



# ACTAS Derma-Sifiliográficas

Full English text available at  
[www.actasdermo.org](http://www.actasdermo.org)



## NOVEDADES EN DERMATOLOGÍA

# Estrategias terapéuticas innovadoras para la epidermolísis bullosa distrófica recesiva



F. Larcher<sup>a,b,c,\*</sup> y M. Del Río<sup>a,b,c,d</sup>

<sup>a</sup> División de Biomedicina Epitelial, Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, España

<sup>b</sup> Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, España

<sup>c</sup> Instituto de Investigaciones Sanitarias de la Fundación Jimenez Díaz (IIS-FJD), Madrid, España

<sup>d</sup> Departamento de Bioingeniería, Universidad Carlos III de Madrid (UC3M), Madrid, España

Recibido el 18 de noviembre de 2014; aceptado el 12 de enero de 2015

Disponible en Internet el 18 de marzo de 2015

### PALABRAS CLAVE

Genodermatosis;  
Epidermolísis bullosa;  
Terapias avanzadas;  
Genética

### KEYWORDS

Genodermatosis;  
Epidermolysis  
bullosa;  
Advanced therapies;  
Genetics

**Resumen** La epidermolísis bullosa distrófica recesiva (EBDR) es una de las enfermedades raras (ER) de la piel más graves y que mayor interés ha suscitado en cuanto al desarrollo de estrategias avanzadas de intervención terapéutica. La EBDR es debida a la deficiencia de colágeno VII como consecuencia de mutaciones en el gen COL7A1, y los distintos abordajes terapéuticos buscan la reposición de colágeno VII para restituir la adhesión dermo-epidérmica. La variedad de terapias en evaluación incluyen tanto la proteica como diversas estrategias celulares y génicas. Algunas de estas estrategias tienen un potencial terapéutico que va más allá del defecto cutáneo, pudiendo corregir el problema también a nivel de las mucosas internas. En los próximos años se espera que estos nuevos abordajes brinden una mejora sustancial en la calidad de vida de los pacientes con EBDR.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. y AEDV. Todos los derechos reservados.

### Innovative Therapeutic Strategies for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa

**Abstract** Recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) is among the most serious rare skin diseases. It is also the rare skin disease for which most effort has been expended in developing advanced therapeutic interventions. RDEB is caused by collagen VII deficiency resulting from COL7A1 mutations. Therapeutic approaches seek to replenish collagen VII and thus restore dermal-epidermal adhesion. Therapeutic options under development include protein therapy

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [Fernando.larcher@ciemat.es](mailto:Fernando.larcher@ciemat.es) (F. Larcher).

and different cell-based and gene-based therapies. In addition to treating skin defects, some of these therapies may also target internal mucosa. In the coming years, these novel therapeutic approaches should substantially improve the quality of life of patients with RDEB.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. and AEDV. All rights reserved.

## Introducción

Las enfermedades hereditarias raras de piel, también conocidas como *genodermatosis*, constituyen en su conjunto una parte relevante de la patología y clínica dermatológica. Actualmente las bases genéticas de alrededor de 400 genodermatosis, en su mayoría enfermedades monogénicas, han sido dilucidadas, lo cual permite una clasificación precisa, su diagnóstico molecular y, en buena medida, la comprensión del mecanismo patogénico. Sin embargo, a pesar de este conocimiento, en la inmensa mayoría de los casos no existe un tratamiento curativo, sino fundamentalmente paliativo para estas enfermedades.

Las genodermatosis se agrupan en anormalidades de la adhesividad epitelial, la queratinización/cornificación, la pigmentación, la reparación del ADN, el tejido conectivo y las displasias ectodérmicas. En esta revisión nos centraremos en el primer grupo al que pertenece la epidermolísis bullosa (EB). La EB comprende un conjunto de genodermatosis que se caracterizan por fragilidad de la piel y mucosas, así como por la formación de ampollas por traumatismo mecánico o incluso sin él. La EB abarca un amplio espectro de fenotipos que va desde manifestaciones cutáneas y extracutáneas graves causadas por una adhesión dermoepidérmica muy comprometida, hasta rasgos discretos causados por defectos moleculares sutiles. La prevalencia de esta familia de enfermedades se estima entre 8 y 25 casos por millón<sup>1</sup>. Los pacientes con EB tienen necesidad de cuidados médicos específicos para tratar tanto las manifestaciones primarias de la enfermedad como las posibles complicaciones de las mismas que, en algunos casos, pueden resultar mortales.

En los últimos años, y gracias a la identificación de mutaciones en genes (hasta ahora 18) que codifican para proteínas de la zona de unión dermoepidérmica, se ha ido adquiriendo un mejor conocimiento de las formas de herencia y de las correlaciones genotipo-fenotipo de las diversas formas de la EB. Esto ha permitido una mejor clasificación de los diferentes tipos de EB. Para una revisión actualizada de la clasificación de EB, el lector puede acudir al reciente artículo de Fine et al.<sup>2</sup>. Lo más destacable es que la adquisición de todo este conocimiento sobre la EB a nivel molecular ha promovido el desarrollo de innovadoras y variadas estrategias terapéuticas<sup>3</sup>. Esta revisión se centrará en las nuevas terapias para la forma distrófica recesiva de la EB (EBDR).

