figura 1).

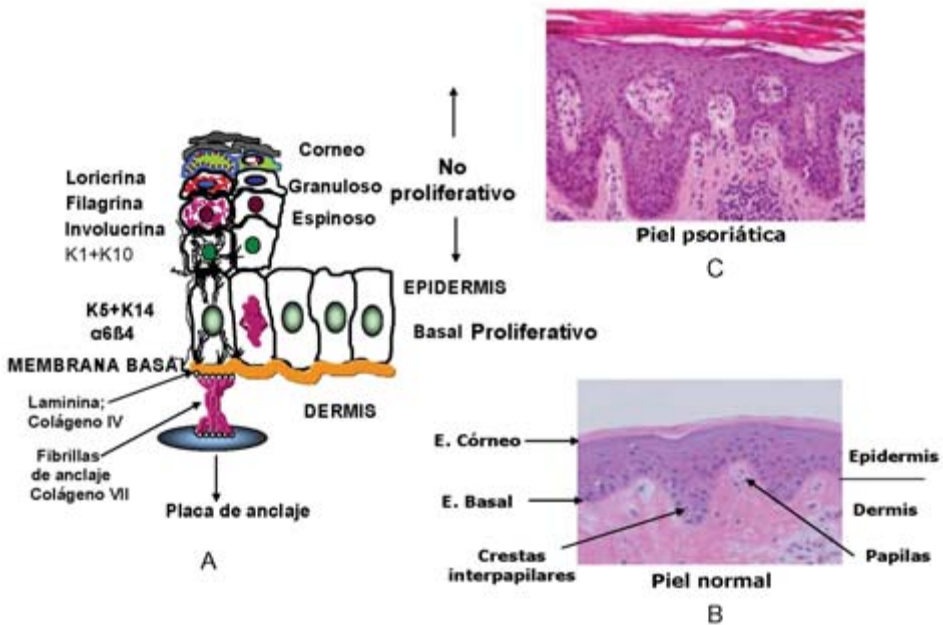


FIGURA 1. A) Esquema de la piel humana mostrando sus tres compartimentos (epidermis, membrana basal y dermis), las diferentes capas de la epidermis y algunos de los marcadores cutáneos más importantes y su localización. B) Histología de la piel humana normal. C) Histología de la piel psoriática. Nótese la alteración en el número de capas así como en las crestas interpapilares y las papilas dérmicas, debido a las anomalías en los procesos de proliferación y diferenciación epidérmica características de esta enfermedad.

## Epidermis

La epidermis es la capa externa de la piel, formada mayoritariamente por un tipo particular de células epiteliales, los queratinocitos, aunque contiene otras células residentes tales como los melanocitos y las células de Merkel y Langerhans que cumplen importantes funciones especializadas (protectoras frente a UV, sensoriales e inmunológicas).

Morfológicamente, la epidermis está compuesta por distintas capas o estratos. Desde la base (zona más profunda o interna) estas capas son: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo. Durante la homeostasis normal los queratinocitos se producen en la capa basal, donde está confinada la proliferación, y migran hacia los estratos superficiales durante el proceso de diferenciación epidérmica. El ciclo de recambio es de aproximadamente 1 mes, y durante él los queratinocitos experimentan profundos cambios morfológicos y bioquímicos, asociados a cambios temporales y espaciales en la expresión génica (Figura 1). Múltiples proteínas (estructurales, factores de crecimiento, etc.) que se sintetizan específicamente en cada una de estas capas, sirven de marcadores para caracterizar sus células. De entre todos ellos, los más usados han sido las keratinas. Además, los elementos reguladores de la expresión específica de estos genes, permiten dirigir selectivamente hacia estos diferentes tipos celulares la expresión de otros genes, de interés biológico o terapéutico, para estudiar sus efectos. Esta exquisita capacidad de manipulación de la expresión génica es uno de los factores que ha contribuido a convertir la epidermis en uno de los sistemas experimentales más interesantes del momento (1). Así, los queratinocitos proliferativos de la capa basal se adhieren a la membrana basal, hasta que maduran y migran hacia la capa suprabasal. Esta importante transición se caracteriza por la pérdida de contacto con la membrana basal, la pérdida de la capacidad de proliferar, la pérdida de la expresión marcadores como las queratinas K5 y K14 y la concomitante ganancia de otros, como las queratinas K1 y K10. Posteriormente, los queratinocitos suprabasales sufren un proceso asociado a la apoptosis, definido como diferenciación terminal, durante el cual las células migran hacia los estratos superiores, a la vez que se aplanan y especializan su actividad para, finalmente, dar lugar a la formación de una capa de células muertas queratinizadas, la capa córnea. Esta capa constituye uno de los componentes principales de la barrera protectora de la piel. El proceso

de diferenciación terminal está asociado a la expresión de proteínas marcadoras tales como transglutaminasa, involucrina, filagrina y loricrina, entre otras. Los folículos pilosos (FP) que constituyen, junto con las glándulas sebáceas (GS) y sudoríparas, los anexos epidérmicos, se forman durante la embriogénesis a partir de la epidermis. De ellos, los FPs son los más importantes, tanto por su compleja estructura y su relevante función como por residir en ellos uno de los compartimentos más importantes de células madre epidérmicas.

La morfogénesis de los FPs comienza relativamente pronto durante la embriogénesis (el día 14.5 en el ratón, que tiene un desarrollo embrionario de aproximadamente 19-20 días), y tiene lugar a través de un complejo intercambio de señales (*cross-talk*) entre las células de la dermis y las de la epidermis, que en ese momento forman un epitelio de una sola capa. La primera estructura en formarse (Figura 2A) es la

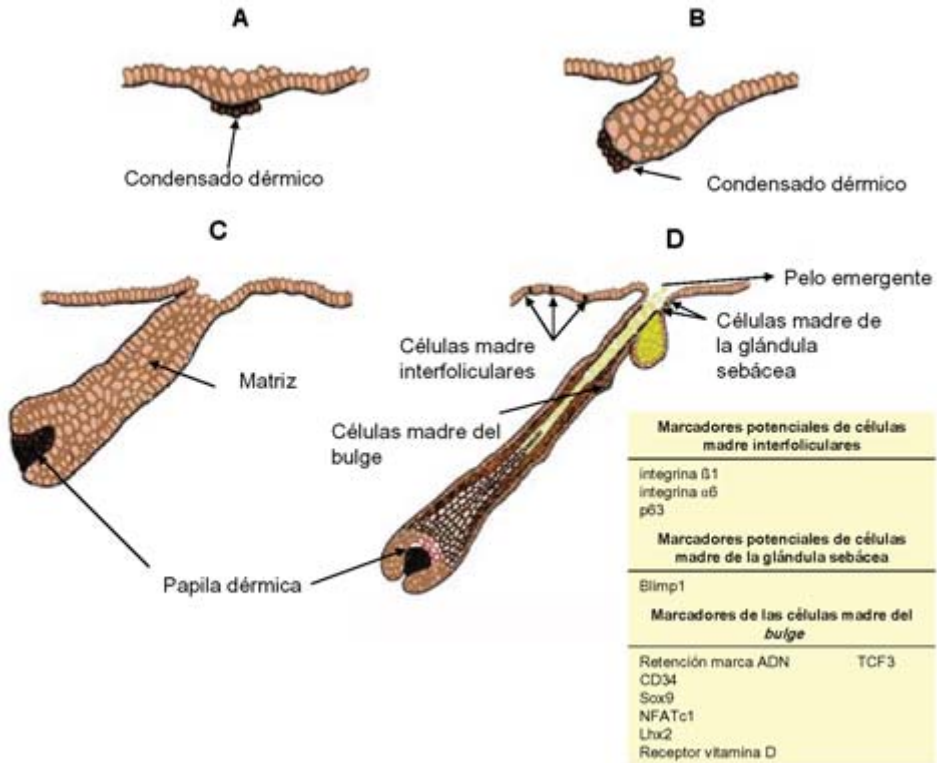


FIGURA 2. Esquema del desarrollo del folículo piloso durante la embriogénesis desde el estadio inicial de «placoda» (A) hasta el de folículo maduro (D). El recuadro incluye algunos de los marcadores reportados para CMEs en función de la localización de éstas.

«placoda», que consiste en una invaginación de la epidermis, en cuya base se condensa un grupo de células dérmicas, que constituye el precursor de la papila dérmica (PD), que es el componente mesenquimal permanente del FP y juega un papel crucial en el crecimiento de éste y, por lo tanto, del pelo. Una vez formadas, estas «placodas» se embarcan en un complejo programa de proliferación, crecimiento hacia la dermis y diferenciación (Figuras 2B, 2C) que termina dando lugar a los FPs (Figura 2D), con su compleja estructura de capas, capaces de generar pelo y con las GSs formadas como un apéndice. En los últimos años se ha progresado mucho en el entendimiento de la complicada señalización espacio-temporal que da lugar a la generación de estas estructuras, y del papel que una pléyade de factores, entre los que destacan Wnt, BMPs y  $\beta$ -catenina, juegan en este proceso (como revisiones recientes, véase referencias 2 y 3). Sin embargo, aún nos queda un largo camino para entenderlo adecuadamente. Por sus similitudes, el conocimiento que acumulemos sobre el desarrollo de los FPs será de aplicación a la hora de entender otros procesos morfogénéticos de características similares, como el desarrollo dentario o de la glándula mamaria. Concluido el proceso de morfogénesis, a lo largo de su vida los folículos pilosos atraviesan ciclos constituidos por a) una fase de involución (catágeno) durante la cual se pierde la parte inferior del FP y se desplaza la PD hacia la base de la parte permanente del folículo, justo por debajo de la protuberancia (*bulge*) característica del folículo; b) un período de latencia (telógeno); c) una fase de crecimiento (anágeno) durante la cual el *cross talk* entre las células de las papilas dérmicas y las células progenitoras en la región del *bulge* da lugar a la reconstitución de un folículo piloso completo y al crecimiento de un nuevo pelo.

