

GACETA MÉDICA DE MÉXICO

BIOLOGÍA MOLECULAR Y MEDICINA

## La piel como vehículo para terapia génica: hemofilia B, un modelo de aplicación

Isaura Araceli González-Ramos<sup>1,2</sup> y Ana Rebeca Jaloma-Cruz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>División de Genética, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social; <sup>2</sup>Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara

### Resumen

*La piel artificial ofrece importantes ventajas en terapia génica por su bioseguridad y fácil monitoreo. La obtención sencilla de queratinocitos mediante pequeñas biopsias y su expansión in vitro enriquecida en células madre epiteliales las convierten en un blanco terapéutico idóneo para la expresión del transgén a largo plazo. La terapia génica cutánea correctiva se aplica actualmente en ensayos clínicos de enfermedades genéticas dermatológicas. En entidades monogénicas sistémicas como la hemofilia B, el injerto de piel modificada genéticamente en un modelo experimental murino, ha logrado un aumento discreto del factor IX coagulante plasmático que puede atenuar las manifestaciones graves del padecimiento.*

**PALABRAS CLAVE:** Piel artificial. Equivalente dermoepidérmico. Terapia génica cutánea. Hemofilia B.

### Abstract

*Artificial skin offers important advantages in gene therapy for its biosafety and simple monitoring. An easy access of keratinocytes through small biopsies and their in vitro expansion enriched with epithelial stem cells, make them an ideal target for long-term therapeutic transgene expression. Corrective cutaneous gene therapy has been recently applied in clinical trials on dermatological genetic diseases. In systemic monogenic diseases such as hemophilia B, the graft of genetically modified skin in murine experimental models has achieved a modest increase of clotting factor IX in plasma that may attenuate severe symptoms of the disease. (Gac Med Mex. 2015;151:266-9)*

**Corresponding author:** Ana Rebeca Jaloma-Cruz, arjaloma@gmail.com

**KEY WORDS:** Artificial skin. Dermoepidermal equivalent. Cutaneous gene therapy. Hemophelia B.

## Los queratinocitos como recurso terapéutico

Uno de los órganos esenciales en nuestro organismo es la piel, encargada de la protección hacia agentes

externos y microorganismos, así como de mantener la concentración de agua y temperatura corporales. Las principales células que componen la piel son los queratinocitos, los cuales han sido sumamente atractivos como «blanco» para la terapia génica *ex vivo* por ser obtenibles con métodos mínimamente invasivos, su capacidad de replicación continua por la presencia de células madre *in vivo* e *in vitro*, su facilidad de trasplante por técnicas ya bien establecidas, su expresión génica regulada, la existencia de técnicas de cultivo por las que adquieren sus rasgos completos simulando

**Correspondencia:**

\*Ana Rebeca Jaloma-Cruz  
División de Genética  
Centro de Investigación Biomédica de Occidente  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Sierra Mojada, 800  
Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jal.  
E-mail: arjaloma@gmail.com

Fecha de recepción: 26-11-2013  
Fecha de aceptación: 21-04-2014

el epitelio en condiciones *in vivo* (equivalentes dermoepidérmicos), su capacidad de secreción a nivel sistémico, así como las características de bioseguridad del trasplante al ser fácilmente monitoreable y removible de ser necesario<sup>1</sup>.

La piel artificial, a base de queratinocitos en unión con distintas bases dérmicas, ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de pacientes con quemaduras y úlceras, a partir de lo cual el desarrollo de dichas láminas se ha enfocado a otros fines terapéuticos. El empleo de estas «pieles artificiales completas» como trasplante garantiza el éxito del injerto con la disminución de su fragilidad y la mejoría de la cicatrización. Con el desarrollo de distintos protocolos para la optimización de los cultivos, la piel artificial y su modificación genética con vectores virales terapéuticos ofrece alternativas muy interesantes para el tratamiento de enfermedades genéticas, aún no dermatológicas, como la hemofilia.

### **Cultivo de queratinocitos para obtención de piel artificial**

La piel como vehículo terapéutico puede ser producida mediante la obtención y manejo de queratinocitos a partir de una biopsia. Tanto para la realización de alotrasplantes (trasplantes entre diferentes organismos pero de la misma especie), xenotrasplantes (entre diferentes especies) como para trasplantes autólogos (el donador es el mismo que el receptor), el cultivo de queratinocitos ha sido desarrollado y mejorado a través de diversas técnicas, permitiendo cada vez mayores beneficios en relación a la extensión de su viabilidad y obtención de características propias de la piel *in vivo*<sup>1</sup>.