## La epidermolísis bullosa distrófica recesiva a nivel molecular

Tanto la EBDR como la forma dominante de la enfermedad (EBDD) son causadas por mutaciones en el gen *COL7A1* que

codifica para la proteína colágeno VII (C7). Esta proteína es el componente principal de las fibrillas de anclaje que engarzan el colágeno de tipo I de la dermis con proteínas de la membrana basal subepidérmica, tales como la laminina 332 (anteriormente conocida como laminina 5) actuando como un verdadero adhesivo dermoepidérmico, no solo en la piel, sino en mucosas como la esofágica. Estas fibrillas pueden observarse como tales a través de microscopía electrónica o detectarse como una banda continua situada en la membrana basal utilizando inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra C7 en biopsias de piel normal. La ausencia o disminución pronunciada de C7 es la característica principal de la EBDR y su determinación establece un diagnóstico molecular primario de la enfermedad que debe ser confirmado a nivel genético. La reposición de C7 constituye, por tanto, el *leitmotiv* de todos los abordajes terapéuticos actuales para EBDR aunque como veremos diversas fuentes de la proteína pueden ser empleadas.

El C7 es sintetizado tanto por los queratinocitos epidérmicos (o mucosos) como por los fibroblastos dérmicos, aunque en este tipo celular se produce en menor proporción (se estima que un tercio de lo que producen los queratinocitos). El C7 sintetizado se secreta y tiene la capacidad de dirigirse con facilidad hacia su localización habitual en la membrana basal. Este concepto es importante a la hora de diseñar terapias basadas en manipulación genética o celular, ya que no es estrictamente necesario que todas las células produzcan C7, sino que exista un suministro mínimo suficiente que garantice la adhesividad dermoepidérmica.

Recientemente el grupo de los autores de esta revisión ha descrito el espectro de mutaciones en el gen *COL7A1* en una cohorte de pacientes españoles que padecen tanto EBDR como EBDD<sup>4</sup>. Hasta la publicación de ese trabajo existía la noción de que cada mutación era exclusiva de la familia en que se había originado con poca o nula recurrencia. Ello era debido en parte a la gran cantidad de mutaciones descritas a lo largo de toda la secuencia de nucleótidos del gen. Sin embargo, en el trabajo de los autores, sorprendentemente se encontró que una mutación particular, la c.6527insC en el exón 80 del *COL7A1*, tiene lugar en un alto porcentaje de los casos de EBDR estudiados en España, dando cuenta de casi un 50% de los alelos identificados<sup>4</sup>. En estudios posteriores se encontró que existe un efecto fundador de esta mutación en población española<sup>5</sup>. Esta inserción de un nucleótido altera el marco de lectura del ARNm y ocasiona la aparición de un codón de parada prematura de la transcripción. El efecto final, en los pacientes homocigotos para la mutación, es la ausencia total de proteína C7 en la unión dermoepidérmica que ocasiona la grave fragilidad mucocutánea observada. El alto número de pacientes que presentan esta mutación en homocigosis hace que el desarrollo de una terapia dirigida pueda ser clínicamente relevante.

Otro de los eventos moleculares relacionados con el *COL7A1*, importantes en cuanto al desarrollo de estrategias terapéuticas, es el mosaicismismo de reversión. En el caso de la EBDR este fenómeno, que da lugar a zonas o parches de piel clínicamente normales, se debe a la reexpresión de *C7* como consecuencia de la aparición de mutaciones secundarias adquiridas que revierten la mutación primigenia en *COL7A1*. El grupo de los autores fue uno de los primeros en identificar este fenómeno en pacientes con EBDR<sup>6</sup>. Las causas de la reversión no se conocen. En el caso de la EB se piensa que la cicatrización exacerbada, que conlleva un exceso de proliferación celular, podría inducir nuevas mutaciones que cuando tienen lugar en un gen mutado como *COL7A1*, en el caso de la EBDR, podrían ser beneficiosas al contrarrestar el efecto de la mutación causal de la enfermedad. Por su mayor adherencia, los queratinocitos que sufren la mutación revertante podrían adquirir una ventaja selectiva, dando lugar a los parches clínicamente normales. Estos parches pueden servir como fuente de células autólogas corregidas para estrategias de terapia celular, como se describe más adelante.

## Una enfermedad, varias terapias

La [figura 1](#) esquematiza las diversas estrategias terapéuticas para EBDR que se están evaluando en la actualidad y que se describen en detalle a continuación.

### Terapia proteica

*A priori*, la forma más evidente para corregir un déficit proteico como el de *C7* parecería la administración de la proteína ausente o disminuida. Dadas sus características moleculares, de solubilidad y localización tisular, no parecía que *C7* pudiese administrarse fácilmente ni que alcanzase su zona específica de expresión. Sin embargo, estudios preliminares del grupo de los Dres. Woodley y Chen demostraron que el monómero de la proteína era lo suficientemente soluble para preparar soluciones que pueden administrarse tanto de forma subcutánea en las zonas heridas como sistémica (por vía intravenosa). Se demostró en modelos de EBDR en ratón que la proteína inyectada tenía la capacidad de migrar hacia la membrana basal y corregir el fenotipo ampolloso<sup>7</sup>. La ventaja de la administración sistémica es que permitiría no solo una mejora de la enfermedad a nivel cutáneo, sino también a nivel de los epitelios internos, cuya afectación trae aparejadas dificultades para la ingesta de alimentos sólidos en los pacientes con EBDR. En función de estos trabajos en la actualidad existe una compañía (Lotus Tissue Repair Inc, adquirida recientemente por Shire Biopharmaceuticals) produciendo *C7* recombinante, aunque aún no se ha formalizado un ensayo clínico para su uso.

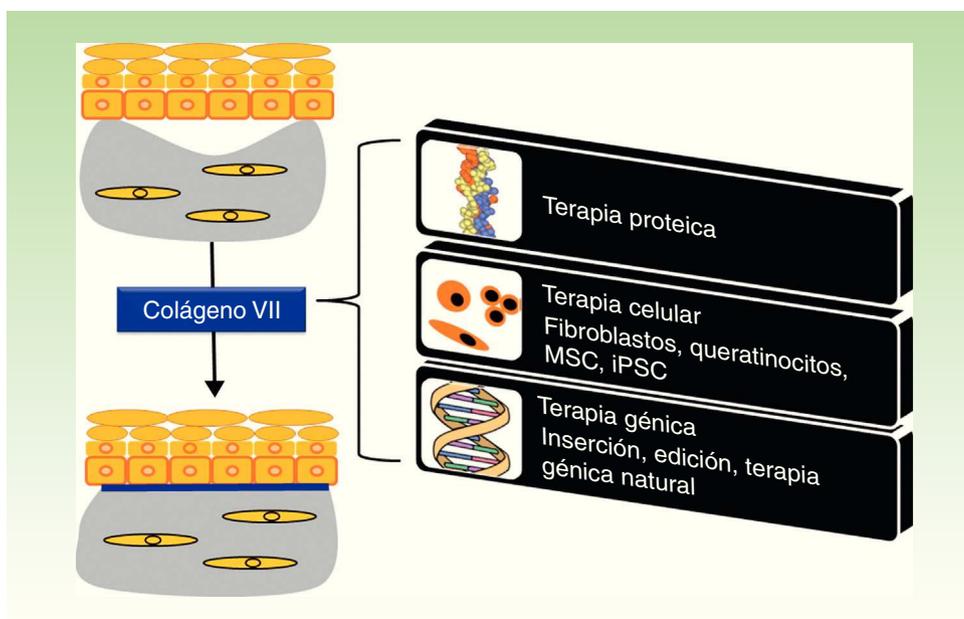
### Terapia celular

Tanto los queratinocitos como los fibroblastos dérmicos son capaces de secretar *C7*. En condiciones de homeostasis los queratinocitos son la fuente principal del *C7* que se localiza en la unión dermo-epidérmica. Sin embargo, existen varios abordajes de terapia celular para la EBDR en mayor

o menor grado de implementación clínica, en los cuales las células suministradoras de *C7* son de origen mesenquimal. Un protocolo basado en el trasplante de médula ósea o sangre de cordón umbilical de un donante sano histocompatible HLA- idéntico fue postulado como de gran potencial curativo. Este abordaje sistémico tiene la ventaja añadida de que, tal como se comentó para las inyecciones de proteína, podría inducir mejoría en epitelios internos además de sobre la piel. Hasta ahora se han tratado más de 10 pacientes (ClinicalTrials.gov referencia NCT01033552) y los resultados parecen prometedores<sup>8,9</sup>. Queda pendiente valorar la persistencia de los efectos terapéuticos, así como elucidar sus mecanismos subyacentes, ya que aún no hay certeza sobre el tipo celular que media el efecto terapéutico. Existen evidencias de que las células con tropismo hacia las zonas afectas no serían células de estirpe hematopoyética (CD34+), sino fundamentalmente precursores mesenquimales positivos para el receptor de PDGF<sup>10</sup>. Esto último es alentador, ya que el trasplante de células CD34+ es una terapia que no está exenta de importantes efectos adversos, inherentes al abordaje (acondicionamiento de los pacientes y enfermedad injerto contra huésped) e incrementados por el hecho de tratarse de pacientes mórbidos.

Otra opción terapéutica es el empleo de fibroblastos alogénicos de donantes sanos, que a diferencia de los queratinocitos puedan ser relativamente bien tolerados por el sistema inmune del paciente. Como se comentó anteriormente los fibroblastos, aunque en menor grado, son también capaces de producir *C7*. El grupo de Bruckner-Tuderman en Alemania reportó que cuando se administraban por inyección intradérmica fibroblastos sanos en un modelo murino de EBDR estos eran capaces de producir *C7 in vivo*, y que este migraba a la membrana basal restituyendo la adhesión dermoepidérmica<sup>11,12</sup>. La estrategia se trasladó a pacientes y en este contexto los resultados confirmaron el efecto observado a nivel preclínico: los niveles de *C7* producidos por los fibroblastos de donante sano aportados de forma local (30-40% de los niveles encontrados en la membrana basal de individuos controles) resultaron en una mejoría de la fragilidad cutánea. Sin embargo, en estos estudios el efecto fue de corta duración, probablemente por la desaparición de los fibroblastos alogénicos debido a un rechazo inmunológico silente<sup>13,14</sup>.

Una mención especial merecen los tratamientos con células madre mesenquimales (MSC). Las MSC son células multipotentes que pueden aislarse de la médula ósea, la grasa subcutánea, la sangre del cordón umbilical y la placenta<sup>15</sup>, siendo las de lipoaspirado las más fáciles tanto de aislar como de cultivar y expandir<sup>16</sup>. La capacidad de las MSC de migrar a zonas de daño y facilitar la regeneración tisular se ve ahora como un componente esencial de su potencial terapéutico. Por ello, existe un gran interés en valorar en el contexto de investigación clínica el potencial terapéutico de las MSC en enfermedades degenerativas e inflamatorias. El efecto terapéutico de las MSC administradas de forma sistémica y local está siendo investigado actualmente en más de 200 ensayos clínicos en distintas fases y para diversas enfermedades, tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, EICH, infarto de miocardio, esclerosis múltiple, daños de la médula espinal y otras<sup>17</sup>. El hallazgo de que la población celular responsable del efecto terapéutico observado después del trasplante de



**Figura 1** Estrategias terapéuticas para epidermólisis bullosa distrófica recesiva. Los abordajes mediante proteínas, terapia celular y terapia génica (recuadros a la derecha) convergen en la producción de colágeno VII a nivel de la unión dermoepidérmica para corregir el fenotipo ampolloso de la piel (panel superior a la izquierda) que recupera su adherencia (panel inferior a la izquierda).

médula ósea en pacientes con EBDR sería de origen mesenquimal ha llevado a proponer el trasplante de MSC para el tratamiento de EBDR, en lugar de un trasplante convencional de médula ósea. Tal aproximación por un lado eliminaría el peligro del EICH y la necesidad de acondicionamiento mieloablativo, y por el otro abriría la posibilidad de llevar a cabo trasplantes alogénicos sin necesidad de buscar donantes histocompatibles, ya que se ha demostrado en diversos estudios clínicos que las MSC, por los efectos inmunosupresores/inmunomoduladores que ejercen, resultan invisibles para el sistema inmune del receptor del trasplante. La administración intradérmica de MSC de donante sano ha demostrado ser capaz de producir C7, al menos por 4 meses, en la unión dermoepidérmica y reducir la aparición de ampollas e inducir la reepitelización de las heridas crónicas en 2 pacientes con EBDR<sup>18</sup>. Existen 19 ensayos clínicos registrados en la base de datos del *National Institutes of Health* para EBDR ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Dos de estos ensayos clínicos tienen por objeto determinar la seguridad y eficacia de MSC alogénicas (de donante sano) para el tratamiento de la EBDR y están empezando a reclutar pacientes. Uno de ellos se está realizando en Japón y consiste en la administración intradérmica de MSC derivadas de médula ósea (UMIN000006723). El otro ensayo se realiza en el Reino Unido y se basa en la infusión sistémica de MSC alogénicas derivadas de médula ósea (ISRCTN46615946). En España el grupo de los autores en colaboración con profesionales del Hospital La Paz en Madrid está en proceso de solicitar los permisos correspondientes para un ensayo clínico basado en la infusión de MSC de lipoaspirado. La terapia celular local con MSC también representa una estrategia atractiva para las úlceras en EBDR, ya que las MSC han demostrado ser capaces de controlar la inflamación característica de algunos lechos crónicos, un obstáculo trascendental para la regeneración cutánea. Se ha reportado, además, que las MSC ejercen también una

variedad de efectos pleiotrópicos (citoprotectores, anti-fibróticos y antimicrobianos) que actuarían sinérgicamente con la producción de C7, promoviendo una cicatrización eficiente<sup>19</sup>. Finalmente la duración del efecto terapéutico podría ser considerable, dada la larga vida media del C7 *in vivo*.