## Dermis

La dermis es el estrato vivo que actúa como soporte de la epidermis. El tipo celular principal de la dermis es el fibroblasto cuya función es producir y mantener importantes elementos estructurales de la piel. Estos elementos, que incluyen el colágeno y la elastina, se combinan con sustancias no fibrosas tales como los glicosaminoglicanos (GAGs), para formar la matriz extracelular (MEC) (Figura 1). La MEC también brinda soporte a la membrana basal, garantizando la integridad de la unión

dermo-epidérmica. En condiciones normales, la tasa de recambio del colágeno es baja pero aumenta durante la reparación de un daño. La red vascular, juega un rol central en el proceso de regeneración cutánea. Un aporte sanguíneo inadecuado inhibe la reparación. La falta de re-vascularización adecuada aumenta la formación indeseada de tejido cicatrizal.

La membrana basal (MB), estructura compleja y constituida por proteínas especializadas, constituye una estructura fundamental del anclaje dermo-epidérmico y delimita las áreas epitelial y mesenquimal. Mutaciones en los genes que codifican las proteínas de la membrana basal (colágeno IV ó laminina 5) dan lugar a enfermedades cutáneas hereditarias, afortunadamente de baja incidencia, caracterizadas por la extrema fragilidad de la piel ante cualquier estrés mecánico. Además, dado que, como veremos más adelante, todos los tipos de células madre epidérmicas (CME) están en contacto con la MB, está cada vez más claro que ésta juega un papel importante proveyendo el «nicho» o medio ambiente necesario para, por una parte, mantener estas células en estado quiescente y, por otra, permitirles activarse, primero proliferando y luego diferenciando, para mantener la homeostasis del tejido, dar lugar a nuevo pelo o reparar una herida.

## CÉLULAS MADRE EPIDÉRMICAS (CMEs)

La constante renovación de la epidermis y del FP, unida a su capacidad para reaccionar eficientemente ante agresiones externas que conducen a su pérdida (quemaduras, heridas, extirpaciones quirúrgicas, etc.) siempre constituyeron una clara indicación de la existencia de CMEs. Dada la importancia de estas células para diseñar futuras estrategias terapéuticas cutáneas, en los últimos años se ha llevado a cabo una intensa investigación en este campo, utilizando las técnicas biológicas más refinadas (ver referencias 2-5 como revisiones recientes). Como resultado de ella, se ha detectado la existencia de CMEs en el *bulge* del FP, en la base de las GSs y en la capa basal de la PIF y se ha identificado un número de marcadores característicos de estas células (Figura 2), que permiten aislarlas o enriquecerlas y estudiar su potencial proliferativo y su capacidad de generar otros tipos de células. La mayor parte de estos estudios ha sido hecha en ratones de laboratorio. Por razones técnicas y éticas obvias, los estudios en humanos han progresado menos,

pero han sido también identificadas CMEs en localizaciones similares a las de ratón. Estas células poseen también marcadores específicos que, con frecuencia pero no siempre, coinciden con los de ratón.

En condiciones de homeostasis normal, los FPs, la PIF y las GSs se mantienen a partir de sus propias células madre. Sin embargo, en determinadas circunstancias, cada una de las tres poblaciones de células madre es capaz de generar toda la epidermis, lo que demuestra su potencial pluripotencia en presencia de los estímulos necesarios. Así, por ejemplo, tras una herida extensa, la epidermis se regenera totalmente a partir de las células del *bulge* del folículo y, puestas en contacto con células de la papila dérmica, células madre interfoliculares dan lugar a FPs y GSs.

A pesar de todos estos avances, todavía existen muchos aspectos importantes de las CMEs poco esclarecidos. Por ejemplo, en la epidermis interfolicular no está claro ni el número, ni la localización de estas células, así como tampoco su «compartimento», es decir, la región de epidermis colonizada por los descendientes de una CME. Tampoco está claro si todas ellas están siempre activas o si, en función del tiempo y los requerimientos de la piel, las CMEs pueden oscilar entre un estado activo y otro inactivo.

En la piel interfolicular, el modelo clásicamente aceptado de la «unidad proliferativa epidérmica» (UPE) (6) definía estas estructuras como una unidad arquitectónica constituida en su base por 10 células basales que diferencian hacia la superficie formando células progresivamente más grandes y aplanadas, hasta culminar formando una única gran celda hexagonal cornificada. Según este modelo, sólo hay una célula madre en el centro de cada UPE, la cual se divide asimétricamente para dar lugar al resto de las células de la base, llamadas células progenitoras o transitoriamente amplificadoras (TA), las cuales sólo tienen la capacidad de dividirse un número limitado de veces para, finalmente, migrar al estrato suprabasal y comenzar el proceso de diferenciación terminal. Según este modelo, la piel interfolicular sería mantenida por un reducido número de CMEs situadas en zonas específicas de la capa basal. Algunos autores las sitúan en la cima de las crestas interpapilares (7) aunque en piel palmar podrían localizarse en la base de estas crestas (8, 9). Sin embargo, ha sido propuesto recientemente (10) un modelo alternativo según el cual la homeostasis de la piel interfolicular

sería llevada a cabo por células de la capa basal, que tendrían el carácter de progenitoras con capacidad de dividirse un número ilimitado de veces y darían lugar, a través de divisiones asimétricas, a células determinadas a diferenciar terminalmente. En este modelo existe un alto número de estas células en la capa basal y no requerirían un nicho específico, la membrana basal sería el nicho común a todas ellas.

Evidentemente, el tener buenos marcadores que nos permitan reconocer y aislar las CMEs y el identificar el nicho que permite a estas células tener sus peculiares características biológicas, son asuntos altamente relevantes, aunque, como vemos, todavía objeto de mucha controversia, debido al potencial biomédico de las CMEs. Y una de las aplicaciones que más interés despierta es la posibilidad de inducir el crecimiento de pelo humano para tratar la calvicie. Por desgracia, éste es un problema particularmente complicado ya que, además de las CMEs, para que el folículo entre en fase de crecimiento (anagén) es necesario un estímulo morfogenético proveniente de los fibroblastos de la PD. Sin embargo, se han realizado recientemente progresos esperanzadores ya que, utilizando cámaras de silicona implantadas en la piel, en las que se mezclan células del *bulge* portadoras de los marcadores CD34+/K15+/ $\alpha$ 6, (por lo tanto, potenciales CMEs del folículo) con fibroblastos neonatales (como substitutos de los fibroblastos de la papila dérmica del folículo) ha sido posible inducir el crecimiento de mechones de pelo en ratones (11-13). Aunque se trata de un diseño experimental todavía muy alejado de la aplicación práctica, no cabe duda de su relevancia. Además, estos resultados no han podido todavía ser reproducido con células humanas ya que CD34, el marcador más importante para la selección de las CMEs en ratón, no se expresa en el *bulge* de los FPs humanos, sino en estructuras vecinas.

A pesar de los esfuerzos por definir las células madre en función de marcadores específicos, debemos recordar los criterios basados sobre la capacidad proliferativa *in vitro* de cultivos primarios de queratinocitos humanos, que fueron establecidos hace más de veinte años en el laboratorio de Howard Green (14). Según estos criterios, se definen tres poblaciones llamadas holoclones (clones con gran capacidad clonogénica y gran potencial proliferativo), meroclones (clones con menor potencial proliferativo que los holoclones, originados en células progenitoras comprometidas TA) y paraclones (clones con baja capacidad prolifera-

tiva, cercanas a la diferenciación terminal) (Figura 3). A pesar de su antigüedad, esta clasificación sigue vigente y considera el holoclon como derivado estrictamente de las CMEs interfoliculares en humanos. Así, los ensayos clonogénicos serían los mejores predictores de las potenciales células madre epidérmicas interfoliculares (14, 15). Estos estudios *in vitro* han demostrado que, tanto la forma normal como la genéticamente modificada de holoclonos en cultivo, poseen un extraordinario potencial de replicación (15). Teóricamente, esta capacidad sería suficiente para reemplazar la epidermis, no de un único individuo durante toda su vida (aproximadamente  $10^{10}$  queratinocitos basales), sino de toda la población humana (aproximadamente  $10^{20}$  células). Esta enorme capacidad es la base de la terapia, tanto celular como genética, de piel.

Finalmente, es posible que la dificultad actual de contar con poblaciones puras de CMEs humanas sea resuelta a la vista de los re-










Célula originaria	 MADRE	 PROGENITOR (TA)	 DIFERENCIANDO
Clon	 HOLOCLON	 MEROCLON	 PARACLON
CFE (Capacidad formadora de colonias)			
Tamaño y forma colonia	Grande regular	Mediana Algo irregular	Pequeña Irregular
Tamaño células en colonia	Pequeñas	Grandes	Grandes diferenciadas
% colonias abortivas	≤5 %	5-100 %	100 %
Divisiones celulares	140	<140	15

FIGURA 3. Características de los tres tipos de células presentes en la epidermis por análisis clonal (ver referencia 14). Las células madre dan lugar a holoclonos con una enorme capacidad proliferativa.

sultados publicados recientemente por Aasen y cols. (16). Estos autores han mostrado que es posible reprogramar tanto queratinocitos como fibroblastos cutáneos adultos a células madre pluripotentes, es decir iPS (ver capítulo 3). En el caso de los queratinocitos, el artículo demuestra que son las células que presentan la más alta eficiencia y velocidad de reprogramación de todos los tipos celulares hasta ahora ensayados (1% de eficiencia; 50-100 veces superior a fibroblastos humanos). Estas interesantes características se consiguen tanto con queratinocitos de prepucio de niños como con queratinocitos extraídos de un único pelo adulto, es decir, sin causar daño al donante o paciente. Además, estas iPS epidérmicas fueron capaces de diferenciar, tanto *in vitro* como *in vivo*, hacia tipos celulares pertenecientes a las tres capas embrionarias, incluyendo neuronas dopaminérgicas y cardiomiocitos. Obviamente, estos resultados han colocado a los queratinocitos epidérmicos en el centro de este apasionante campo.

