

Amom Mendes Nascimento

**Perfil genético-molecular de pacientes com epidermólise bolhosa
utilizando sequenciamento de nova geração**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leslie Domenici Kulikowski

São Paulo

2022

Amom Mendes Nascimento

**Perfil genético-molecular de pacientes com epidermólise bolhosa
utilizando sequenciamento de nova geração**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Leslie Domenici Kulikowski

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Amom Mendes

Perfil genético-molecular de pacientes com epidermólise bolhosa utilizando sequenciamento de nova geração / Amom Mendes Nascimento. -- São Paulo, 2022.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Descritores: 1.Diagnóstico clínico 2.Doenças genéticas inatas 3.Epidermólise bolhosa 4.Técnicas de diagnóstico molecular 5.Genes 6.Perfil genético 7.Saliva 8.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala

USP/FM/DBD-442/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Para os meus pais, Amando e Vanda, e para todos os pacientes que contribuíram com este estudo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski, por todo apoio, incentivo, compreensão e paciência infinita durante todos esses anos trabalhando juntos.

À Prof.a Dr.a Chong Kim por toda a ajuda durante minha trajetória na instituição e aos seus residentes da Unidade de Genética.

À Dr.a Samantha Kelman e à Dr. Silvia Barbosa pela colaboração e ajuda com os pacientes.

À Profa. Dra. Maria Cecilia Rivitti, à Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira, à Dra. Luciana Samorano, à doutoranda Chan I Thien e Jéssica Baka pela colaboração e ajuda com os pacientes.

A todos os pacientes que de forma tão generosa contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Aos amigos que fiz na bancada do Laboratório de Citogenômica, Alexandre, Roberta, Évelin, Thaís, Gil, Marília, Fabrícia, Mariana, Samar, Yanca, Vanessa, Gleyson, Lucas, Beatriz, Camila, Ana Carolina, Fernanda e Mayara por todos os ensinamentos, conversas e risadas.

À minha mãe, Vanda Mendes, ao meu pai, Amando Lima, às minhas irmãs Leandra e Talyta e a minha sobrinha Isabela.

Aos meus avós paternos, Ana Moreira Lima (*in memorian*) e Patrício Martins Bispo do Nascimento.

Aos meus avós maternos Manuel Moreira Mendes (*in memorian*) e Ieda Pacheco Cerqueira.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“A vida resulta da sobrevivência
não-aleatória de replicadores
aleatoriamente mutantes.”

Richard Dawkins

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Considerações sobre a Epidermólise Bolhosa	17
1.2. Tipos de Epidermólise Bolhosa.....	18
1.3. EB Simples	18
1.4. EB Juncional	19
1.5. EB distrófica	20
1.6. Síndrome de Kindler	21
1.7. Genes associados à EB.....	22
1.8. EPIDEMIOLOGIA	Erro! Indicador não definido.
1.9. COMORBIDADES E MORTALIDADE.....	Erro! Indicador não definido.
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo principal	25
2.2. Objetivos secundários.....	25
3. MÉTODOS	27
3.1. Casuística	27
3.2. Extração e quantificação do DNA genômico.....	27
3.3. Desenvolvimento do painel, preparação da biblioteca, Sequenciamento.....	28
3.4. Bioinformática e Análise	28
4. RESULTADOS	31
4. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÕES.....	36
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

Nascimento AM. Perfil genético-molecular de pacientes com epidermólise bolhosa utilizando sequenciamento de nova geração [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Epidermólise bolhosa (EB) hereditária é o nome de um grupo heterogêneo de doenças genéticas raras que levam ao aparecimento recorrente de bolhas que se formam espontaneamente ou como resposta a traumas mínimos. O diagnóstico dos diferentes tipos de EB atualmente é estabelecido a partir da história clínica e do modo de transmissão da doença aliado ao mapeamento antigênico de imunofluorescência ou microscopia eletrônica de transmissão. No entanto, em alguns casos, os resultados dos testes histológicos são inconclusivos, dificultando o diagnóstico preciso. Objetivo: Desenvolver um painel específico de sequenciamento de nova geração (NGS) para os genes associados à Epidermólise Bolhosa. Metodologia: Amostras do sangue periférico de pacientes com diagnóstico clínico de EB foram sequenciadas com a plataforma Illumina® utilizando um painel multigênico customizado (Agilent Technologies). Resultados e discussão: Identificamos 33 variantes distribuídas em 7 genes nos 45 pacientes. As variantes foram classificadas seguindo os critérios do ACMG. Por meio da aplicação do painel foi possível classificar o tipo de EB baseados na avaliação do perfil genético-molecular, sendo ainda realizada a reclassificação de pacientes em casos onde as hipóteses clínicas iniciais e/ou imunomapeamento estavam equivocados. Conclusão: O NGS mostrou-se útil na tarefa de encontrar variantes patológicas, classificar corretamente os tipos de EB, e concluir o diagnóstico genético dos pacientes

Palavras-chave:

Diagnóstico clínico, Doenças genéticas inatas, Epidermólise bolhosa, Técnicas de diagnóstico molecular, Genes, Perfil genético, Saliva, Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala.