De manera natural, las células muertas se desprenden de la superficie de la piel y son reemplazadas continuamente por queratinocitos derivados de las células madre epiteliales, las cuales son una subpopulación de queratinocitos basales que tienen capacidad de autorrenovarse y expandirse. Este tipo específico de células tiene amplias ventajas para su uso en la formación de piel artificial por sus características proliferativas que contribuyen a prolongar la vida del injerto<sup>1</sup>.

Una variante del cultivo de queratinocitos para manejo en terapia génica son los equivalentes dermoepidérmicos o «pieles artificiales», los cuales están formados por queratinocitos cultivados sobre una matriz de fibrina y fibroblastos logrando una estructura similar a la piel, con características propias de cada estrato

celular. Los equivalentes dermoepidérmicos (Fig. 1) tienen características particulares y beneficios otorgados por dicha matriz, lo que favorece la migración de células tanto de origen epitelial como mesenquimal, como en el proceso de cicatrización natural y proliferación celular. Así pues, la fibrina constituye un depósito de factores diversos (citocinas y factores de crecimiento) y proporciona un andamiaje tridimensional que promueve diferenciación, proliferación y migración. Con estas propiedades, el empleo de la matriz de fibroblastos y fibrina permite partir de una biopsia de menores dimensiones para la obtención de un tejido bioingenierizado, con mayor resistencia, manejo más sencillo y reducción de costos<sup>3</sup>.

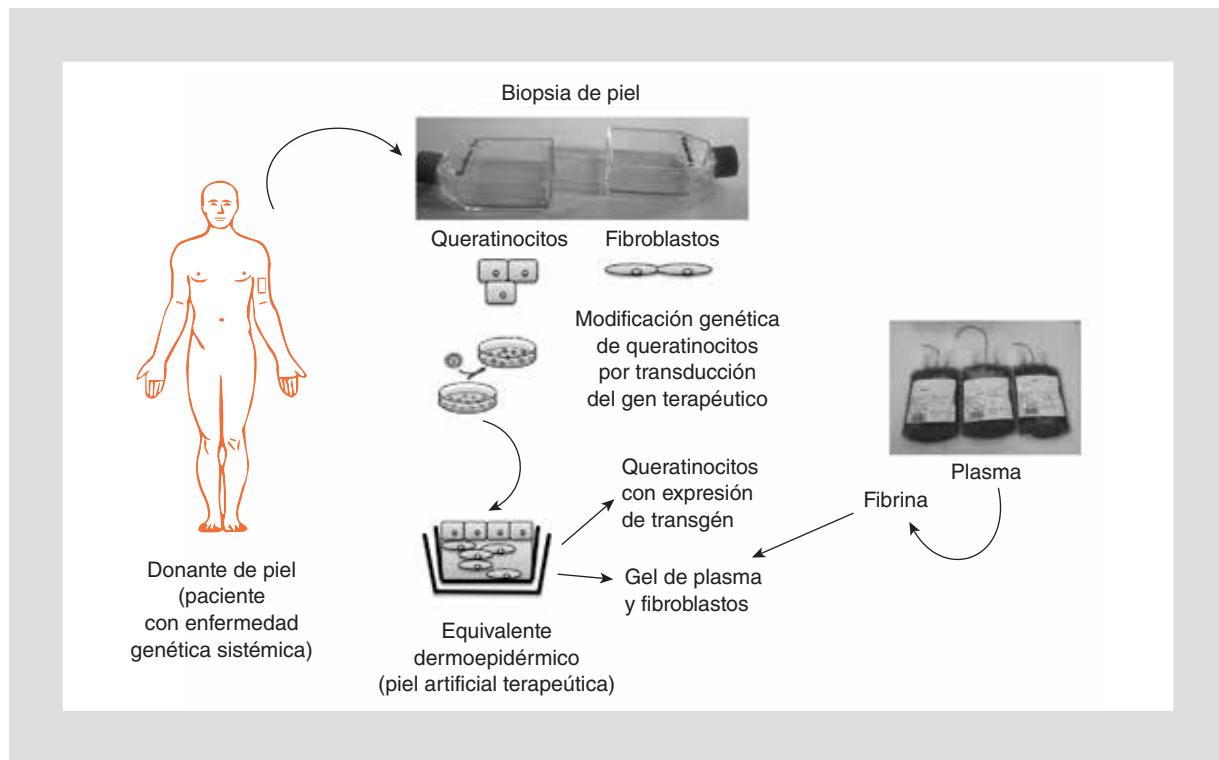
Esta piel artificial o equivalente dermoepidérmico ha sido evaluada tras su trasplante mediante técnicas inmunohistoquímicas, y se ha encontrado una restauración fenotípica muy similar al tejido normal, síntesis de proteínas estructurales y componentes basales, como la laminina. Tras cuatro semanas de injerto, se observa una estructura muy similar a la piel humana *in vivo* con correcta vascularización y se mantiene la arquitectura de tejido sana y madura hasta 16 semanas después del trasplante<sup>2</sup>.