## TERAPIA CELULAR PARA LA REGENERACIÓN CUTÁNEA: QUEMADURAS EXTENSAS Y ÚLCERA CRÓNICAS

A pesar de las incertidumbres reseñadas, la biología de la piel y sus células madre es, tras el sistema hematopoyético, la mejor conocida. Este conocimiento es el que ha permitido que sean precisamente estos dos tejidos aquellos en los que más rápidamente se han desarrollado estrategias novedosas, tanto celulares como génicas, para la corrección de diversas enfermedades humanas.

### **Cultivos de piel para autoinjertos: reemplazo permanente de la piel**

La aparición de sustitutos de piel y cultivos de células epidérmicas como terapias experimentales para el tratamiento de heridas surgió principalmente a raíz de la necesidad crítica de lograr una rápida cobertura permanente de quemaduras extensas.

Por ejemplo, actualmente, en los Estados Unidos, requieren atención médica unas 2.000.000 de quemaduras por año. De éstas, aproximadamente 70.000 requieren hospitalización y aproximadamente 15.000 son

referidas a centros especializados en atención de quemaduras y necesitan algún tipo de procedimiento de injerto de piel (17).

Hasta la fecha, el tratamiento estándar para quemaduras severas se basa en el injerto de piel obtenida de una zona no dañada del cuerpo del propio paciente (técnica conocida como autoinjerto). Este método es el de elección siempre que el daño no sea demasiado extenso y el paciente disponga de suficiente piel sana. Generalmente, la piel se toma del mismo sitio donante varias veces y se permite que regenere entre tomas. Este procedimiento es lento y da como resultado una piel con un efecto cosmético muy deficiente en el sitio de la quemadura debido a que, para expandir su superficie 3-4 veces, la piel procedente del sitio donante se somete a un proceso de mallado y estiramiento. Por otra parte, este método es de difícil aplicación en paciente con quemaduras en más del 50-60% de la superficie corporal.

A mediados de la década de los sesenta, Howard Green y colaboradores desarrollaron métodos para el cultivo en serie y la expansión de queratinocitos epidérmicos, basados en el uso de un *cocktail* de factores de crecimiento específicos y la presencia de fibroblastos de ratón letalmente irradiados como *feeder layer* (18). Asimismo, el laboratorio de Green (14) reportó posteriormente la persistencia en estos cultivos de queratinocitos con capacidades proliferativas características de CMEs. La técnica para la expansión de queratinocitos *in vitro* propuesta por Rheinwald y Green y el uso de la dispasa, una proteasa capaz de desprender del frasco de cultivo la lámina entera de células epidérmicas (en vez de desprender células individuales como hace la tripsina), constituyeron un importante avance técnico que convirtió en una realidad clínica el injerto de láminas epidérmicas obtenidas mediante el cultivo de queratinocitos primarios. Así, en 1981, O'Connor y colaboradores fueron los primeros en preparar y transplantar, con éxito, láminas de queratinocitos autólogos, para pacientes con quemaduras extensas (19). Estudios posteriores de los mismos autores demostraron que las células injertadas persisten indefinidamente en el paciente. Este hallazgo tiene gran relevancia ya que demuestra que es posible mantener las CMEs en las condiciones de cultivo establecidas (20).

A pesar de que el injerto de láminas de células epiteliales ha contribuido a salvar la vida de paciente con quemaduras graves en todo el mundo (19, 21, 22), esta estrategia mostró varios problemas tales como

la fragilidad del producto, la limitada eficacia de los injertos y la ultraestructura anormal de la unión dermo-epidérmica, que causa la formación de ampollas, genera contracturas y redundante en un beneficio limitado (23, 24). Se hizo evidente que era necesario un sistema de reemplazo cutáneo más robusto. La carrera para desarrollar y comercializar estos productos comenzó en los años ochenta y continúa hoy. Buena parte de los problemas que presentaban los cultivos del tipo Rheinwald y Green eran probablemente debidos a que estos cultivos generaban una monocapa de queratinocitos, estructura que dista mucho de la complejidad de la piel interfolicular (Figura 1). Por ello, el siguiente paso consistió en generar cultivos *in vitro* que tuvieran los dos compartimentos característicos de la piel, la epidermis y la dermis, y que se denominan equivalentes o sustitutos cutáneos. Numerosos trabajos de revisión recientes han resumido la historia y el estado del arte de estos sustitutos (17, 25).

A pesar que aún no se ha logrado sintetizar un sustituto cutáneo ideal, y que puede no ser realista esperar que esto ocurra, recientemente nuestro equipo ha desarrollado un producto que tiene muchas de las características clínicas buscadas. Este producto (Figura 4) se desarrolló basándose en el proceso de cicatrización de heridas y consta de: 1) Componente celular formado por queratinocitos y fibroblastos, bien de origen autólogo (del propio paciente) o alogénico (de un donante) y, 2) compartimento dérmico formado por una matriz rica en fibrina, obtenido a partir de plasma del propio paciente o de donante (26, 27) (en este último caso, obtenida de criopreservados de bancos de sangre). La dermis artificial se prepara embebiendo los fibroblastos en el plasma, que posteriormente se coagula por añadido de sales de calcio. De este modo, se genera un soporte dérmico en el que los fibroblastos se distribuyen de forma tridimensional. Finalmente, sobre esta estructura se siembran los queratinocitos a baja densidad. La matriz generada a base de plasma tiene la particularidad de recrear el proceso fisiológico de reparación de una herida, en donde un coagulo de fibrina rico en citoquinas dispara la respuesta reparadora, que se traduce, a nivel del epitelio, en la proliferación y migración de los queratinocitos hasta cubrir el lecho temporal. Una vez que los queratinocitos han tapizado la matriz dérmica de epitelio, la piel artificial está lista para ser trasplantada. Empleando esta tecnología, a partir de una biopsia de piel nativa de 2 cm<sup>2</sup> se puede obtener, en tres semanas, una superficie de piel artificial de aproximadamente 1 m<sup>2</sup> (una expansión de 5.000 veces). La alta capacidad de

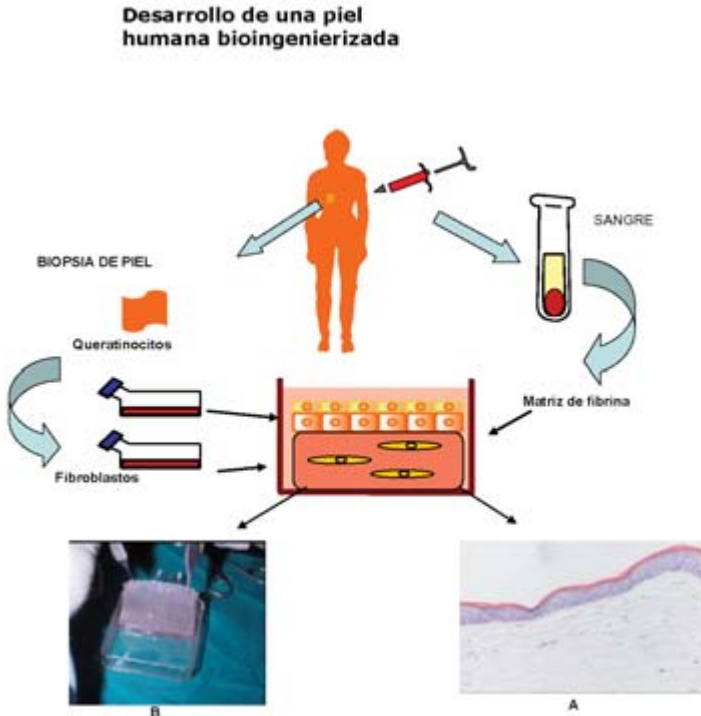


FIGURA 4. Esquema de la generación de sustitutos o equivalentes cutáneos humanos a partir de una pequeña biopsia de piel de un paciente o donante. Este método permite producir, en tiempos relativamente cortos, grandes superficies de piel para su aplicación clínica. El recuadro A contiene una histología de un equivalente en su estadio final de diferenciación, mostrando su gran semejanza con la piel humana. El recuadro B contiene un equivalente montado sobre una gasa, en el momento de ser extraído del cultivo para ser trasplantado y muestra la buena resistencia mecánica de estos equivalentes, lo que facilita su uso.

proliferación de los queratinocitos cultivados sobre la matriz dérmica de plasma, unida a la posibilidad de prescindir de células ratón (empleadas de modo habitual en prototipos previos para sostener la expansión de los queratinocitos humanos) y a la mayor estabilidad mecánica de la piel basada en plasma (Figura 4B), puso de manifiesto el potencial de este diseño para la regeneración cutánea en clínica. Además, en el caso de utilizarse plasma del propio paciente, todos los componentes de este sustituto cutáneo serían autólogos.

Este desarrollo ha sido patentado (28) y durante los últimos seis años ha sido aplicado a más de 70 pacientes con quemaduras extensas

y severas, en unidades de grandes quemados de varios hospitales españoles, con notables porcentajes de toma (hasta del 90%) de los injertos y con razonables resultados cosméticos (Figura 5A) (27, 29)



FIGURA 5. Aplicación de los equivalentes cutáneos al tratamiento de quemados extensos (A) y de úlceras crónicas (B). En el primer caso, los equivalentes se construyen con células del propio paciente (autólogas) mientras que en el segundo procedan de donantes jóvenes (allogénicas).