ABSTRACT

Nascimento AM. Molecular-genetic profile of patients with epidermolysis bullosa using next-generation sequencing [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Introduction: Hereditary epidermolysis bullosa (EB) is the name of a heterogeneous group of rare genetic diseases that lead to the recurrent appearance of blisters that form spontaneously or in response to minimal trauma. The diagnosis of different types of EB is currently based on the mode of transmission based on the clinical history and the mode of transmission of the disease combined with antigenic or electronic microscogenic mapping of transmission. However, in some cases, the results of histological tests are inconclusive, making accurate diagnosis difficult. **Objective:** To develop a specific multigene next generation sequencing (NGS) panel for the genes associated with Epidermolysis Bullosa. **Methodology:** Agilent Technologies. **Results and discussion:** What are the variants (in genes?) that are different (in?) in 14 patients. Of these, following the ACMG results patients, 13 were classified as pathogenic and 5 application of this panel was possible to diagnose **Conclusion:** NGS proved to be useful in the task of finding pathological variants, correctly classifying the types and subtypes of EB, and determining the diagnosis. patients genetics.

Keywords: Clinical diagnosis, Genetic diseases inborn, Epidermolysis bullosa, Molecular diagnostic techniques, Genes, Genetic profile, Saliva, High-throughput nucleotide sequencing.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações sobre a Epidermólise Bolhosa

Epidermólise bolhosa (EB) é um denominador comum de uma série de alterações cutâneas que cursam com a fragilidade intensa a mínimos traumas que levam ao aparecimento de bolhas (J.-D. Fine & Hintner, 2009). Sua prevalência é de 8,22/1 milhão e incidência de 19,6/1 milhão de nascidos vivos nos Estados Unidos (Pfundner, Uitto, & Fine, 2001) não apresentando grande variação entre os demais países. (J. D. Fine, 2010a).

A literatura mostra que mutações em 18 genes (J. D. Fine et al., 2014) expressos na zona da membrana basal (ou junção dermoepidérmica), que codificam proteínas estruturais que responsáveis pela aderência da pele, podem causar a doença (Bruckner-Tuderman & Has, 2014; Uitto, Has, Vahidnezhad, Youssefian, & Bruckner-Tuderman, 2016).

A EB é classificada em quatro tipos baseados no nível ultraestrutural do plano de clivagem da pele: EB simples, EB juncional, EB distrófica e EB tipo misto (Síndrome de Kindler) podendo ainda ser dividida em subtipos de gravidade variável de acordo com os achados clínicos, defeitos moleculares e tipo de herança envolvida, recessiva ou dominante (J. D. Fine, Eady, et al., 2008).

A EB é considerada uma doença hereditária muito rara, decorrente de alterações genéticas que comprometem especialmente as da estrutura da zona da membrana basal (ZMB) dermoepidérmica (Bruckner-Tuderman & Has, 2014; J.-D. Fine & Hintner, 2009; J. D. Fine et al., 2014; Uitto, Has, et al., 2016).

As bolhas, que se desenvolvem por traumas mínimos, manifestam-se, geralmente, já ao nascimento ou durante os primeiros anos de vida, porém, nas formas mais leves, a doença pode não se tornar aparente até a infância tardia ou o início da idade adulta (J. D. Fine, 2010b). Há uma fragilidade das células basais epidérmicas, que, ao se romperem, permitem a entrada do fluido extracelular no espaço produzido na epiderme pela lesão (J.-D. Fine & Hintner, 2009).

1.2. Tipos de Epidermólise Bolhosa

O estudo histopatológico da pele do paciente com EB é capaz de diferenciar o nível de clivagem da bolha em intraepidérmica e subepidérmica sem, no entanto, conseguir classificar exatamente qual o tipo de epidermólise, sendo necessária a realização do imunomapeamento, que consiste em uma técnica que analisa a presença de antígenos da zona de membrana basal por meio da exposição a anticorpos monoclonais fluorescentes (Pohla-Gubo, Cepeda-Valdes, & Hintner, 2010). Dessa forma, descrevemos a seguir os principais tipos de EB.

