

Ingrés d'Acadèmics corresponents

POTENTIAL ROLE OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS (IPSCS) FOR CELL-BASED THERAPY OF THE OCULAR SURFACE

Ricardo P. CASAROLI MARANO

He rebut amb gran orgull i satisfacció la notificació que ens ha atorgat el Premi Professor Joaquim Barraquer d'aquesta Reial Acadèmia. Per a mi, sens dubte un gran honor per molts motius. Primerament, per la gran admiració que tinc per Don Joaquim pels llaços d'amistat, entre el mestre i el deixeble, que ens ha unit en els últims 30 anys, i l'etern deute que mantinc amb l'Institut Barraquer.

Així, els meus més sincers agraïments a la Comissió que ens ha triat mereixedor d'aquesta distinció, al Doctor Borja Corcóstegui que molt amablement m'apadrina en aquesta ocasió, i als amics Doctors Rafael i Elena Barraquer, esperant que aquesta ocasió sigui una petita però entranyable homenatge a Don Joaquim, justament en aquesta edició de 2016, any que el mestre ens ha deixat.

La integritat y la función normal del epitelio corneal son cruciales para mantener la transparencia de la córnea y la visión. La existencia de una subpoblación celular con características de células progenitoras multipotentes en el limbo esclerocorneal mantiene una dinámica de constante reparación y renovación epitelial. En la actualidad, las terapias basadas en células para el reemplazo biológico - *cultured limbal epithelial transplantation* (CLET) y el *cultured oral mucosal epithelial transplantation* (COMET) - presentan resultados clínicos muy alentadores para el tratamiento de la insuficiencia de las células progenitoras del limbo esclerocorneal (deficiencia de células limbares o *limbal stem cell deficiency*, LSCD) y restaurar así, la visión. Otro enfoque terapéutico emergente consiste en obtener e implementar células progenitoras humanas de diferentes orígenes bajo aproximaciones y métodos de bioingeniería de tejidos. El desarrollo de terapias basadas en células que usan células progenitoras, tales como las *células progenitoras mesenquimales del tejido adulto* o las *células progenitoras pluripotentes inducidas* (IPSC), representa un avance significativo en el tratamiento de ciertas enfermedades oculares, ofreciendo una opción

de tratamiento más fisiológico, más racional y menos invasivo en medicina regenerativa para la superficie ocular.

La superficie ocular está compuesta principalmente por la córnea y la conjuntiva con sus respectivos epitelios. Básicamente, la córnea se compone de cinco capas bien definidas donde el epitelio, tiene un papel clave para mantener la córnea transparente y libre de vasos sanguíneos. Para este fin, el epitelio corneal presenta fenómenos de reparación permanentes esenciales para la conservación de su fisiología y homeostasis, cruciales para mantener la estructura y la integridad de la superficie ocular, su transparencia y la función visual. Se ha observado que las células progenitoras responsables por la renovación continua del epitelio corneal se encuentran en las capas basales del *limbo esclerocorneal*.

El limbo humano -el área anatómica circunferencial (aproximadamente 1,5 mm de ancho) que separa la córnea clara de la esclerótica opaca, que está recubierto por la conjuntiva- sirve como el "reservorio" de las células progenitoras y también proporciona una barrera contra el crecimiento de las células epiteliales de la conjuntiva - que poseen propiedades y características muy diferentes de las del epitelio corneal - y sus vasos sanguíneos hacia el tejido corneal. Debido a sus particularidades, las *células progenitoras del limbo esclerocorneal* (*limbal stem cells*; LSC) tienen un papel clave en el mantenimiento de la integridad y en los eventos de renovación del epitelio corneal.

Sus principales características se destacan: su comportamiento como células progenitoras oligopotentes, su alta relación núcleo-citoplasma, un ciclo celular lento, y su alto potencial proliferativo que agrega su gran capacidad de auto-renovación por división asimétrica. En el limbo, es posible identificar varias subpoblaciones celulares de diferentes progenies (progenitores típicos y células amplificadoras en diferentes etapas de diferenciación), melanocitos, células mesenquimatosas

y presentadoras de antígenos, elementos vasculares y terminaciones nerviosas que forman un entorno especializado y único (*nicho* o microambiente).