A pesar de estos resultados alentadores, aún quedan múltiples aspectos a mejorar. Dos causas relevantes para la baja toma (<20%) observada en algunos casos son: 1) las infecciones que suele presentar el lecho receptor del injerto, que no siempre son tratables con antibióticos que no comprometan la viabilidad del trasplante; 2) la deficiente vascularización del lecho. Actualmente estamos desarrollando estrategias génicas que dotarán en el futuro de capacidad antibiótica de amplio espectro, así como de capacidad de promover neoangiogénesis, a nuestros equivalentes cutáneos (30, 31)

Desde el punto de vista cosmético, hay que recordar que todavía no es posible generar folículos pilosos a través de estos equivalentes cutáneos, aunque es razonable pensar que llegará a ser posible en el futuro,

a la vista de los prometedores resultados mencionados anteriormente en este capítulo. Por otra parte, la destrucción provocada frecuentemente por las quemaduras es tan profunda que requerirá la regeneración del tejido muscular y del adiposo subyacente, lo cual constituye un nuevo reto en el que estamos trabajando.

Finalmente, dado su buen resultado con quemados extensos, estos equivalentes cutáneos han sido aplicados con éxito en otras situaciones graves donde se requería la sustitución de superficies importantes de piel autóloga, tales como fascitis necrotizantes, enfermedad injerto contra huésped y extirpación de nevus gigante (29). Nuestra impresión es que, conforme los clínicos se vayan familiarizando con la utilidad de este tipo de productos, se irán aplicando con mayor asiduidad y su uso se extenderá a casos de pérdidas cutáneas menos severas que las comentadas.

### **Aloinjertos temporales para el tratamiento de úlceras crónicas**

Debido a la necesidad de ser producidos a partir de células de cada paciente, los sustitutos cutáneos autólogos obtenidos por ingeniería tisular disponibles comercialmente tienen un coste relativamente alto y una complicada logística, desventajas que hacen que no se apliquen en el tratamiento de enfermedades menos severas que las anteriormente mencionadas. Sin embargo, las heridas crónicas (más de 6 meses sin cerrar), características de las extremidades inferiores y refractarias a los tratamientos tradicionales, constituyen un problema hospitalario de primer orden debido al aumento del segmento anciano de la población en el mundo industrializado y a la mayor incidencia de estados de comorbilidad tales como diabetes *mellitus* y deterioro vascular, estimándose que afectan al 1-2 % de la población total en países desarrollados. Esta situación ha promovido el desarrollo de varios productos comerciales para su tratamiento. El lector puede consultar un excelente y extenso trabajo de revisión de Eisenbud y colaboradores (32) ([www.medscape.com](http://www.medscape.com) *wete*) sobre la eficacia de estos productos.

En el caso de las úlceras crónicas, no es necesario ni probablemente conveniente, dada la avanzada edad y las situaciones clínicas que usualmente presentan estos pacientes, desarrollar sustitutos autólogos. Los sustitutos utilizados en el momento presente son alogénicos y contienen

células de donantes jóvenes, normalmente niños que, por motivos terapéuticos o estéticos, se someten a una extirpación quirúrgica. Ello es debido a que, a pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de cicatrización de heridas, la ciencia del tratamiento de heridas crónicas con sustitutos cutáneos es todavía fundamentalmente empírica. Los efectos beneficiosos del uso de estos sustitutos podrían abarcar desde el mantenimiento en el sitio de la herida de un ambiente húmedo y bioquímicamente balanceado, hasta el aporte de citoquinas beneficiosas y factores de crecimiento al lecho de la herida. Este último efecto parece ser el más probable ya que los sustitutos fabricados con células de donantes jóvenes dan mejores resultados.

Por definición, los sustitutos alogénicos aportan células que no persisten en el sitio receptor y así ha sido demostrado (33), por lo que, desde este punto de vista, pueden considerarse como bioseguros. Por lo tanto, en el caso de heridas crónicas, el objetivo es lograr una cobertura biológica temporal que logre estimular a las células cutáneas del paciente para que crezcan y cierren la herida. La versión alogénica de los equivalentes cutáneos ricos en fibrina descritos para el tratamiento de quemaduras ha sido usada como un medio eficiente para inducir la cicatrización de úlceras crónicas (Figura 5B). Más de cien pacientes han sido tratado con este equivalente cutáneo con un alto índice de eficacia: 80% de tasa de cicatrización en un tiempo medio de 6,6 semanas (34, Meana y cols., resultados no publicados). Aunque no se produce una reacción inflamatoria típica de rechazo, los sustitutos alogénicos no son viables una vez injertados y su efecto se agota, por lo que deben ser cambiados cada semana (5,8 injertos de promedio por paciente).

Desafortunadamente, como era esperable, un porcentaje relativamente alto (25%) de los pacientes tratados recidivan debido a que estos equivalentes no curan la patología isquémica o diabética subyacente a las úlceras. Es de prever que, en el futuro, a los injertos alogénicos se les introduzcan genes capaces de mejorar temporalmente los efectos de estas patologías a nivel local, por ejemplo, produciendo VEGF u otros factores pro-angiogénicos que mejoren la angiogénesis en la zona de la úlcera. (31; Del Río y cols., resultados no publicados). Una curación definitiva pasaría por utilizar equivalentes autólogos modificados genéticamente, es decir, una terapia génica.

## MODELIZACIÓN DE ENFERMEDADES Y PROCESOS CUTÁNEOS

Para estudiar mejor las diversas enfermedades cutáneas así como para ensayar nuevos medicamentos o estrategias terapéuticas, es necesario acceder a voluntarios y pacientes, lo cual está limitado por cuestiones éticas y prácticas. Aunque los modelos animales tienen gran valor como herramientas para desvelar mecanismos críticos en enfermedades, la piel murina frecuentemente no reproduce de manera fiel las patologías cutáneas equivalentes en humanos. Los cultivos *in vitro* de equivalentes de piel representan una alternativa válida a los estudios *in vivo* en piel nativa. Sin embargo, están limitados, entre otras restricciones, por la corta vida media de estos cultivos y la ausencia o deficiencia en determinadas respuestas mesenquimales cruciales como la angiogénesis. Para evitar estos problemas, los investigadores han realizado habitualmente trasplantes xenogénicos injertando biopsias cutáneas de donantes o pacientes en ratones inmunodeficientes, para llevar a cabo experimentos relevantes *in vivo* en un contexto humano. No obstante, además de las dificultades en la obtención de muestras, uno de los principales inconvenientes que presenta este tipo de experimentos es la gran heterogeneidad que tienen las muestras de piel a injertar. De hecho, diferencias en el fondo genético, lugar del cuerpo o el historial de exposición al sol del paciente, entre otros factores, pueden invalidar en gran medida el resultado del estudio. Además, no es fácil ni ético contar con el número de pacientes o donantes que requeriría la investigación en este campo.

Dado que, como se comentó anteriormente, a partir de un donante se pueden obtener grandes superficies de piel, a través de cultivos, la solución a este problema deberían ser el injerto en ratones inmunodeficientes de equivalentes cutáneos humanos. Aunque factibles, estos injertos requerían normalmente procedimientos complejos y tediosos y su tasa de éxito era baja. Además, los injertos frecuentemente se degradaban rápidamente impidiendo que se realizasen estudios a largo plazo sobre las funciones de las CMEs. A partir de los cultivos de equivalentes de piel humana descritos, nuestro grupo ha desarrollado un nuevo procedimiento quirúrgico optimizado que resuelve buena parte de los problemas existentes (Figura 6). Este método facilita la generación de un elevado número de ratones inmunodeficientes injertados con piel

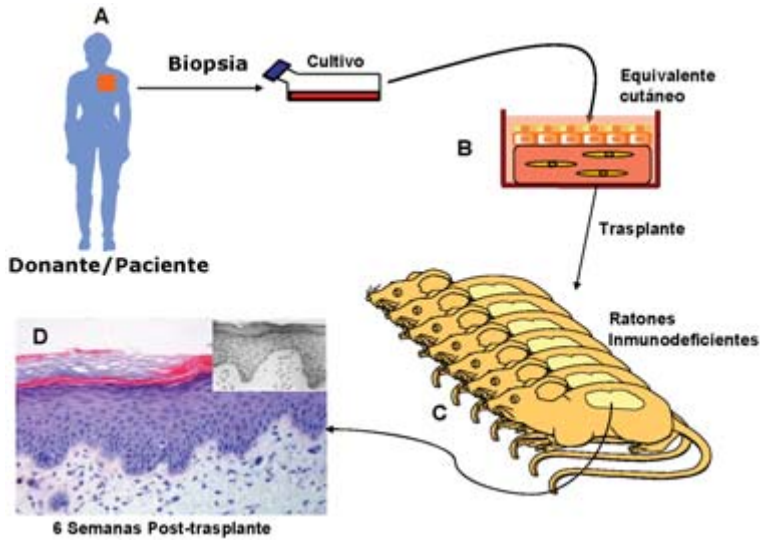


FIGURA 6. Diseño de un sistema experimental de piel humana (ratones humanizados). A partir de una biopsia de un donante o paciente, y utilizando un procedimiento quirúrgico optimizado por nuestro equipo, se puede producir un alto número de equivalentes cutáneos y trasplantarlos a ratones inmunodeficientes sobre los que persisten viables al menos 6 meses, tiempo en el que pueden ser utilizados experimentalmente. Como se muestra en el recuadro D, el trasplante en el ratón genera una piel indistinguible de la humana real (mostrada en el pequeño recuadro insertado en D). Este método ofrece una gran flexibilidad y reproducibilidad, evitando los inconvenientes éticos y prácticos de utilizar voluntarios o pacientes en experimentación básica o preclínica.

humana, en un periodo de tiempo relativamente corto. Una gran ventaja de este sistema es que, utilizando una única muestra de piel de un donante, permite conseguir un alto número de ratones portadores de injertos de piel genéticamente homogéneos. Estudios previos de nuestro grupo, y de otros también, demostraron que la piel humana regenerada de esta manera, mantiene todas las características estructurales de la piel nativa, incluso si se generó a partir de queratinocitos humanos modificados genéticamente (Figura 6D) (35). A las 6 semanas post-trasplante, la piel humana del injerto se ha normalizado y es apta para la experimentación. La piel transplantada permanece viable por largos periodos (al menos, 6-12 meses) e, incluso tras ese tiempo, una biopsia del trasplante puede ser recultivada *in vitro* y retransplantada en un nuevo ratón, lo cual es una buena prueba de la persistencia de las CMEs y convierte este sistema en idóneo para su estudio.