1.3. EB Simples

É o tipo mais comum da doença, correspondendo a mais de 92% de todos os casos (Habif, 2015). As bolhas são confinadas à epiderme e de acordo com sítio de clivagem da epiderme, a EB simples pode ser classificada em basal ou suprabasal (J. D. Fine et al., 2014). A maioria das formas apresenta um padrão de herança autossômico dominante e ocorre mais frequentemente por alteração nos genes KRT5 e KRT14 que codificam queratinas filamentosas (Fuchs, 1999). Mesmo traumas mínimos podem levar ao aparecimento de bolhas confinadas à epiderme que se curam completamente e não deixam cicatrizes na pele. Em alguns casos há o comprometimento leve de mucosas e unhas sendo o estado geral do paciente bom (J.-D. Fine & Hintner, 2009). Com o passar dos anos existe uma tendência de regressão das lesões (Gonzalez, 2013; Hacham-Zadeh, Rappersberger, Livshin, & Konrad, 1988; Laimer, Prodinger, & Bauer, 2015; Livingston et al., 2001; Yasukawa, Sawamura, McMillan, Nakamura, & Shimizu, 2002). Na variante localizada, geralmente há bolhas apenas nas mãos e pés – locais de maiores atritos, porém, em alguns casos a mucosa oral pode ser levemente afetada (Laimer et al., 2015).

Nas formas EB Simples generalizada e Dowling-Meara o quadro bolhoso é mais intenso e as alterações pós-inflamatórias maiores muitas vezes se iniciam desde o nascimento. No caso de EBS Dowling-Meara as bolhas podem adquirir aparência herpetiforme e há gradual comprometimento palmo-plantar com queratodermia e alterações dentárias e ungueais (Gonzalez, 2013).

1.4. EB Juncional

A alteração do gene LAMB3 leva a modificação da laminina 332 (antigamente chamada laminina 5) que por sua vez desencadeia o quadro de EB Juncional com a clivagem abaixo dos queratinócitos basais, na lâmina lúcida. Nesta também se encontra, além da laminina 332, as proteínas: antígeno do penfigóide bolhoso (ou colágeno XVII) e a integrina $\alpha 6\beta 4$ que também podem sofrer mutações e levar a quadros clínicos semelhantes (J.-D. Fine & Hintner, 2009).

Sua herança é autossômica recessiva e seu quadro clínico pode variar de muito grave na forma Herlitz ou letal, caso a deficiência da laminina 332 seja muito significativa, ou leve na EB Juncional mitis, com um quadro que inclusive melhora com o passar dos anos com menor alteração da laminina 332 (J.-D. Fine & Hintner, 2009).

Na variante Herlitz as bolhas aparecem desde o nascimento, há acometimento ungueal, dentário, capilar e de mucosas incluindo ocular, oral, esofágica e anal. Na região perioral pode haver característico tecido de granulação. Pode ser letal já na primeira infância. As principais causas de mortalidade são a falência respiratória e sepse (J. D. Fine, Johnson, Weiner, & Suchindran, 2008). Em contrapartida, na variante mitis ou não-Herlitz, com a mutação mais focada no colágeno XVII, tem manifestação clínica mais leve com sobrevida semelhante a da população, mas também apresentando acometimentos capilares, dentários e ungueais de vários graus (Gonzalez, 2013).

1.5. EB distrófica

Apresentação grave da EB, causada por alterações no gene do no colágeno VII que é parte principal das fibrilas ancorantes fundamentais na junção da lâmina densa à derme. Ocorrem tanto por herança autossômica dominante quanto recessiva. Após a formação de bolhas pós-traumas, há presença de cicatrizes permanentes que são maiores ou menores a depender da intensidade do atrito (J. D. Fine et al., 2014; J. D. Fine, Eady, et al., 2008).

Também é presente o encontro de miliuns – micropápulas amareladas e endurecidas que ocorrem por destruição dos folículos pilosos nas áreas de cicatrização. Pode haver pseudossindactilia de dedos de mãos e pés (sempre mais sujeitos aos traumas) com inclusive perda de função. Há um aumento na incidência de carcinoma espinocelular nos pacientes com EB Distrófica mesmo em áreas fotoprotegidas o que torna fundamental seu exame físico cutâneo regular (J. D. Fine et al., 2014; J. D. Fine, Eady, et al., 2008; J.-D. Fine & Hintner, 2009).