Dentro de las terapias celulares podemos incluir también algunos ensayos basados en productos de ingeniería tisular para aplicación directa sobre las heridas. A día de hoy, sin embargo, los resultados publicados con diversos tipos de productos organotípicos 3D conteniendo solo fibroblastos o fibroblastos y queratinocitos han sido modestos<sup>20,21</sup>. Un abordaje llevado a cabo por los autores, basado en el empleo de trasplantes de pieles bioingenierizadas conteniendo fibroblastos y queratinocitos histocompatibles (HLA-idénticos) ha dado buenos resultados en un número reducido de pacientes con EBDR (del Río et al., resultados no publicados). Nuevas aproximaciones con potencial terapéutico, como las que incluyen MSC en combinación con matrices de fibrina u otros biomateriales, están aún por evaluarse clínicamente.

### Terapia génica

Por tratarse de enfermedades monogénicas la terapia génica se plantea como una posible estrategia curativa para la EB y otras genodermatosis. En los últimos 12 años se han realizado numerosos estudios preclínicos exitosos de terapia génica *ex vivo* para distintas formas de EB, incluyendo algunos en España por el grupo de los autores utilizando modelos de ratón con piel humanizada de EBDR y otras formas de EB<sup>22,23</sup>. Hasta el momento el único ensayo clínico exitoso publicado es el llevado a cabo por Mavilio et al. en Italia<sup>24</sup>, en un paciente de EB juntural (EBJ). En este ensayo se obtuvieron queratinocitos del paciente de EBJ a los que se transfirió,

mediante un vector retroviral convencional, el cADN de la cadena  $\beta 3$  de la laminina 332. Los queratinocitos modificados genéticamente se trasplantaron en forma de epitelio simple cultivado a sendas lesiones de unos pocos  $\text{cm}^2$  de ambas piernas del paciente. El resultado fue el injerto de estas pieles modificadas con recuperación de su adhesividad dermo-epidérmica. Por otra parte, la larga duración del injerto (más de 8 años desde el trasplante) demostró que el gen curativo había sido transferido a la población de células madre epidérmicas. En cuanto a la EBDR varios laboratorios, incluido el de los autores, han demostrado la posibilidad de corrección *ex vivo* de células de la piel de pacientes (queratinocitos y fibroblastos) en diferentes estudios preclínicos, utilizando vectores virales integrativos (retro y lentivirus) y no virales que incluyen el cADN silvestre del gen *COL7A1*<sup>22,25,26</sup>. Dos protocolos de terapia génica para EBDR se encuentran en fase de ensayo clínico, uno en Estados Unidos (ClinicalTrials.gov referencia NCT01263379) y otro en Europa ([www.genegraft.eu](http://www.genegraft.eu)). En el ensayo de Estados Unidos se emplea un vector retroviral convencional<sup>25</sup> y el trasplante del epitelio cultivado de forma similar al protocolo de EBJ<sup>24</sup>. En el ensayo europeo, financiado por la UE y en el que participan los autores, se utiliza un vector retroviral autoinactivante<sup>26</sup> y combina la terapia génica *ex vivo* con la ingeniería tisular de piel, ya que se trasplantará una piel bioingenierizada portadora tanto de queratinocitos como de fibroblastos modificados genéticamente. Existen también otros abordajes basados en la transferencia génica no viral mediante el sistema transposón/transposasa<sup>27</sup> o por corrección vía ARN del gen mutado que se encuentran en fase experimental<sup>28,29</sup>. Asimismo, se ha visto que algunos antibióticos de la familia de los aminoglucósidos son potencialmente capaces de inducir un *bypass* del codón prematuro de terminación de la transcripción del ARNm que se produce como consecuencia de algunas mutaciones en el *COL7A1*, con lo que una aplicación tópica de este tipo de fármacos podría utilizarse *in vivo* para corregir de forma transitoria el efecto de la mutación con producción concomitante de C7<sup>30</sup>.

Debido a los efectos adversos registrados en protocolos clínicos de terapia génica para la inmunodeficiencia ligada al cromosoma X (X-SCID) en los que se observó que el vector retroviral de transferencia génica utilizado inducía la activación de un oncogén conduciendo al desarrollo de leucemias<sup>31</sup> en algunos pacientes, el devenir de la terapia génica ha transcurrido en los últimos años sobre una búsqueda de nuevas estrategias más bioseguras. Se trataba de utilizar protocolos que minimizaran los riesgos debidos a la mutagénesis por inserción del vector portador del gen curativo, y hasta hace relativamente poco los esfuerzos se centraron sobre todo en mejorar los vectores de transferencia génica<sup>23,31</sup>. Sin embargo, en los últimos 4 años se produjo una revolución en el campo con la llegada de herramientas moleculares que facilitan la edición del genoma<sup>32</sup>, minimizando riesgos genotóxicos. Estas herramientas moleculares corresponden a enzimas que cortan el ADN (nucleasas), pero que no actúan al azar, sino sobre secuencias genómicas específicas. Esto se consigue gracias a la acción de otras proteínas o ARN que dirigen a las nucleasas al sitio diana de corte buscado. El corte en el ADN desencadena procesos de reparación que facilitan, por ejemplo a través de recombinación homóloga, el reemplazo del gen defectuoso por uno sano apropiadamente suministrado. El pasado año

se describió la corrección, mediante una de estas estrategias, de una mutación en el gen *COL7A1*<sup>33</sup>. Las herramientas moleculares utilizadas en ese caso sobre fibroblastos de un paciente EBDR fueron las *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*<sup>33</sup>. Otra herramienta en uso actualmente es el sistema *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* y se basa en un sistema que está constituido por un ARN que reconoce específicamente una secuencia de ADN y actúa como guía de una nucleasa (Cas9), que corta el híbrido en la posición marcada por el ARN guía. Este sistema *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9* ha sido utilizado para favorecer la recombinación homóloga para la corrección de mutaciones<sup>34</sup> o la modificación genética en células madre<sup>35,36</sup>. Como se mencionó previamente, la mutación de *COL7A1* c.6527insC crea un codón de terminación prematuro de la transcripción, por lo que el ARNm no codifica para C7. Además de la recombinación homóloga, existen otras aproximaciones para corregir el marco de lectura del ARNm de *COL7A1*. Una de ellas, que se está ensayando en el laboratorio de los autores, consiste en conseguir que la maquinaria de procesamiento del ARN mensajero excluya al exón 80 portador de la mutación. Esto daría como resultado la restauración del marco de lectura (perdido por la inclusión de una C de más en el exón 80) y que la transcripción del ARNm de *COL7A1* llegue hasta el final. Por tanto, se recuperaría la producción de proteína, que mantiene su funcionalidad a pesar de carecer de los 12 aminoácidos codificados por el exón 80 (Larcher, resultados no publicados). Este tipo de ensayos se han realizado con éxito sobre células de distrofia muscular de Duchene<sup>37</sup>.

Los recientes avances en ingeniería de tejidos de la piel y en procedimientos quirúrgicos experimentales han hecho posible analizar el potencial *in vivo* de células madre epidérmicas individuales modificadas, genéticamente seleccionadas sobre la base de su capacidad proliferativa en cultivo. De hecho, el grupo de los autores fue capaz de regenerar la piel humana a largo plazo utilizando clones de células madre epidérmicas genéticamente modificadas conocidos como holoclones<sup>38</sup>. Enfoques similares serán necesarios para poner a prueba las capacidades regenerativas de células portando el locus *COL7A1* corregido mediante edición génica.

## Terapia génica natural

El fenómeno de reversión génica descrito previamente puede considerarse como una forma de terapia génica natural y espontánea, sin mediar manipulación alguna. Las células revertidas pueden obtenerse a partir de una biopsia de la zona revertida y utilizarse para producir equivalentes de piel autóloga cultivada trasplantable, tal como se hace en grandes quemados. La idea, sin embargo, no es producir grandes extensiones de piel, sino la suficiente como para tratar heridas concretas que no cicatrizan y con propensión a desarrollar carcinomas, como es el caso de los pacientes con EBDR severa generalizada. Este abordaje ha sido probado con éxito de forma preclínica utilizando trasplantes de pieles bioingenierizadas conteniendo queratinocitos revertidos de un paciente con EBJ a ratones inmunodeficientes. En este estudio pudo demostrarse que a pesar de contar solo con un 20% de células revertidas

la piel humana regenerada en los ratones era clínicamente normal<sup>39</sup>. Recientemente, el grupo de Jonkman et al. ha demostrado la validez de la estrategia, aunque sin hacer uso de producción de piel por ingeniería tisular, en un paciente con EBJ. Estos autores llevaron a cabo con éxito simplemente el trasplante de biopsias (*punch*) de piel de la zona revertida a heridas crónicas del paciente. Se pudo demostrar tanto la persistencia de la piel trasplantada como la mejoría clínica, ya que las zonas trasplantadas no producían ampollas<sup>40</sup>.

## Terapias para el futuro

Así como el campo de la terapia génica está avanzando gracias a nuevas alternativas como las de corrección mediante edición génica, la regeneración de tejidos está viviendo una verdadera revolución con el advenimiento de las células madre pluripotentes inducidas o iPSC. Estas células, con características casi idénticas a las células madre embrionarias, pueden generarse a partir de células adultas de la piel o de otros tejidos mediante la expresión de los llamados factores de Yamanaka<sup>41</sup>. En condiciones adecuadas, que en algunos casos no han sido aún determinadas, las iPSC pueden diferenciarse a cualquier estirpe celular deseada y en cantidades ilimitadas<sup>41</sup>. El campo de la dermatología no es ajeno a estos avances, ya que una de las posibilidades de las iPSC es la producción de piel autóloga cuando la oferta de células cutáneas (en particular de células madre epidérmicas) está restringida, como es en el caso de la EB u otras enfermedades<sup>42</sup>. Diversos grupos han reportado la generación de iPSC a partir de células de pacientes con EBDR antes o después de su corrección genética<sup>33,43</sup>. Un trabajo reciente demostró la posibilidad de corregir fibroblastos EBDR mediante recombinación homóloga facilitada por *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*, su reprogramación a iPSC y finalmente la diferenciación de estas a queratinocitos, combinando así las tecnologías más punteras<sup>33</sup>. Recientemente también se han obtenido iPSC de células EBDR naturalmente corregidas por reversión, lo que permitiría derivar tanto células epiteliales como mesenquimales autólogas para terapias cutáneas y/o sistémicas<sup>44</sup>.