## Modelización de respuestas fisiológicas I: Curación de heridas cutáneas

Tras conseguir una eficiente regeneración de piel humana en los ratones trasplantados, quisimos determinar si nuestro modelo de ratones «humanizados» en su piel era capaz de recrear fielmente un proceso fisiológico como el de la curación de heridas. Para esto, se realizaron heridas de corte en la piel humana regenerada en ratones inmunodeficientes, y se siguió cuidadosamente el proceso de curación, estudiando la expresión de múltiples marcadores epidérmicos y mesenquimales. Este estudio demostró que todas las características principales de la cicatrización de heridas cutáneas, es decir, re-epitelización, remodelación de la matriz dérmica y reorganización de la membrana basal, se reprodujeron de manera precisa (Figura 7A; [36]). Recientemente, un análisis de la

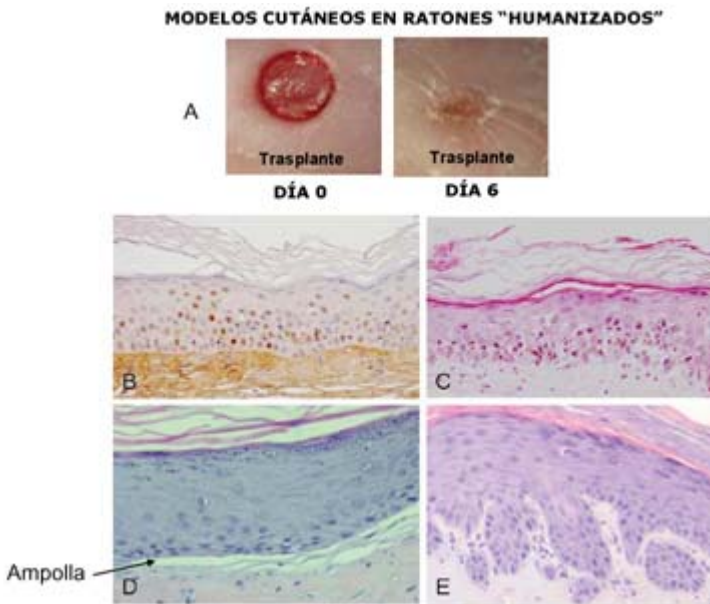


FIGURA 7. Versatilidad de los ratones humanizados en su piel para modelar procesos y patologías cutáneas. A) La cicatrización de una herida, desde su producción (día 0) hasta su curación (día 6) reproduce fielmente el proceso en humanos. B) y C). Respuesta a la irradiación con luz UVB. Inducción de p53 (B) y de células sunburn (C) 48 horas post-irradiación. D) Modelización de Epidermolisis Ampollosa. Nótese la presencia de extensas roturas dermo-epidérmicas (ampollas), características de esta enfermedad. E) modelización del síndrome de Gorlin. Nótese la hiperplasia y la morfología papilomatosa de la epidermis.

expresión genética global del proceso de cicatrización comparando tejido obtenido de heridas producidas en donantes frente al obtenido en heridas producidas en ratones humanizados en su piel, reveló grandes similitudes (Del Río y cols., datos no publicados), apoyando aún más la validez de este modelo.

## **Modelización de respuestas fisiológicas II: Respuesta a UV**

Existen pruebas convincentes de que cada uno de los tres tipos de cáncer de piel más importantes, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, están causados por exposición al sol. Como se ha comentado previamente, el estudio de la respuesta a la luz UV en voluntarios o en ratones inmunodeficientes con xenoinjertos de piel de donante, presenta importantes inconvenientes. Por ello, decidimos poner a prueba nuestro modelo de ratones humanizados para valorar si tenía capacidad de responder adecuadamente a la irradiación UV. Para esto, examinamos la aparición de células *sunburn* e inducción de p53, dos marcadores bien descritos y asociados a la acción de la luz UV. Ambos efectos se detectaron fácilmente al cabo de las 48 horas siguientes a la irradiación (Figura 6B, C). A partir de este modelo se está estudiando detalladamente la respuesta a la luz UV en ratones humanizados tanto con piel albina como pigmentada. También se ha podido estudiar el efecto de protectores UV, lo cual pone de manifiesto el potencial de este modelo para el estudio de compuestos terapéuticos de diversa índole (Del Río y cols., datos no publicados).

## **Modelización de enfermedades cutáneas humanas heredadas I: Genodermatosis**

Estudios recientes, llevados a cabo por nuestro equipo de investigación en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Meneguzzi (INSERM, Francia), han demostrado que es posible conseguir la recreación a largo plazo de una enfermedad cutánea hereditaria monogénica (la forma distrófica de la Epidermolisis Bullosa o Ampollosa) (EAD) (37) en ratones humanizados. Para ello, es necesario partir de una muestra de piel del paciente, a partir de la que se consigue aislar y amplificar sus

células (fibroblastos y queratinocitos). Esta piel humana regenerada en el ratón mantiene las principales características fenotípicas de la piel del paciente, es decir, la formación de ampollas por debajo de la membrana basal debido a la falta de colágeno VII y, por tanto, de fibrillas de anclaje (Figura 6D). Con este método, también ha sido posible modelizar fielmente otros tipos de Epidermolisis Ampollosa (Del Río y cols., resultados no publicados). Estos estudios han abierto grandes posibilidades para la recreación fidedigna de diferentes enfermedades cutáneas humanas *in vivo*.

## **Modelización de enfermedades cutáneas humanas heredadas II:**

### *Predisposición al Cáncer*

Una vez demostrada la idoneidad del sistema de humanización de ratones en su piel como modelo para enfermedades cutáneas heredadas como la Epidermolisis, decidimos explorar la posibilidad de recrear enfermedades relacionadas con el cáncer.

El síndrome de Gorlin es una patología de origen genético, heredada de manera autosómica dominante cuyos pacientes presentan una extraordinaria predisposición a padecer carcinomas basocelulares. El gen responsable del síndrome de Gorlin se localiza en el cromosoma 9 y se ha identificado como PTCH, el homólogo en humanos del gen *patched* (PTC) de *Drosophila*. En este caso, se utilizó el mismo método anteriormente explicado para generar una serie de ratones humanizados con piel procedente de enfermos de Gorlin (Figura 6E). Se usaron cultivos primarios de queratinocitos y fibroblastos obtenidos a partir de biopsias de dos pacientes de síndrome de Gorlin, para producir equivalentes de piel sobre una base de fibrina. Los análisis histopatológicos llevados a cabo tras realizar los injertos, mostraron un epitelio «alterado» característico papilomatoso, similar al que se puede observar en lesiones premalignas en humanos, lo que demuestra la eficacia de esta aproximación experimental para recrear la enfermedad. Próximos estudios estarán dirigidos a evaluar la respuesta crónica a la luz UV en estos ratones, en particular, la posibilidad de obtener tumores. Además, utilizando un método similar, ha sido posible generar modelos de otras patologías genéticas de piel de predisposición al cáncer, como *Xeroderma Pigmentosum* (Del

Río y cols., resultados no publicados). Estos modelos animales han sido objeto de una patente internacional (38).

En conclusión, el desarrollo de sistemas a partir de piel obtenida por bioingeniería, como el basado en el crecimiento de queratinocitos humanos sobre un equivalente dérmico de fibrina con fibroblastos, en combinación con procedimientos quirúrgicos optimizados, nos ha permitido establecer una robusta plataforma humanizada para acercar el estudio de la fisiología y las enfermedades cutáneas al investigador. De esta manera, la regeneración de piel humana en ratones inmunodeficientes tras injertar piel obtenida por bio-ingeniería, parece presentar el compromiso perfecto entre fidelidad y practicidad.

Es de prever que una mejor comprensión sobre los marcadores y mecanismos moleculares implicados en la pluripotencialidad de las CMEs humanas permitirá no sólo la generación de equivalentes de piel más robustos y capaces de regenerar completamente la piel del cuerpo, incluyendo glándulas y pelo, sino también modelizar enfermedades cutáneas mucho más complejas que las descritas.

De momento, estos ratones humanizados en su piel constituyen un valioso modelo pre-clínico para poder ensayar terapias de tipo celular y génico, como veremos en los siguientes apartados. Un modelo aún más complejo, pero perfectamente factible, consistiría en generar ratones con un sistema inmune también humanizado a través de un trasplante de médula ósea humana.

## TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS CUTÁNEAS (GENODERMATOSIS) POR TERAPIA CELULAR

Así como el trasplante alogénico de médula ósea puede resultar de enorme beneficio terapéutico para algunas enfermedades congénitas del sistema hematopoyético, una estrategia similar mediante el trasplante de equivalentes cutáneos podría paliar situaciones patológicas en la piel. En este sentido, nuestro grupo ha diseñado un equivalente cutáneo para ayudar a la regeneración de las heridas asociadas a la Epidermolisis Ampollosa Distrófica (EAD).

Como se ha comentado anteriormente, esta enfermedad rara congénita es debida a mutaciones en el gen del colágeno VII que abolen la

formación de las fibrillas de anclaje dermoepidérmico (ver Figura 1), por lo que, ante el menor estrés mecánico, se forman ampollas y heridas en la piel de los pacientes. Con frecuencia, la penetrancia de esta mutación es muy grande, el fenotipo muy severo y las heridas repetidas acaban produciendo deformaciones en las manos (pseudosindactilia) o tienden a cronificar y a degenerar en carcinomas. Estos pacientes, junto con los de otras genodermatosis, reciben popularmente el nombre de «niños mariposa».