Nos casos de EB Distrófica dominante as bolhas surgem mais em extremidades, e mesmo havendo cicatrizes e miliuns, não costuma haver alterações dentárias, as alterações mucosas são leves e o estado geral bom. Porém, nos casos de EB Distrófica recessiva, as manifestações clínicas são muito extensas, mutilantes devido às pseudossinéquias, com acometimento mucoso intenso que afeta inclusive a nutrição, ausência de unhas, alterações dentárias em vários graus e maior possibilidade de desenvolver carcinomas espinocelulares. O carcinoma espinocelular nos pacientes com EB Distrófica recessiva é a maior causa de morbimortalidade com mais de 55% levando ao óbito aos 40 anos devido ao intenso potencial metastático (Mallipeddi, 2002; Venugopal & Murrell, 2010).

1.6. Síndrome de Kindler

Forma mais recentemente incluída na classificação é autossômica recessiva, causada pela mutação do gene FERMT1 que codifica a proteína FFH1 e atinge os queratinócitos basais. Clinicamente é uma mistura das anteriores, com também formação de bolhas a traumas leves e associadamente apresenta-se com poiquilodermia, atrofia da pele, fotossensibilidade e risco aumentado para câncer de pele (D'Souza, Kimble, & McMillan, 2010).

Sendo uma síndrome bolhosa mista o nível de clivagem é variável, a depender da gravidade do quadro do paciente, desta forma a histopatologia não é bem caracterizada (Yazdanfar & Hashemi, 2009).

1.7. Genes associados à EB

Dividida em quatro grupos, a EB pode exibir um espectro de gravidade que reflita os tipos e combinações de mutações dos diferentes genes associados à doença (Tabela 1).

Responsável por 92% dos casos de epidermólise bolhosa (Habif, 2015), alterações em 11 genes (*KRT5*, *KRT14*, *TGM5*, *DSP*, *PKP1*, *JUP*, *EXPH5*, *PLEC*, *DST*, *ITGB4*, *COL17A1*) já foram descritas em pacientes cujos achados clínicos eram sugestivos de EB simples (Uitto, Bruckner-Tuderman, et al., 2016). Este grupo pode apresentar um padrão de herança autossômica recessiva ou dominante, sendo que 75% dos casos de herança autossômica dominante ocorrem por uma mutação no gene *KRT5* (Uitto, Bruckner-Tuderman, et al., 2016).

A EB distrófica, cujo padrão de herança pode ser tanto autossômico dominante quanto recessivo, é responsável por 5% dos casos de EB (Habif, 2015) e está relacionada ao gene *COL7A1* (Uitto, Bruckner-Tuderman, et al., 2016).

Nos casos de EB juncional, a doença está relacionada a mutações em sete diferentes genes (*LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGA6*, *ITGB4*, *ITGA3*) (Uitto, Bruckner-Tuderman, et al., 2016), e apresenta um padrão de herança autossômico recessivo, sendo responsável por 1% do total de casos de EB (Habif, 2015).

Os 2% restantes correspondem a SK e a formas não classificadas de EB. Na Síndrome de Kindler o modo de herança é autossômico dominante e a doença está relacionada a mutações no gene *FERMT1*.

Tabela 1. Heterogeneidade molecular das diferentes formas de EB				
Doença	Genes	Herança	Mutações conhecidas	Proporção de casos atribuídos
EB simples (EBS)	<i>KRT5</i>	AD	Del, Indels, MS, NS, Spl	75% dos casos de EBS-AD
	<i>KRT14</i>	AR, AD	Del, Indels, Ins, MS, NS, Spl	
	<i>TGM5</i>	AR	Del, Indels, MS	Mais de 10% dos casos de EBS
	<i>DSP</i>	AR	Del, MS, NS	
	<i>PKP1</i>	AR	Del, Indels, Ins NS, Spl	
	<i>JUP</i>	AR, AD	NS, Spl	
	<i>EXPH5</i>	AR	Del, Ins, NS	
	<i>PLEC</i>	AR, AD	Del, Indels, Ins, MS, NS, Spl	
	<i>DST</i>	AR	NS	Raro
	<i>ITGB4*</i>	AR	MS, NS, Del, Ins, Spl	Raro
	<i>COL17A1**</i>	AR	Del	Raro
EB junctional (EBJ)	<i>LAMA3</i>	AR	Del, NS, Spl	9% dos casos de EBJ
	<i>LAMB3</i>	AR	Del, Ins, NS, Spl	70% dos casos de EBJ
	<i>LAMC2</i>	AR	Del, Indels, NS, Spl	9% dos casos de EBJ
	<i>COL17A1</i>	AR	Del, Ins, MS, NS, Spl	10% dos casos de EBJ
	<i>ITGA6</i>	AR	Del, MS, NS, Spl	Alguns casos relatados
	<i>ITGB4</i>	AR	Del, Indels, Ins, MS, NS, Spl	Muitos casos relatados
	<i>ITGA3</i>	AR	Del, NS, Spl	Alguns casos relatados
EB distrófica (EBD)	<i>COL7A1</i>	AR, AD	Del, Indels, Ins, MS, NS, Spl	100% dos casos de EBD
Síndrome de Kindler (SK)	<i>FERMT1</i>	AR	Del, Indels, Ins, NS, Spl	100% dos casos de SK