### **Terapia génica cutánea aplicada a enfermedades dermatológicas**

La terapia génica en combinación con la ingeniería de tejidos representa un tratamiento prometedor para diversas enfermedades monogénicas, incluidas aquellas que afectan directamente la integridad de la piel, como la epidermolisis bullosa u otras enfermedades sistémicas como la hemofilia.

En búsqueda de conocimientos para optimizar los productos derivados de la bioingeniería cutánea e ingeniería tisular, el grupo de Del Río<sup>3</sup> ha realizado múltiples investigaciones dirigidas a la regeneración y reparación celular, siendo muy prometedoras en el desarrollo de estrategias terapéuticas con aplicación clínica. Esta piel bioingenierizada ha permitido consolidar una plataforma preclínica en terapia génica y celular que es una alternativa importante en el campo de la regeneración cutánea aplicable a diversas enfermedades, como psoriasis, xeroderma pigmentoso, ictiosis, el grupo de enfermedades ampollosas como la epidermolisis bullosa, entre otras<sup>1</sup>.

Entre las aplicaciones más estudiadas dentro de la terapia con ingeniería tisular es la desarrollada en epidermolisis bullosa, una enfermedad de origen genético en la cual la integridad de la piel está gravemente



**Figura 1.** Generación de equivalentes dermoepidérmicos productores de gen terapéutico. Tras el establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos y queratinocitos, obtenidos a partir de biopsias de piel del donante, los fibroblastos embebidos en un gel de fibrina obtenido de plasma sanguíneo forman una matriz tridimensional sobre la que se siembran los queratinocitos modificados genéticamente por la inserción del transgén, para formar el equivalente dermoepidérmico, productor del gen terapéutico.

comprometida, formando ampollas, heridas en la piel y úlceras ante el menor golpe o roce, e incluso de manera espontánea, debidas a la ausencia del colágeno tipo VII. Los pacientes experimentan dolor constante e infecciones frecuentes, entre otras complicaciones; requieren manejo multidisciplinario y procedimientos quirúrgicos constantes. Para este padecimiento, la terapia génica en combinación con la ingeniería tisular ha encontrado una opción terapéutica muy favorable al realizar biopsias de pacientes con esta entidad y formando equivalentes dermoepidérmicos modificados genéticamente con la inserción y expresión del gen del colágeno deficiente. Éstos han sido trasplantados en ratones y han mostrado características epidémicas similares a los realizados con biopsias de piel sana, sin afección en la unión dermoepidérmica que presenta la piel carente de colágeno tipo VII.

El equivalente dermoepidérmico empleado como trasplante autólogo ha sido utilizado exitosamente para el manejo de quemaduras extensas, fascitis necrotizante, eliminación de nevo gigante, entre otras entidades<sup>3</sup>. Los estudios preclínicos de esta índole han tenido un impacto en el avance de los modelos de terapia génica

y celular en enfermedades monogénicas tanto en piel como sistémicas.

### Terapia génica cutánea para entidades monogénicas sistémicas: hemofilia B como modelo

La hemofilia B es una de las enfermedades hemorrágicas hereditarias más comunes, debida a la deficiencia funcional del factor IX de la coagulación. En individuos con niveles plasmáticos < 1% de actividad coagulante del factor IX, se observan manifestaciones clínicas graves con hemorragias espontáneas desde la infancia temprana. La hemofilia B se origina por la alteración de un solo gen, afectando la cantidad o actividad funcional de la proteína, por lo cual es susceptible de mejoría considerable con tratamiento sustitutivo, por lo que la terapia génica es una alternativa para su manejo, ya que el aumento discreto de los niveles plasmáticos de la proteína (1-5%) logra disminuir la severidad de la enfermedad y reducir o eliminar los sangrados espontáneos. En el desarrollo de los modelos de terapia génica, se han observado avances

importantes en el uso de la piel como biorreactor para producir proteínas terapéuticas que son secretadas a nivel sistémico, como el caso del factor IX de la coagulación.