## Consideraciones finales

En los últimos años las ER en su conjunto han pasado a tener un reconocimiento y difusión inéditos previamente en esferas sociales, políticas y sanitarias gracias a la acción fundamental de las asociaciones de pacientes y otros organismos sin ánimo de lucro. Esta nueva consideración de las ER ha permitido incrementar los fondos destinados a su investigación. En su nuevo programa, H2020, la UE potencia la investigación en ER de manera formidable. En España los nuevos programas de investigación 2013-2016 siguen esa línea con las restricciones locales. La iniciativa CIBERER ([www.cibere.es](http://www.cibere.es)) del Instituto de Salud Carlos III, que agrupa a un número importante de laboratorios que investigan en ER, ha sido fundamental para el progreso del campo. Los avances en genodermatosis, que incluyen la EBDR y que comparativamente superan a los de otras ER, se deben en gran medida a ese nuevo impulso. En los próximos años veremos

los frutos de estos avances, pero para ello debe seguir promoviéndose la inversión en ER tanto pública como privada.

## Financiación

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad de España a través de los proyectos SAF2013/43475-R (MDR) y PI14/00931 del ISCIII (FL) y de la Comunidad de Madrid a través de los proyectos S2010/BMD-2420 (MDR) y S2010/BMD-2359 (FL).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a todos los integrantes de los grupos Termeg ([www.uc3m.termeg.es](http://www.uc3m.termeg.es)) y de la División de Biomedicina Epitelial del CIEMAT que han contribuido a la realización de los trabajos referenciados en esta revisión.

## Bibliografía

1. Fine JD. Inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:12.
2. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, et al. Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70:1103-26.
3. Vanden Oever MJ, Tolar J. Advances in understanding and treating dystrophic epidermolysis bullosa. *F1000 Prime Rep*. 2014;6:35.
4. Escámez MJ, García M, Cuadrado-Corrales N, Llamas SG, Charlesworth A, de Luca N, et al. The first COL7A1 mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol*. 2010;163:155-61.
5. Cuadrado-Corrales N, Sánchez-Jimeno C, García M, Escámez MJ, Illera N, Hernández-Martín A, et al. A prevalent mutation with founder effect in Spanish recessive dystrophic epidermolysis bullosa families. *BMC Med Genet*. 2010;11:139.
6. Pasmooij AM, Garcia M, Escamez MJ, Nijenhuis AM, Azon A, Cuadrado-Corrales N, et al. Revertant mosaicism due to a second-site mutation in COL7A1 in a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2010;130:2407-11.
7. Woodley DT, Wang X, Amir M, Hwang B, Remington J, Hou Y, et al. Intravenously injected recombinant human type VII collagen homes to skin wounds and restores skin integrity of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2013;133:1910-3.
8. Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Hordinsky M, Keene DR, Riddle MJ, et al. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N Engl J Med*. 2010;363:629-39.
9. Tolar J, Wagner JE. Allogeneic blood and bone marrow cells for the treatment of severe epidermolysis bullosa: Repair of the extracellular matrix. *Lancet*. 2013;382:1214-23.
10. Tamai K, Yamazaki T, Chino T, Ishii M, Otsuru S, Kikuchi Y, et al. PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high

- mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:6609–14.
11. Fritsch A, Loeckermann S, Kern JS, Braun A, Bösl MR, Bley TA, et al. A hypomorphic mouse model for dystrophic epidermolysis bullosa reveals disease mechanisms and response to fibroblast therapy. *J Clin Invest*. 2008;118:1669–79.
  12. Kern JS, Loeckermann S, Fritsch A, Hausser I, Roth W, Magin TM, et al. Mechanisms of fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysisbullosa: High stability of collagen VII favors long-term skin integrity. *Mol Ther*. 2009;17:1605–15.
  13. Wong T, Gammon L, Liu L, Mellerio JE, Dopping-Hepenstal PJ, Pacy J, et al. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2008;128:2179–89.
  14. Petrof G, Martinez-Queipo M, Mellerio JE, Kemp P, McGrath JA. Fibroblast cell therapy enhances initial healing in recessive dystrophic epidermolysis bullosawounds: Results of a randomized, vehicle-controlled trial. *Br J Dermatol*. 2013;169:1025–33.
  15. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*. 2006;99:1285–97.
  16. Bieback K, Kern S, Kocaömer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: Bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng*. 2008;18 1 Suppl:S71–6.
  17. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1:2.
  18. Conget P, Rodriguez F, Kramer S, Allers C, Simon V, Palisson F, et al. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*. 2010;12:429–31.
  19. Nuschke A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. *Organogenesis*. 2014;10:29–37.
  20. Hasegawa T, Suga Y, Mizoguchi M, Ikeda S, Ogawa H, Kubo K, et al. Clinical trial of allogeneic cultured dermal substitute for the treatment of intractable skin ulcers in 3 patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50:803–4.
  21. Martinez-Santamaria L, Guerrero-Aspizua S, del Río M. Skin bioengineering: Preclinical and clinical applications. *Actas Dermosifiliogr*. 2012;103:5–11.
  22. Gache Y, Baldeschi C, del Río M, Gagnoux-Palacios L, Larcher F, Lacour JP, et al. Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther*. 2004;15:921–33.
  23. Di Nunzio F, Maruggi G, Ferrari S, di Iorio E, Poletti V, Garcia M, et al. Correction of laminin-5 deficiency in human epidermal stem cells by transcriptionally targeted lentiviral vectors. *Mol Ther*. 2008;16:1977–85.
  24. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, di Nunzio F, di Iorio E, Recchia A, et al. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med*. 2006;12:1397–402.
  25. Siphraşvili Z, Nguyen NT, Bezchinsky MY, Marinkovich MP, Lane AT, Khavari PA. Long-term type VII collagen restoration to human epidermolysis bullosa skin tissue. *Hum Gene Ther*. 2010;21:1299–310.
  26. Titeux M, Pendaries V, Zanta-Boussif MA, Décha A, Pironon N, Tonasso L, et al. SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther*. 2010;18:1509–18.
  27. Ortiz-Urda S, Lin Q, Yant SR, Keene D, Kay MA, Khavari PA. Sustainable correction of junctional epidermolysis bullosa via transposon-mediated nonviral gene transfer. *Gene Ther*. 2003;10:1099–104.
  28. Turczynski S, Titeux M, Pironon N, Hovnanian A. Antisense-mediated exon skipping to reframe transcripts. *Methods Mol Biol*. 2012;867:221–38.
  29. Murauer EM, Gache Y, Gratz IK, Klausegger A, Muss W, Gruber C, et al. Functional correction of type VII collagen expression in dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2011;131:74–83.
  30. Cogan J, Weinstein J, Wang X, Hou Y, Martin S, South AP, et al. Aminoglycosides restore full-length type VII collagen by overcoming premature termination codons: Therapeutic implications for dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther*. 2014;22:1741–52.
  31. Porteus MH, Connelly JP, Pruett SM. A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases. *PLoS Genet*. 2006;2:e133.
  32. Lombardo A, Naldini L. Genome editing. A tool for research and therapy: Targeted genome editing hits the clinic. *Nat Med*. 2014;20:1101–3.
  33. Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, et al. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol Ther*. 2013;21:1151–9.
  34. An MC, O'Brien RN, Zhang N, Patra BN, de La Cruz M, Ray A, et al. Polyglutamine disease modeling: Epitope based screen for homologous recombination using CRISPR/Cas9 System. *PLoS Curr*. 2014;6:1–19.
  35. Xue H, Wu J, Li S, Rao MS, Liu Y. Genetic modification in human pluripotent stem cells by homologous recombination and CRISPR/Cas9 system. *Methods Mol Biol*. 2014 [Epub ahead of print].
  36. Rong Z, Zhu S, Xu Y, Fu X. Homologous recombination in human embryonic stem cells using CRISPR/Cas9 nickase and a long DNA donor template. *Protein Cell*. 2014;5:258–60.
  37. Ousterout DG, Perez-Pinera P, Thakore PI, Kabadi AM, Brown MT, Qin X, et al. Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients. *Mol Ther*. 2013;21:1718–26.
  38. Larcher F, Dellambra E, Rico L, Bondanza S, Murillas R, Cattoglio C, et al. Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *Mol Ther*. 2007;15:1670–6.
  39. Gostyński A, Llamas S, García M, Escamez MJ, Martinez-Santamaria L, Nijenhuis M, et al. Long-term survival of type XVII collagen revertant cells in an animal model of revertant cell therapy. *J Invest Dermatol*. 2014;134:571–4.
  40. Gostyński A, Pasmooij AM, Jonkman MF. Successful therapeutic transplantation of revertant skin in epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70:98–101.
  41. Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. iPS cells: A game changer for future medicine. *EMBO J*. 2014;33:409–17.
  42. Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: A preclinical study. *Lancet*. 2009;374:1745–53.
  43. Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, Cristiano AM. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:8797–802.
  44. Tolar J, McGrath JA, Xia L, Riddle MJ, Lees CJ, Eide C, et al. Patient-specific naturally gene-reverted induced pluripotent stem cells in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2014;134:1246–54.