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

- Desenvolver um painel específico de sequenciamento de nova geração (NGS) para os genes associados à Epidermólise Bolhosa.

2.2. Objetivos secundários

- Identificar as variantes genômicas relacionadas aos diferentes tipos de epidermólise de epidermólise bolhosa em nossos pacientes
- Padronizar e implantar o método de desenvolvimento de painel específico e sequenciamento por NGS em nosso laboratório.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

A casuística do presente estudo foi composta por 49 pacientes com diagnóstico clínico de epidermólise bolhosa e sem estudo molecular prévio ou cujo estudo foi incompleto ou insuficiente para a identificação das variantes envolvidas no quadro clínico. Todos os 49 casos são provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), sendo 27 deles do ambulatório de Dermatologia e 22 do ambulatório de Genética em conjunto com a Unidade de Dor do Instituto da Criança.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Cappesq – 2.269.829/2017). Os pacientes e/ou seus responsáveis legais consentiram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O estudo está sendo realizado no Laboratório de Citogenômica - LIM 03 do Departamento de Patologia da FMUSP.

3.2. Extração e quantificação do DNA genômico

As amostras de DNA utilizadas no sequenciamento massivo em paralelo foram extraídas a partir de leucócitos (células de origem mesodérmica) presentes nas amostras de sangue periférico e de células epiteliais escamosas (células de origem ectodérmica) e leucócitos presentes nas amostras de saliva. Optamos por utilizar amostras de saliva objetivando reduzir o desconforto dos pacientes dada a sua condição clínica e, ainda com esse objetivo, amostras de sangue periférico utilizadas são sobras do material que foram originalmente coletadas para exames de hemograma e que seriam descartadas após o exame. (não sei se vale a pena manter).

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos com o anticoagulante EDTA e as de saliva, aproximadamente 3 mL, em tubos oragene OG-500. Realizamos a extração de DNA utilizando os kits QIAamp DNA Blood Midi Kit (250) (QIAGEN®) e DNeasy Blood & Tissue Kit (250) com pequenas alterações no protocolo para a extração de saliva.

Posteriormente todas as amostras de DNAs extraídas foram quantificadas utilizando o Qubit (Invitrogen, Estados Unidos), capaz de detectar a corantes fluorescentes ligados à molécula alvo, neste caso o DNA dupla, e estimar de com acurácia concentração da molécula.

3.3. Desenvolvimento do painel, preparação da biblioteca, Sequenciamento

Para o estudo do perfil genético molecular dos pacientes da nossa casuística realizamos o sequenciamento massivo em paralelo de genes relacionados a epidermólise bolhosa. A primeira etapa do experimento foi o desenvolvimento de painéis específicos para esta finalidade. Os genes que compõe os painéis foram escolhidos com base em evidências para um papel causal na EB. A primeira versão do painel continha inicialmente 18 genes escolhidos com base em evidências para um papel causal na epidermólise bolhosa, porém, ao longo do estudo, e conforme ocorreram atualizações na literatura, novos genes foram adicionados. Posteriormente também optamos também, por adicionar genes relacionados a outras genodermatoses. A segunda versão do painel continha 35 genes, 17 além dos 18 originais.

Uma vez que os genes para a construção do painel foram definidos, o painel foi desenhado no software SureDesign (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) com base no release hg19 do genoma humano e posteriormente os oligonucleotídeos locus específicos de captura contidos no kit de preparação de biblioteca (Sureselect, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) foram sintetizados.

Uma vez personalizado para este estudo, o protocolo do kit foi aplicado às amostras de DNA genômico de pacientes com diagnóstico clínico de Epidermólise Bolhosa com a finalidade de preparar a biblioteca para o sequenciamento. As bibliotecas foram sequenciadas pelo MiSeq Desktop Sequencer (Illumina®).