La desaparición, reducción o deterioro funcional de las LSC puede producir un estado clínico de LSCD que puede dar lugar a cambios significativos en la superficie ocular. Estos cambios incluyen la aparición de defectos corneales persistentes, queratinización epitelial, fenómenos con el desarrollo de vasos recién formados en el tejido corneal y cicatrización. Todo ello, compromete la fisiología corneal, reduciendo la transparencia y disminuyendo la visión, inclusive ceguera. La pérdida completa de LSC conduce a una reepitelización reactiva de la córnea por células conjuntivales, que tienen una alta capacidad proliferativa. Este evento va seguido de la formación de vasos en la córnea, inflamación crónica con cicatrización del estroma corneal, que causa una disminución pronunciada de la visión y molestias graves. Además, la condición inflamatoria crónica no solo conduce a la muerte de más LSC, sino que también deja a las células epiteliales supervivientes incapaces de funcionar adecuadamente, lo que explica el empeoramiento de los síntomas y las características clínicas a lo largo del tiempo.

Este complejo mecanismo puede ser desencadenado por causas muy frecuentes en nuestro medio, tales como el uso inadecuado de las lentes de contacto o las quemaduras químicas (álcalis y ácidos) que son, sin embargo, la causa más frecuente de la destrucción epitelial que causa la pérdida y/o deterioro de la función de las LSC.

La expansión *ex vivo* de LSC es el enfoque más innovador para el biosustitución de la superficie ocular (CLET). A partir de una biopsia mínimamente invasiva (1-2 mm²) de la región límbica sana (el mismo o el ojo contralateral del paciente), se puede aplicar una técnica de cultivo de explante sobre un sustrato adecuado (por ejemplo: membrana amniótica) o separando la capa epitelial del fragmento obtenido mediante un tratamiento enzimático.

En este último enfoque, las células obtenidas son cocultivadas *in vitro* con técnicas de *feeder-layer* (capas de alimentación; fibroblastos 3T3 inactivados mediante irradiación). Una vez que se logra el crecimiento celular en cultivo, se obtienen suspensiones celulares y se transfieren a sustratos adecuados, tales como fibrina, colágeno o polímeros biocompatibles. La biosustitu-

ción (trasplante celular) se lleva a cabo después de la eliminación de la mayor parte del tejido enfermo de la superficie ocular receptora. Esta metodología tiene muchas ventajas sobre las técnicas de trasplantes de tejido utilizadas hasta la fecha: en esencia, requiere una biopsia límbica sustancialmente menor, que reduce el riesgo de agresión y de inducción de una LSCD el tejido donante sano. Sus otras ventajas incluyen una población de células homogénea, seleccionadas de manera más eficiente, y teóricamente, más enriquecidas con células de características progenitoras. Sin embargo, las técnicas enzimáticas implican un enfoque más complejo, con manipulación adicional del tejido y la necesidad de xenoproductos en las diferentes etapas de la producción del producto de terapia avanzada.

Por su parte, la técnica de explante tiene ciertas ventajas, de entre ellas su simplicidad técnica, a pesar de la heterogeneidad de la población celular cultivada (fibroblastos escleróticos, células presentadoras de antígenos, melanocitos, células del epitelio conjuntival y otros). Siempre es deseable usar células autólogas para la expansión *ex vivo* a fin de que se evite el riesgo de respuesta inmune. Sin embargo, en presencia de la patología ocular bilateral severa, el uso de células epiteliales heterólogas (de cadáver o de donantes vivos familiares) es aceptable. Los mecanismos por los cuales las LSC cultivadas (autólogas o heterólogas) pueden restaurar la superficie ocular aún se desconocen. Las células pueden reemplazar a la población progenitora, y/o "reactivar" las células progenitoras del huésped que no funcionan y así proporcionando estímulos para el crecimiento, o cambiar el comportamiento de nicho.