Sin duda, los avances más significativos en el desarrollo del modelo de piel para la terapia génica en hemofilia B se deben al grupo de Gerrard y Brownlee, de Oxford, Inglaterra, quienes desde 1993 obtuvieron los primeros resultados con el injerto de queratinocitos transducidos con vectores retrovirales en ratón hasta lograr la optimización con la expresión del transgén a largo plazo en 1998. En 1996, Ann Gerrard demostró que los queratinocitos humanos modificados genéticamente con vectores virales y trasplantados como injerto en ratón eran capaces de producir factor IX humano (hFIX) a nivel sistémico y biológicamente activo; sin embargo, aunque se lograban cantidades considerables *in vitro*, resultaron muy reducidas en la producción sistémica *in vivo*<sup>4</sup>.

En 1998, White, et al. optimizaron el procedimiento al lograr una expresión a largo plazo del hFIX gracias dos elementos fundamentales: 1) el empleo de un injerto de un equivalente dermoepidérmico en «bicapa», formado a partir del cultivo primario de queratinocitos transducidos sobre una matriz de fibroblastos y colágeno, y 2) la optimización del vector retroviral empleado (MGF), que al eliminar el gen de selección de resistencia a antibiótico y modificar el sitio de clonación del gen del hFIX, logró un aumento de cinco veces el nivel del ARN mensajero ya procesado, que fue más eficiente en la expresión de la proteína en plasma<sup>5</sup>. Tras formar el equivalente dermoepidérmico y transplantarlo en ratones desnudos, observaron que los injertos se vascularizaron e incorporaron a la piel del ratón, logrando una expresión entre 0.1 y 2.75 ng/ml del factor IX humano en plasma (potencialmente factible de llevar a un 3% con un injerto del 1.2% de superficie del roedor), que permitirían disminuir la severidad de la hemofilia a un rango moderado. Los niveles de hFIX en plasma de ratón se stabilizaron en promedio entre 40 y 50 días después del trasplante y los niveles detectables de factor IX estuvieron presentes durante más de un año<sup>5</sup>.

## Retos y perspectivas de la terapia génica cutánea para hemofilia y otras entidades sistémicas

Aun con los logros obtenidos con el desarrollo de equivalentes dermoepidérmicos demostrando las características de piel *in vivo*, sigue siendo un reto importante lograr que la piel artificial esté conformada por una cantidad «crítica» de células madre epiteliales, lo cual podría garantizarse con el enriquecimiento en esta población celular mediante la evaluación de marcadores de superficie específicos. La generación de piel artificial utilizando un cultivo de queratinocitos sobre una matriz de plasma y fibroblastos permite favorecer la proliferación de las células madre epiteliales. Este modelo, junto con un procedimiento mínimamente invasivo que contempla un injerto autólogo, reducirá los riesgos de rechazo y la optimización de los vectores virales terapéuticos podrá garantizar la funcionalidad terapéutica a largo plazo.

## Agradecimientos

Isaura Araceli González Ramos recibe una beca del Instituto Mexicano de Seguridad Social con número de becario 2010-060 y beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con registro 2224961, para la realización de su trabajo doctoral relacionado con el tema de esta revisión.

## Bibliografía

1. Del Rio M, Gache Y, Jorcano JL, Meneguzzi G, Larcher F. Current approaches and perspectives in human keratinocyte-based gene therapies. *Gene Ther.* 2004;11 Suppl 1:S57-63.
2. Llames SG, Del Rio M, Larcher F, et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation.* 2004;77(3):350-5.
3. Martínez-Santamaría L, Guerrero-Aspízua S, Del Rio M. Bioingeniería cutánea: aplicaciones preclínicas y clínicas. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103:5-11.
4. Gerrard AJ, Austen DEJG, Brownlee GG. Recombinant factor IX secreted by transduced human keratinocytes is biologically active. *Br J Haematol.* 1996;95(3):561-3.
5. White SJ, Page SM, Margaritis P, Brownlee GG. Long-term expressions of human clotting factor IX from retrovirally transduced primary human keratinocytes *in vivo*. *Hum Gene Ther.* 1998;9(8):1187-95.