3.4. Bioinformática e Análise

Os dados brutos do sequenciamento são armazenados no equipamento em arquivos de texto no formato basecall (“.bcl”) e convertidos em arquivos FastQ(.fastq.gz) automaticamente pelo equipamento. Após obter os arquivos FastQ o software surecall da empresa Agilent Technologies, Santa Clara, CA foi utilizado para o alinhamento das sequencias geradas, chamada de variantes e anotação de dados populacionais, dados

computacionais e preditivos, estudos funcionais, dados de segregação, dados De novo, etc. Posteriormente as variantes foram classificadas de acordo com os critérios do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) de 2015.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Realizamos o sequenciamento do DNA de 53 amostras, dos quais 38 foram obtidas de amostras de saliva e 15 sangue periférico. Destas amostras 49 eram de casos índice e 4 de pais de pacientes. 26 dos 49 casos índice são do sexo masculino e 23 do sexo feminino.

Dentre os 35 genes que compõe os painéis multigenicos utilizados, apenas em 6 deles (*COL17A1*, *COL7A1*, *KRT14*, *KRT5*, *LAMB3*, *LAMC2*) foram encontradas variantes associadas a epidermólise bolhosa e em um, o *KRT16*, uma variante relevante para outra genodermatoses, a Paquioníquia Congênita.

Não foram encontradas variantes associadas a Epidermólise Bolhosa em 4 dos pacientes investigados. Em todos os 4 genitores investigados foi possível encontrar a variante herdada pelos casos índice.

Foi possível detectar 67 variantes em 45 dos casos índices e em 4 dos pais de pacientes, sendo 56 delas no gene *COL7A1*, três no gene *KRT14*, duas em *KRT5*, Duas em *LAMB3*, duas em *LAMC2*, uma em *COL17A1* e uma em *KRT16*.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Dos 45 pacientes com variantes relevantes para o quadro de epidermólise bolhosa, 35, aproximadamente 78% dos casos, são de epidermólise bolhosa distrófica causada por alterações no gene *COL7A1*. Cinco pacientes (11% dos casos) possuem alterações patogênicas em *KRT5* e *KRT14* responsáveis por um quadro de epidermólise bolhosa simples e outros 11% possuem um quadro de epidermólise bolhosa junctional causado por alterações nos genes *COL17A1*, *LAMB3* E *LAMC2*.

De acordo com a literatura, a maior parte dos casos de epidermólise bolhosa são de epidermólise bolhosa simples (92% dos casos), seguida por casos de epidermólise bolhosa distrófica (5%) e epidermólise bolhosa junctional (1%) dos casos (Uitto, Bruckner-Tuderman, et al., 2016).

A discrepância entre o resultado previsto na literatura e o encontrado em nossa casuística pode ser explicada pelo fato de que pacientes com quadros mais brandos não fazem acompanhamento no ambulatório de dor e também são menos assíduos na dermatologia, o que fez com que a proporção de casos de epidermólise Bolhosa distrófica e junctional estivessem mais representadas numa proporção maior do que o esperado.

Foi possível confrontar a hipótese clínica e o imunomapeamento com os resultados do sequenciamento por 29 vezes. Em 10 vezes foi possível corrigir o resultado do imunomapeamento.

Uma das pacientes (Caso 43) apresentou concomitantemente duas variantes patogênicas em heterozigose em dois genes distintos, o *COL7A1* e o *KRT16*. A paciente de 50 anos de idade, sexo feminino, desde o nascimento apresentava bolhas desencadeadas por mínimos traumas e desde os 19 apresentava também cicatrizes hipertróficas e pápulas prurigoideas nos membros inferiores, associadas a prurido intenso. Iniciou o seguimento clínico no ambulatório de dermatologia aos 40 anos de idade. Foi submetida a biópsia de pele e imunomapeamento. A biópsia de pele mostrou clivagem subepidérmica e moderado infiltrado linfocitário, perivascular e intersticial, em derme superficial, além de proliferação vascular. O imunomapeamento mostrou fluorescência no teto da bolha e clivagem na sublâmina densa, com depósito de antígeno do penfigoide bolhoso (hemidesmossomo), anticorpo monoclonal anti-laminina 5 (lâmina lúcida),

anticorpo monoclonal anti-colágeno tipo IV (lâmina densa) e anticorpo monoclonal anti-colágeno tipo VII (fibrilas de ancoragem) no lado dérmico.

Dessa forma, foi confirmada a hipótese diagnóstica de epidermólise bolhosa distrófica dominante, clinicamente característica da variante pruriginosa.

A apresentação clínica da paciente consiste em pápulas, placas e nódulos liquenificados cicatriciais nas regiões pré-tibiais e panturrilhas, milia, exulcerações, placas atróficas, bolhas nos pés e distrofia nos pododáctilos (achado clínico associado com EBD). Manifestações clínicas de paquioníquia congênita como queratodermia plantar, dor plantar intensa, espessamentos das unhas dos quirodáctilos e dos pododáctilos e leucoqueratose oral estão ausentes.