El trasplante de córnea (queratoplastia penetrante) siempre se ha considerado la terapia convencional para restaurar el tejido corneal. Sin embargo, esta técnica no es una estrategia viable para pacientes que sufren LSCD, porque no reemplaza la población de LSC, no corrigiendo el fallo de los mecanismos de renovación epitelial. Así, la terapia basada en células es el enfoque más racional para la biosustitución de la superficie ocular en los casos de LSCD, y la fuente celular ideal para la reconstrucción corneal son las LSC autólogas.

De hecho, la terapia para la LSCD ha evolucionado rápidamente en la última década, incluyendo células progenitoras alternativas (de origen autólogo o heterólogo) y enfoques clínicos que contemplan otras modalidades de tratamiento. Como consecuencia, otras estrategias, tales como el uso de *células progenitoras*

mesenquimales de tejido adulto (de la médula ósea o derivadas de tejido adiposo, entre otras) para la terapia regenerativa en lesiones corneales, son relevantes en la actualidad. Se han probado otras fuentes de células progenitoras que se han mostrado útiles en situaciones donde ambos ojos se ven afectados, aunque muchos de estos tipos celulares, aún no están siendo aplicados clínicamente en la actualidad, presentan un gran potencial traslacional.

El descubrimiento de las *células progenitoras pluripotentes inducidas* (*induced pluripotent stem cells*; IPSC) ha sido uno de los avances más significativos en medicina regenerativa en la última década. La sobreexpresión de un conjunto específico de factores de transcripción (por ejemplo: Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 o Oct4, Sox2, Lin28 y Nanog) en células diferenciadas adultas puede reprogramar el destino celular. Las IPSC pueden diferenciarse en varios tipos de células, una propiedad que ha abierto un amplio rango de posibilidades para la investigación de estados celulares, mecanismos de diferenciación, la propia pluripotencia y otros fenómenos celulares relacionados y su comportamiento.

A diferencia de las células embrionarias, las IPSC pueden crearse a partir de células diferenciadas de fácil acceso, como los fibroblastos o los queratinocitos epidérmicos, permitiendo la creación de fuentes autólogas de diferentes tipos de células para terapia regenerativa o el estudio de enfermedades. En este sentido, las IPSC pueden obtenerse de fuentes mínimamente invasivas del propio paciente (por ejemplo: piel) y diferenciarse en LSC, evitando problemas de rechazo inmune del receptor en las sustituciones celulares heterólogas y además, resolviendo el problema de la disponibilidad de células.

Más recientemente, la *reprogramación directa* de células en diferentes estadios (ya sea pluripotentes o somáticas) ofrece uno de los enfoques más prometedores en el campo de la medicina regenerativa, con un enorme potencial para las aplicaciones clínicas y terapéuticas en mayor profundidad. La reprogramación directa se caracteriza por un proceso en el que las células somáticas maduras, ya completamente diferenciadas, pueden inducirse a otros tipos de células sin pasar necesariamente por un estado pluripotente. Para tal fin, las células pueden ser reprogramadas por sobreexpresión transitoria de factores transcripcionales durante un intervalo de tiempo relativamente corto. Las células en este estado se llaman células IPS-parciales; respon-

den a diferentes entornos de señalización (por ejemplo: factores de crecimiento, citoquinas, agentes inductores, etc.) y tienen la capacidad de dirigir las decisiones del destino celular en la reprogramación.

Para la reparación corneal, la reprogramación directa sería una gran ventaja, ya que no solo eliminaría las etapas pluripotentes (potencialmente cancerígenas) sino que también evitaría la producción y caracterización prolongada de las líneas IPSC. Como se necesitan muy pocas células para la terapia celular en la superficie ocular, la capacidad de expansión limitada de las IPSC no sería un factor limitante, así como el tiempo de producción, que sería mucho más corto con una metodología más sencilla.