El diseño de una posible terapia celular para esta enfermedad basada en el uso de fibroblastos alogénicos se fundamentó en las siguientes consideraciones: El colágeno VII es mayoritariamente aportado por la capa basal de queratinocitos epidérmicos, pero los fibroblastos dérmicos aportan una cantidad suficiente como para suponer que, de ser funcional, podría suponer una importante mejora de la calidad de vida de estos pacientes. Por otra parte, la experiencia clínica de trasplantes de piel alogénica demuestra que los fibroblastos, al contrario que los queratinocitos, son poco inmunogénicos y pueden permanecer durante un lapso de tiempo relativamente largo en el receptor. Además, el colágeno VII es una proteína muy estable, con una vida media muy larga. Por todo ello, es previsible que los pacientes de esta enfermedad experimenten una notable mejoría temporal en su calidad de vida si se tratan las zonas más afectada (manos, úlcera crónicas) con equivalentes cutáneos «quiméricos», conteniendo fibroblastos alogénicos (de voluntario sano), capaces de producir colágeno VII, y queratinocitos propios (para evitar el fuerte rechazo que producirían queratinocitos alogénicos).

Como ensayo preclínico, estos equivalentes se probaron en ratones humanizados. Como se puede observar en las Figuras 8A y 8A', los equivalentes quiméricos (8A') no mostraron las ampollas características de la enfermedad, que sí mostraban equivalentes similares portadores de fibroblastos del paciente (equivalentes autólogos) (8A). La estructura de la piel quimérica era normal o, con frecuencia, mostraba microampollas, mucho menores que las que aparecían en los trasplantes de equivalentes autólogos.

Promovido por la empresa biotecnológica española Cellerix, estos equivalentes cutáneos quiméricos recibieron la designación de Medicamento Huérfano por parte de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA, abril de 2006; Comisión Europea: *Enterprise*

and Industry, <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/register/alforphreg.htm>) y se encuentran actualmente en un ensayo clínico de fase I-II, controlado y multicéntrico, que reclutará un número total de 12 pacientes españoles.

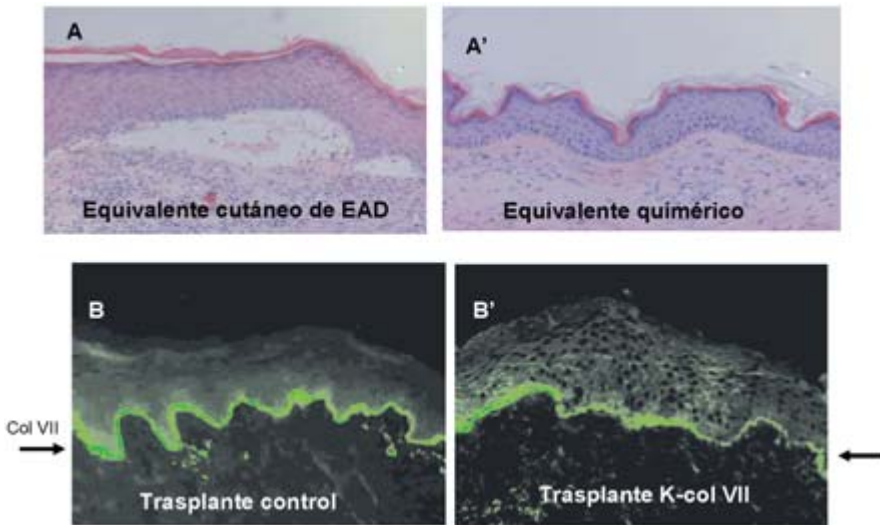


FIGURA 8. *Uso de ratones humanizados en ensayos preclínicos de terapia celular (A, A') y génica (B, B') de Epidermólisis Ampollosa Distrófica (EAD). A) Piel reconstruida a partir de queratinocitos y fibroblastos de un paciente de EAD, mostrando extensas rupturas por debajo de la membrana basal, características de esta enfermedad. A') Piel reconstruida a partir de queratinocitos del mismo paciente y fibroblastos de un donante sano (equivalente quimérico), mostrando la ausencia de ampollas. B) Piel reconstruida a partir de queratinocitos y fibroblastos de un donante sano, mostrando la presencia de colágeno VII humano por debajo de la membrana basal (visualizado por histoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal específico). B') Reconstitución de la producción de colágeno VII en un trasplante reconstruido a partir de células de un paciente EAD, en el que los queratinocitos fueron transducidos con un vector retroviral portador del gen del colágeno VII.*

## TERAPIA GENÉTICA CUTÁNEA

La piel es un órgano que desde el principio ha despertado grandes expectativas para el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la transferencia génica. Su fácil acceso permite evaluar directamente el área modificada genéticamente y estudiar las consecuencias de esta mo-

dificación, produciendo poco malestar al paciente y, más importante aún, extirpar el tejido genéticamente modificado en caso de detectarse efectos adversos. Como hemos visto, las células cutáneas son relativamente fáciles de obtener y de expandir *in vitro* a partir de una pequeña biopsia de piel, sin que se pierdan las CMEs y se han logrado avances importantes en el desarrollo y uso clínico de equivalentes cutáneos obtenidos mediante ingeniería tisular para la regeneración cutánea permanente. Por último, se ha demostrado que el compartimento de células madre epidérmicas, que es el blanco requerido para cualquier estrategia de terapia génica permanente en la piel, se puede modificar eficientemente utilizando tanto vectores integrativos como no integrativos (39-41). Estos estudios han aportado evidencias firmes de que la transferencia génica correctiva es factible y constituyen el punto de partida para el desarrollo de la terapia génica cutánea, que culminó con la puesta en marcha en Italia, en 2005, de un ensayo de fase I-II para la corrección de la Epidermolisis Ampollosa Juntural, genodermatosis debida a deficiencia física o funcional de laminina 5 (42). Este ensayo se está desarrollando, hasta este momento, con buenos resultados y ausencia de efectos adversos.

Se pueden utilizar dos métodos diferentes de transferencia génica para la modificación genética de la piel: *ex vivo* e *in vivo*. El abordaje *ex vivo* consiste en el aislamiento y propagación *in vitro* de células cutáneas (queratinocitos y/o fibroblastos) obtenidas de un paciente, y su modificación genética mientras están en cultivo, para posteriormente injertarlas nuevamente en el paciente como parte de un equivalente cutáneo, obtenido mediante ingeniería tisular por la técnica que hemos descrito anteriormente. En el abordaje *in vivo* se realiza una transferencia génica directa al paciente ya sea mediante el suministro de ADN plasmídico por inyección directa, métodos biobalísticos (*gene gun*), electroporación o mediante la utilización de vectores virales (tales como lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados).

La técnica de elección dependerá de la naturaleza del problema a corregir pero, a pesar de los esfuerzos por mejorar los resultados de la terapia *in vivo*, estos siguen siendo, en conjunto, manifiestamente inferiores a los obtenidos *ex-vivo* en estudios preclínicos, por lo que ésta es, en estos momentos, la técnica preferida para la terapia génica cutánea.

La corrección de la mayor parte de las patologías requiere la expresión permanente del gen terapéutico en la epidermis, para lo que es necesario introducir eficientemente (transducir) este gen en células madre. La transferencia génica *ex vivo* mediante vectores oncorretrovirales (basados en el virus Moloney), se ha utilizado con éxito en estudios preclínicos para este fin (43). Para que estos vectores las infecten, la proliferación de las células diana es un requisito obligatorio. Se cree que, en las condiciones normales de cultivo, existe un porcentaje de células madre epidérmicas no proliferativas, lo que dificultaría sustancialmente la transducción eficiente de estos cultivos mediante vectores oncorretrovirales. Por tanto, los vectores lentivirales (basados en el virus VIH del SIDA), capaces de infectar queratinocitos humanos tanto en proliferación como quiescentes, representan una estrategia alternativa, sobre todo cuando se pretende la corrección de genodermatosis tales como las epidermolisis, en las que se cree que la cantidad de células madre puede estar parcialmente agotada debido a la necesidad de reparar las continuas úlceras que se forman en estos pacientes (41, 44).

En estos momentos, existen en el mundo varios protocolos de terapia génica de piel en marcha, fundamentalmente en estado preclínico (para una revisión, véase 45). Estas terapias utilizan aproximaciones tanto *ex-vivo* como *in-vivo*, diferentes tipos de vectores e, incluso, la inyección directa de la proteína terapéutica. Nuestro grupo está participando en algunos de ellos, orientados a la corrección de diferentes enfermedades cutáneas, tales como EAD, EAJ, Paquioniquia congénita y *Xeroderma Pigmentosum*, y en la mejora del proceso de cicatrización a través de factores de crecimiento, factores pro-angiogénicos y péptidos antimicrobianos. A modo de ejemplo, sólo me referiré aquí a nuestros resultados en EBD dado que, como ya se comentó anteriormente, en esta enfermedad también participamos en un ensayo clínico basado en terapia celular. Esta terapia, en el mejor de los casos, proveerá una mejora parcial y temporal de los síntomas de la enfermedad.

Dado que la epidermis es muy inmunogénica, en el protocolo de terapia celular no es posible utilizar queratinocitos de donante sano, por lo que la corrección real y estable de esta enfermedad pasa necesariamente por introducir una copia correcta del gen del colágeno VII en queratinocitos del propio paciente con vectores retro o lentivirales. Con los queratinocitos corregidos y fibroblastos del mismo paciente se cons-

truirían equivalentes cutáneos que se le trasplantarían a la manera que se hace con los quemados extensos. Aunque quizás sea poco realista, en el momento presente, pensar que se puede sustituir toda la piel de un paciente por piel genéticamente corregida; al menos se pueden trasplantar las zonas más críticas, como las manos o las úlceras que cronifican y que acaban generando tumores con alta probabilidad.

Como prueba preclínica de esta aproximación, nuestro laboratorio, en colaboración con el Dr. Meneguzzi, generó equivalentes cutáneos a partir de células de pacientes de EAD. Los queratinocitos de parte de los equivalentes eran directamente del paciente. Pero en otros equivalentes, los queratinocitos del paciente fueron transducidos con un vector retroviral que expresaba el gen del colágeno VII (36). La piel humana regenerada en ratones inmunodeficientes mediante el trasplante de queratinocitos provenientes del paciente mostraba la dramática fragilidad en la adhesión dermo-epidérmica y la formación de ampollas espontáneas como consecuencia de la ausencia del colágeno tipo VII, y por tanto de las fibrillas del anclaje, características de esta enfermedad (ver Figura 8A). Por el contrario, el fenotipo fue corregido en el injerto de las células EAD modificadas genéticamente y la presencia de colágeno VII en la zona de unión dermo-epidérmica alcanzaba niveles similares a los encontrados en un trasplante control, portador de células de un donante sano (Figura 8C, D).

## HACIA UNA TERAPIA GÉNICA CUTÁNEA BIOSEGURA

Como se comentó anteriormente, el campo de la terapia génica ha sufrido recientemente un revés en un, por otra parte exitoso, ensayo clínico para la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X (IDSC-X; X-SCID por sus siglas en inglés). El vector retroviral utilizado en la terapia se integró y activó el gen LMO-2, un protooncogén de células T, en tres pacientes distintos (46, 47). Aunque hasta el momento no ha habido informes sobre efectos adversos serios relacionados con la integración viral en otros ensayos clínicos de terapia génica en marcha, los resultados del ensayo francés para IDSC-X y otros estudios *in vivo* con animales modelo han hecho sonar la alarma sobre las posibles consecuencias genotóxicas de utilizar vectores con capacidad integrativa en este tipo de terapias, y aconsejan tomar medidas de segu-

ridad para evitar o minimizar los riesgos (48). Hasta ahora, los desarrollos para evitar el riesgo genotóxico de los vectores retrovirales se han centrado principalmente en mejorar el diseño de los mismos (49). Una alternativa podría consistir en pre-evaluar la seguridad de células madre genéticamente modificadas y de su progenie. Esto no es técnicamente factible actualmente en otros sistemas de terapia génica, como puede ser el basado en células madre hematopoyéticas, en las que su clonación y propagación en cultivo da lugar a una pérdida severa de su pluripotencia, pero podría resultar eficaz para células madre epidérmicas en terapia génica cutánea *ex vivo*.

Nuestro equipo ha sido el primero en plantear, en piel humana, un desarrollo experimental bioseguro (Figura 9); (50) en el que un cultivo

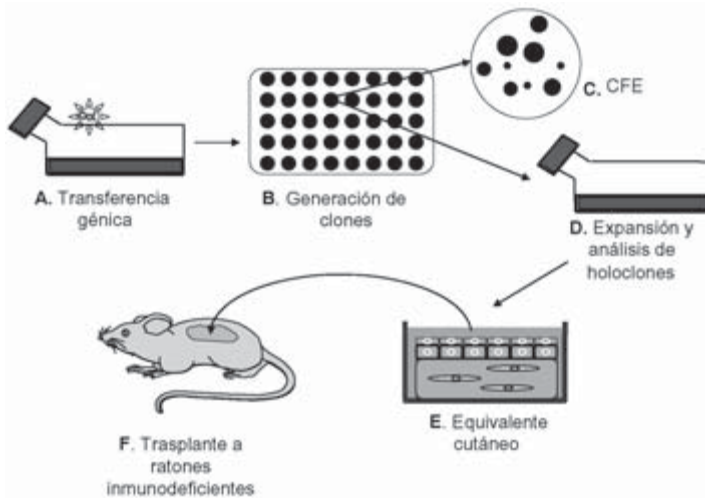


FIGURA 9. Esquema para una terapia génica cutánea biosegura. A) Cultivos primarios de queratinocitos humanos son transducidos con un retrovirus portador bien de un gen marcador (vector GFP) o de un gen marcador y otro potencialmente terapéutico (vector GFP-leptina). B) Clonación por dilución de queratinocitos transducidos. C) Ensayos de eficiencia formadora de colonias (CFE) de varios de los clones obtenidos en B, para seleccionar aquellos que tengan características de holoclonos (ver figura 3). D) Los holoclonos seleccionados se expanden y parte de sus células se congelan. Con el resto de sus células se llevan a cabo los análisis que permiten suponer que son bioseguros (identificación del sitio de integración del vector retroviral, análisis de expresión génica, cariotipo, etc...) y que expresan eficientemente el (los) gen(es) portados por el retrovirus. E) A partir de holoclonos individuales potencialmente bioseguros, se desarrollan equivalentes cutáneos que se transfieren (F) a ratones inmunodeficientes para analizar su viabilidad, su inocuidad y la estabilidad de la expresión de los genes portados por el retrovirus, en particular de los potencialmente terapéuticos, como paso previo a su uso en pacientes humanos.

de queratinocitos primarios es transducido con vectores retrovirales de tipo integrativo (retro o lentivirus), de manera similar a como se haría en un ensayo clínico de terapia génica. Estos vectores llevan y expresan el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), que permite seleccionar fácilmente las células que han incorporado el vector. En un trasplante clásico, se recolectarían todas las células positivas para GFP, se expandirían en cultivo y con ellas se construiría el equivalente cutáneo y se trasplantaría. En nuestra propuesta, sin embargo, a través de la clásica técnica de dilución al límite, se aíslan clones generados a partir de una única célula de queratinocitos positivos para GFP y se expanden *in vitro*. Con ellos se llevan a cabo ensayos de eficiencia formadora de colonias (CFE) y se determina cuáles son holoclones y, por lo tanto, derivan de una CME. A continuación, y ésta es la diferencia crítica, en varios de estos holoclones se determina la posición del genoma en la que se insertó el vector viral y se analiza que no se encuentre dentro de, o en la vecindad de, ningún gen relevante para la homeostasis de la piel o para la supervivencia o el crecimiento celular, cuya expresión pudiera verse afectada por la presencia de retrovirus y, sobre todo, por los fuertes elementos estimuladores de actividad génica (*enhancers*) que éste porta en sus LTR. Esta primera impresión de la inocuidad de la inserción puede confirmarse mediante el uso de otras técnicas, por ejemplo, comparando a través de *microarrays* el transcriptoma de las células del holoclón con el de los queratinocitos primarios iniciales, o analizando el cariotipo.

Los holoclones que no presentan integraciones potencialmente peligrosas del vector retroviral ni alteraciones detectables en otros parámetros medidos, son seleccionados. Una parte de sus células son congeladas, para su posible uso posterior con pacientes, y con el resto se construyen equivalentes cutáneos que son trasplantados a ratones inmunodeficientes, en los que se analiza: 1) Si generan una piel normal, tanto por su histología como a través del análisis de los marcadores típicos de la piel humana. 2) La persistencia y viabilidad del trasplante.

Hasta el momento presente, nuestro equipo ha realizado este proceso utilizando dos vectores retrovirales: uno portador sólo del gen marcador GFP (vector GFP) y otro, bicistrónico, portador también del gen de la leptina (vector GFP-leptina) como paradigma de un gen potencialmente terapéutico. A modo de ejemplo, en un holoclón portador del

vector GFP leptina se detectaron 3 inserciones del retrovirus en genes de los cromosomas 10, 20 y X. En los tres casos, la inserción ocurrió en el primer intrón de los correspondientes genes, lo que es consistente con el tropismo mostrado por este tipo de vectores en otros tipos de células. Por los datos existentes, ninguno de los genes afectados por la integración puede considerarse potencialmente peligroso para queratinocitos epidérmicos, aunque uno de ellos era el gen de la distrofina, causante de la distrofia muscular de Duchene. Por otra parte, el análisis de los equivalentes trasplantados mostró en todos los casos una histología normal y una correcta expresión de los marcadores de proliferación y diferenciación epidérmica, así como una duración superior a las 40 semanas, plazo en el que la piel ha sufrido muchos ciclos de renovación, lo que hace suponer que, como esperábamos, a pesar de las inserciones retrovirales, las CMEs no sufrieron merma de su viabilidad.

Comprobada la factibilidad de esta técnica, en el momento presente se están repitiendo estos experimentos con células de pacientes de varias enfermedades cutáneas, para comprobar también su capacidad terapéutica, y se están diseñando medidas adicionales para incrementar su bioseguridad (F. Larcher y M. del Río, datos no publicados).

## AGRADECIMIENTOS

Aunque, por motivos editoriales, este artículo va firmado por un sólo autor, no hubiera podido escribirse sin la fructífera y larga colaboración de Alvaro Meana, Fernando Larcher y Marcela del Río (por orden alfabético) y sus equipos. También deseo manifestar mi agradecimiento a muchos colaboradores clínicos, en particular Puri Holguín (Hosp. de Getafe, Madrid), Eva López (Hosp. La Fe, Valencia), Juan Carlos López (Hosp. La Paz, Madrid), Sebastián Mir-Mir (Hosp. Vall d'Hebrón, Barcelona), Antonio Torrelo (Hosp. Niño Jesús, Madrid), por su inestimable participación, así como a las empresas Isdín y Cellerix por su interés en nuestros desarrollos y su ayuda. Finalmente, quiero agradecer especialmente a la Asociación Española de Epidermolisis Bullosa (AEBE) y a todos nuestros pacientes y sus familias por el constante apoyo y motivación que nos dan. Estos trabajos han sido financiados por la Comunidad Europea (VI Programa Marco), por el Plan Nacional de I+D y por la Fundación M. Botín.

## ABREVIATURAS

Células TA, Células transitoriamente amplificadoras, o progenitoras; EAD, Epidermolisis Ampollosa Distrófica; EAJ, Epidermolisis Ampollosa Juntural; EIF, Epidermis interfolicular; FP, Folículo piloso; GFP, (*Green fluorescent protein*) Proteína verde fluorescente; GS, Glándula sebácea; IDSC-X, Inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X; MB, Membrana basal; MEC, Matriz extracelular; PD, Pápila dérmica; PIF, Piel interfolicular; UV, Radiación ultravioleta.

## REFERENCIAS

1. Chen J, Roop Dr (2008) Genetically engineered mouse models for skin research: taking the next step. *J Dermatol Sci* **52**, 1-12.
2. Fuchs E (2008) Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol* 273-284.
3. Fuchs E and Horsley V (2008) More than one way to skin... *Genes Dev* **22**, 976-985.
4. Jones PH, Simons BD and Watt FM (2007) Sic Transit Gloria: Farewell to the Epidermal Transit Amplifying Cell. *Cell Stem Cell* **1**, 371-381.
5. Lorz C, Segrelles C, Paramio JM (2009) On the Origin of Epidermal Cancers. *Curr Mol Medicine* **9**, 1-9.
6. Potten CS (1974) The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet* **7**, 77-88.
7. Legg J, Jensen UB, Broad S, Leugh I and Watt FM (2003) Role of melanona chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfolicular epidermis. *Development* **130**, 6049-63.
8. Jones PH, Harper S, and Watt FM (1995) Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* **80**, 83-93.
9. Wan H, Stone MG, Simpson C, Reynolds LE, Marshall JF, Hart IR, Holuvala-Dilke KM, and Eady RA (2003) Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell-containing population of Keratinocytes. *J Cell Sci* **287**, 1427-1430.
10. Clayton E, Doupe DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, and Jones PH (2007) A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* **446**, 185-189.
11. Tumber T, Guash G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, and Fuchs E (2004) Defining the epithelial stem cell niche of the skin. *Science* **303**, 359-63.
12. Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E (2004) Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* **118**, 635-48.

13. Morris RJ, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, Lin JS, Sawicki JA, Cotsarelis G (2004) Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat. Biotechnol* **22**, 411-417.
14. Barrandon Y, Green H. (1987) Three clonal types of Keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 2302-6.
15. Mathor M.B, Ferrari G, Dellambra E, Cilli M, Mavilio F, Cancedda R, De Luca M. (1996) Clonal análisis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **19**, 10371-6.
16. Aasen T, Raya A, Barrero M.A, *et al.* (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human kertinocytes. *Nature Biotech* **26**, 1276-1284.
17. Boyce S.T, Wardeb G.D. (2002) Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. *Am J Surg* **183**, 445-56.
18. Rheinwald JG, Green H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies form single cells. *Cell* **6**, 331-43.
19. O'Connor N.E, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Grenn H. (1981) Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* **317**, 75-8.
20. Gallico G, O'Connor N, Compton C, *et al.* (1984) Permanet coverage of large burn wounds with autologous cultures human epithelium. *N Engl J Med* **311**, 448-51.
21. Compton CC (1992) Current concepts in pediatric burn care: The biology of cultured epithelial autografts: An eight-year study in pediatric burn patients. *Eur J Pediatr Surg* **2**, 216-22.
22. Carsin H, Ainaud P, Le Bever H, *et al.* (2000) Cultured epithelial autograft in extensive burn coverage of several traumatized patients: A five years single-center experience with 30 patients. *Burns* **26**, 379-87.
23. Mommaas AM, Teepe RG, Leigh IM, Mulder AA, Koebrugge EJ, Vermeer BJ (1992) Ontogenesis of the basement membrane zone after grafting cultured humanepithelium: a morphologic and immunoelectron microscopic study. *J Invest Dermatol* **99**, 71-7.
24. Woodley DT, Peterson H.D, Herzog SR (1988) Burn wounds resurfaced by cultured epidermal autografts show abnormal reconstitution of anchoring fibrils. *JAMA* **259**, 2566-71.
25. Ehrenreich M, Ruszczak Z (2006) Update on Tissue-Engineering Biological Dressing. *Tissue Engineering* **12**, 2407-2424.
26. Meana A, Iglesias J, Del Río M, Larche F, Madrigal B, Fresnos MF, Martin C, San Roman F, Tevar F (1998) Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containig fibrin gels. *Burns* **24**, 621-30.
27. Llames SG, Del Río M, Larcher F, García E, García M, Escámez MJ, Jorcano JL, Holguin P, Meana A. (2004) Human plasma as a dermal scaffold for the

- generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* **77**, 350-355.
28. Meana A, Del Río M, Larcher F. and Jorcano JL (2002) Artificial dermis and production method thereof. WO/2002/072800-PCT/ES2002/000087.
  29. Llamas S, García E, García V, Del río M, larcher F, Jorcano JL, López E, Holguin P, Miralles F, Otero J, Meana A. (2006) Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank*, **7**, 47-53.
  30. Carretero M, Escámez MJ, García M, Duarte B, Holguín A, Retamosa L, Jorcano JL, Del Río MD, and Larcher F. (2008) In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. *J Invest Dermatol* **128(6)** 1565-75.
  31. Lasso, JM, Del Río M, García M, Martínez Calleja V, Nava P, Muñoz-Fernández MA, Pérez Cano R (2007) Improving flap survival by transplantation of a VEGF-secreting endothelised scaffold during distal pedicle flan creation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **60**, 279-286.
  32. Eisenbud D, Huang NF, Luke S, Silberklang M (2004) Wounds. *Health Management Publications* **16**, 2-17.
  33. Phillips TJ, Manzoor J, Rojas A, *et al.* (2002) The longevity of a bilayered skin substitute after application to venous ulcers. *Arch Dermatol* **138**, 1079-81.
  34. Cambor LA, Meana A, Llana JM, *et al.* (2003) Treatment of chronic vascular ulcers with skin equivalents obtained by tissue engineering. *Angiología*, **55**, 21-33.
  35. Del Río M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Muñoz M, García M, Muñoz E, Martín C, Bernad A, Jorcano JL (2002) A pre-clinical model for the aná-lisis of human genetically modified skin *in vivo*. *Hum Gene Ther* **13**, 959-968.
  36. Escámez MJ, García M, Larcher F, Meana A, Muñoz E, Jorcano JL, Del Río MJ (2004) An *in vivo* modelo fof wound healing in genetically modified skin-humanized mice. *J Invest Dermatol* **123**, 1182-91.
  37. Di Nunzio F, Maruggi G, Ferrari S, Di Dorio E, Poletti V, García M, Del Río M, De Luca M, Larcher F, Pellegrini G, Mavilio F. (2008) Correction of laminin-5 deficiency in human epidermal stem cells by transcriptionally targeted lentiviral vectors. *Mol Ther* **16 (12)** 1977-85.
  38. Del Río M, García M, Jorcano JL, Trullas R, Meana A, A mouse model comprising an engrafted human skin having hypersensitivity to UV-LIGHT. WO 2007/098954 A1.
  39. Del Río M, Gache Y, Jorcano JL, Meneguzzi G, and Larcher F. (2004) Current approaches and perspectivas in human keratinocyte-based gene therapies. *Gene Ther* **11**, 57-63.
  40. Levy L, Broad S, Zhu A.J, Carroll JM, Khazaal I, Peault B, and Watt FM (1998) Optimised retroviral infection of human epidermal keratinocytes: long-term expression of transduced integrin gene following grafting on to SCID mice. *Gene Ther* **5**, 913-22.

41. Serrano F, Del Río M, Larcher F, García M, Muñoz E, Escámez MJ, Muñoz M, Meana A, Bernad A, and Jorcano JL (2003) A comparison of targeting performance of oncoretroviral versus lentiviral vector on human keratinocytes. *Hum Gene Ther* **14**, 1579-85.
42. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, Di Nuncio F, Di Iorio E, Recchia A, Maruggi G, Ferrari G, Provasi E, Bonini C, Capurro S, Conti A, Magnoni C, Giannetti A, De Luca M. (2006) Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med* **12**, 1397-402.
43. Del Río M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Muñoz M, García M, Muñoz E, Martín C, Bernad A. and Jorcano JL (2002) A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin *in vivo*. *Hum Gene Ther* **13**, 959-6.
44. Kuhn U, Terunuma A, Pflutzner W, Foster R.A. and Vogel JC. (2002) In vivo assessment of gene delivery to keratinocytes by lentiviral vectors. *J Virol* **76**, 1496-504.
45. Carretero M, Escámez MJ, García M, Mirones I, Larcher F, y Del Río M. (2009) Terapia génica cutánea como estrategia de intervención en dermatología, 147-166, en *Medicina regenerativa e ingeniería tisular del laboratorio a la clínica*, Editor: Daniel Ascencio González, Editorial: Alfil (México).
46. Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, Hacein-Bey-Abina S, and Fischer A. (2005) Gene Therapy for severe combined immunodeficiency. *Annu Rev Med* **350**, 913-922.
47. McCormack M.P, and Rabbitts T.H. (2004) Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* **350**, 913-922.
48. Fischer A, and Cavazzana-Calvo M. (2005) Integration of retroviruses: a fine balance between efficiency and danger, *PloS Med*, **2**, 10.
49. Porteus MH, Connelly JP, and Pruett S.M. (2006) A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases. *PloS Med* **2**, 133.
50. Larcher F, Dellambra E, Rico L, Bondanza S, Murillas R, Carroglio C, Mavilio F, Jorcano JL, Zambruno G, Del Río M. (2007) Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *MolecularTherapy* **15**, 1670-1676.