Seus pais não são consanguíneos e não há outros casos de EB na família. Como comorbidades, apresenta hipotireoidismo e depressão. Prurido foi previamente tratado com gabapentina e talidomida, suspensos devido a efeitos adversos. Atualmente a paciente está em uso de amitriptilina, anti-histamínicos, corticóide tópico e emolientes. Investigação laboratorial de outras etiologias de prurido não revelou achados específicos.

A variante em *KRT16* é associada a Paquioníquia congênita, uma genodermatose rara com padrão de herança autossômico dominante. Tipicamente os pacientes apresentam dor plantar intensa, queratodermia palmoplantar com bolhas subjacentes, distrofia ungueal (espessamento das unhas) e leucoqueratose oral está comumente presente (Wilson et al., 2014). Apesar de carregar a variante, a paciente não apresenta manifestações clínicas de paquioníquia congênita. Seus achados nas unhas estão associados apenas a epidermólise bolhosa distrófica.

Sem excluir parentesco, as alterações em COL7A1 correspondem a 83,58% de todas as variantes relevantes encontradas. São 56 das 67 variantes. A variante c.5047C>T aparece 13 vezes em nossas amostras. A variante c.6527dupC, que aparece 9 vezes. A variante c.6022C>T aparece 4 vezes. As variantes c.2783_2784insGACAC, c.58_70delCGAGTGCGAGCCC e c.7078G> aparecem três vezes cada. As variantes c.325_326insCG, c.5132_5133insTCACC, c.6082G>A, c.6130C>T, e c.7380+2T>C apareceram duas vezes cada. As variantes c.157_177dupAATTTCCGCGAGGTCCGCAGC, c.4018C>T, c.425A>G, c.54_55delGC, c.5572G>T, c.5820G>A, c.6127G>T, c.6187C>T, c.7097G>T, c.7249C>T e c.8054G>C aparecem uma vez cada em nossa casuística.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A construção de um painel customizado específico para os genes associados à Epidermólise Bolhosa, sua padronização e conseqüente implantação em nosso laboratório foi realizada com sucesso e mostrou ser uma estratégia válida para classificação dos tipos de EB baseada em resultados moleculares. Sendo relevante constatar que o resultado do sequenciamento permitiu classificar corretamente o tipo de Epidermólise bolhosa, e em alguns casos corrigir a classificação por imunomapeamento.

A aplicação do painel personalizado identificou variantes genômicas capazes de confirmar o diagnóstico de forma inequívoca para a maioria dos pacientes, e obter informações relevantes para entender melhor a heterogeneidade dos fenótipos clínicos nessa doença para esses pacientes, além de possibilitar .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bruckner-Tuderman, L., & Has, C. (2014). Disorders of the cutaneous basement membrane zone--the paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol*, 33, 29- 34. doi: 10.1016/j.matbio.2013.07.007
- D'Souza, M. A., Kimble, R. M., & McMillan, J. R. (2010). Kindler syndrome pathogenesis and fermitin family homologue 1 (kindlin-1) function. *Dermatol Clin*, 28(1), 115-118. doi: 10.1016/j.det.2009.10.012
- Fine, J.-D., & Hintner, H. (2009). *Life with Epidermolysis Bullosa (EB) Etiology, Diagnosis, Multidisciplinary Care and Therapy* J.-D. Fine & H. Hintner (Eds.), Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-211-79271-1>
- Fine, J. D. (2010a). Inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet J Rare Dis*, 5, 12. doi: 10.1186/1750-1172-5-12
- Fine, J. D. (2010b). Inherited epidermolysis bullosa: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci*, 1194, 213-222. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05463.x
- Fine, J. D., Bruckner-Tuderman, L., Eady, R. A., Bauer, E. A., Bauer, J. W., Has, C., . . . Zambruno, G. (2014). Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol*, 70(6), 1103-1126. doi: 10.1016/j.jaad.2014.01.903
- Fine, J. D., Eady, R. A., Bauer, E. A., Bauer, J. W., Bruckner-Tuderman, L., Heagerty, A., Zambruno, G. (2008). The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol*, 58(6), 931-950. doi: 10.1016/j.jaad.2008.02.004
- Fine, J. D., Johnson, L. B., Weiner, M., & Suchindran, C. (2008). Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa. *J Pediatr*, 152(2), 276- 280. doi: 10.1016/j.jpeds.2007.06.039

- Fuchs, E. V. (1999). The molecular biology of epidermolysis bullosa simplex. In Fine JD, Bauer EA, McGuire J, & M. A (Eds.), *Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry* (pp. 280-299). Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Gonzalez, M. E. (2013). Evaluation and treatment of the newborn with epidermolysis bullosa. *Semin Perinatol*, 37(1), 32-39. doi: 10.1053/j.semperi.2012.11.004
- Habif, T. P. (2015). Vesicular and bullous diseases. In T. P. Habif (Ed.), *Clinical dermatology* (pp. 635-667). Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- Hacham-Zadeh, S., Rappersberger, K., Livshin, R., & Konrad, K. (1988). Epidermolysis bullosa herpetiformis Dowling-Meara in a large family. *J Am Acad Dermatol*, 18(4 Pt 1), 702-706.
- Has, C, Fischer, J. Inherited epidermolysis bullosa: New diagnostics and new clinical phenotypes. *ExpDermatol*. 2018; 00: 1– 7. <https://doi.org/10.1111/exd.13668>
- Intong, L. R., & Murrell, D. F. (2012). Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostic criteria and classification. *Clin Dermatol*, 30(1), 70-77. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.03.012
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2011). Next-Generation Diagnostics for Inherited Skin Disorders. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), 1971-1973. doi: 10.1038/jid.2011.253
- Laimer, M., Prodinger, C., & Bauer, J. W. (2015). Hereditary epidermolysis bullosa. *J Dtsch Dermatol Ges*, 13(11), 1125-1133. doi: 10.1111/ddg.12774
- Livingston, R. J., Sybert, V. P., Smith, L. T., Dale, B. A., Presland, R. B., & Stephens, K. (2001). Expression of a truncated keratin 5 may contribute to severe palmar--

plantar hyperkeratosis in epidermolysis bullosa simplex patients. *J Invest Dermatol*, 116(6), 970-974. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01324.x

Mallipeddi, R. (2002). Epidermolysis bullosa and cancer. *Clin Exp Dermatol*, 27(8), 616-623.

Pfendner, E., Uitto, J., & Fine, J. D. (2001). Epidermolysis bullosa carrier frequencies in the US population. *J Invest Dermatol*, 116(3), 483-484. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01279-11.x

Pohla-Gubo, G., Cepeda-Valdes, R., & Hintner, H. (2010). Immunofluorescence mapping for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin*, 28(2), 201- 210, vii. doi: 10.1016/j.det.2009.12.005

Takeichi, T., Liu, L., Fong, K., Ozoemena, L., McMillan, J. R., Salam, A., . . . McGrath, J. A. (2015). Whole-exome sequencing improves mutation detection in a diagnostic epidermolysis bullosa laboratory. *Br J Dermatol*, 172(1), 94- 100. doi: 10.1111/bjd.13190

Tenedini, E., Artuso, L., Bernardis, I., Artusi, V., Percesepe, A., De Rosa, L., Tagliafico, E. (2015). Amplicon-based next-generation sequencing: an effective approach for the molecular diagnosis of epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*, 173(3), 731-738. doi: 10.1111/bjd.13858

Uitto, J., Bruckner-Tuderman, L., Christiano, A. M., McGrath, J. A., Has, C., South, A. P., Robinson, E. C. (2016). Progress toward Treatment and Cure of Epidermolysis Bullosa: Summary of the DEBRA International Research Symposium EB2015. *J Invest Dermatol*, 136(2), 352-358. doi: 10.1016/j.jid.2015.10.050

Uitto, J., Has, C., Vahidnezhad, H., Youssefian, L., & Bruckner-Tuderman, L. (2016). Molecular pathology of the basement membrane zone in heritable blistering

diseases:: The paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol.* doi: 10.1016/j.matbio.2016.07.009

Venugopal, S. S., & Murrell, D. F. (2010). Treatment of skin cancers in epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin*, 28(2), 283-287, ix-x. doi: 10.1016/j.det.2010.01.009

Yasukawa, K., Sawamura, D., McMillan, J. R., Nakamura, H., & Shimizu, H. (2002). Dominant and recessive compound heterozygous mutations in epidermolysis bullosa simplex demonstrate the role of the stutter region in keratin intermediate filament assembly. *J Biol Chem*, 277(26), 23670-23674. doi: 10.1074/jbc.M200974200

Yazdanfar, A., & Hashemi, B. (2009). Kindler syndrome: report of three cases in a family and a brief review. *Int J Dermatol*, 48(2), 145-149. doi: 10.1111/j.1365-4632.2009.03936.x