La aplicación de IPSC para el tratamiento de la superficie ocular, aunque presenta grandes perspectivas terapéuticas, todavía se encuentra en fases consideradas pre-clínicas. Con respecto a la aplicación de IPSC en el campo de la terapia celular para la patología ocular, estas han demostrado ser muy prometedoras en el tratamiento de ciertas enfermedades retinianas degenerativas, particularmente aquellas que afectan la funcionalidad del epitelio pigmentario de la retina debido a su disfunción o muerte. En este contexto, en la degeneración macular asociada a la edad (forma atrófica o atrofia geográfica), las IPSC ya están siendo usadas en algunos ensayos clínicos en humanos como terapia avanzada basada en células con resultados previos muy satisfactorios.

Así, el uso de la terapia basada en células para el tratamiento de las enfermedades oculares presenta muchas ventajas, por una variedad de razones: (a) el entorno intraocular se beneficia de un estado de privilegio inmune; (b) el tejido diana a tratar tiene ciertas características anatómicas y funcionales individuales (espacio sub-retiniano definido y epitelios estratificados únicos y especializados); (c) el espacio intraocular es pequeño y limitado, tal como lo requiere el tratamiento dado el bajo número de células involucradas; y (d) el espacio intraocular y la superficie ocular son fácilmente controlables mediante sofisticados sistemas de diagnóstico y seguimiento por imágenes que permiten una monitorización conveniente con seguimiento clínico satisfactorio, por ejemplo, mediante inyección de células en el espacio sub-retiniano o en el cuerpo vítreo, que permite la visualización del efecto terapéutico y posibles complicaciones. Por estas razones, varios ensayos

clínicos, tanto mediante terapia celular como con terapia génica, están siendo llevados a cabo recientemente.

Asimismo, en los últimos años hemos observado desarrollos significativos en el uso de las terapias basadas en células combinadas al uso de biomateriales o sustratos biocompatibles para la biosustitución mediante ingeniería de tejido. Los enfoques actuales para mejorar estas estrategias terapéuticas incluyen la estandarización de las condiciones de cultivo con desarrollo de sistemas de cultivo libres de xenobióticos, evaluación de nuevos sustratos biofuncionales para optimizar la expansión de células progenitoras y la eficacia del trasplante, y exploración de fuentes alternativas de células progenitoras autólogas.

Hasta la fecha, la búsqueda de estrategias y enfoques innovadores en el campo de la reconstrucción de la superficie ocular ha producido algunos resultados alentadores. Así, una fuente emergente alternativa de células para tratar la superficie ocular es el uso de células progenitoras adultas, que proporcionan un alto potencial proliferativo, capacidad diferenciada y menor inmunogenicidad; no son tumorígenas y pueden obtenerse mediante metodologías mínimamente invasivas. Representan un tratamiento más fisiológico, más racional y menos invasivo. Mientras tanto, las células proge-

nitoras del tejido adulto, como en el caso de las células mesenquimales, aunque han mostrado un potencial intrínseco para una posible diferenciación epitelial, esto aún no se ha logrado.

Además, las perspectivas de las terapias derivadas de IPSC, que pueden producir una variedad de tipos celulares, son emocionantes. Aunque las IPSC aún no se han utilizado para la reconstrucción de la superficie ocular, un estudio reciente ha demostrado una generación exitosa de células epiteliales corneales. La búsqueda de fuentes alternativas de células progenitoras para el tratamiento de enfermedades de la superficie ocular representará siempre un desafío. En este sentido, las IPSC representan una opción muy prometedora para su aplicación regenerativa de la superficie ocular. En el futuro, una comprensión más profunda de las características del comportamiento del nicho de las LSC, así como de los fenómenos relacionados a la proliferación y diferenciación celulares, seguramente contribuirá para extender el uso clínico de IPSC en el ámbito de la medicina regenerativa de la superficie ocular.

Treball guardonat amb el premi Dr. Joaquim Barraquer, 2017, de la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya.