

Samantha Vernaschi Kelmann

Estudo genético da epidermólise bolhosa

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Chong Ae
Kim

São Paulo

2022

Samantha Vernaschi Kelmann

Estudo genético da epidermólise bolhosa

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Profa. Dra. Chong Ae
Kim

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

Kelmann, Samantha Vernaschi
Estudo genético da epidermólise bolhosa /
Samantha Vernaschi Kelmann. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Chong Ae Kim.

Descritores: 1.Epidermólise bolhosa 2.Doença
genética 3.Microscopia de fluorescência
4.Sequenciamento completo do exoma 5.Aconselhamento
genético 6.Diagnóstico

USP/FM/DBD-397/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a conclusão deste trabalho à minha maravilhosa orientadora Profa. Dra. Chong Ae Kim. Sempre atenciosa e querida, esteve comigo em todos os momentos desde a análise dos pacientes até a entrega final da tese.

Agradeço a orientação sempre amiga da Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski, que com suas palavras conseguia clarear minhas ideias e me ajudar na melhor direção.

Agradeço aos queridos médicos Bruno de Oliveira Stephan e Gustavo Marquezani Spolador, que tanto me ajudaram no aconselhamento genético dos pacientes na entrega dos resultados moleculares.

Agradeço à imensa colaboração do Ambulatório da Dor e Paliativos da Profa. Dra. Silvia Barbosa e da Enfermeira Rita Tiziana Verardo Polastrini. Sem elas não conseguiria nem iniciar os atendimentos.

Agradeço às queridas médicas dermatologistas Dra. Zilda Najjar Prado de Oliveira e Dra. Maria Cecília Rivitti-Machado, com sua contribuição e informações e acessos aos resultados do laboratório de imunomapeamentos do HCFMUSP.

Agradeço à minha querida amiga Dra. Rachel Sayuri Honjo Kawahira por todo seu apoio.

Agradeço muito ao Amom Mendes Nascimento por sua ajuda fundamental em análises laboratoriais.

Agradeço ao biomédico Lucas Liro Vieira com sua inestimável ajuda na confecção das minhas inúmeras tabelas.

Agradeço aos meus familiares, meu pais Eliana e Jaime (in memoriam) e ao meu marido Lucas e meu pequeno Antonio por todo apoio neste momento de extrema dedicação e estudo.

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 Annelise 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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE.....	17
3. JUSTIFICATIVA.....	19
4. OBJETIVOS.....	21
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
6. RESULTADOS.....	26
7. DISCUSSÃO.....	48
8. CONCLUSÕES.....	56
9. ANEXOS.....	59
10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AD= Autossômica Dominante
- AR= Autossômica Recessiva
- COL17A1*= Gene codificador do colágeno tipo XVII
- COL7A1*= Gene codificador do colágeno VII
- DSP*= Gene codificador da desmoplaquina
- EB= Epidermólise bolhosa
- EBD= Epidermólise bolhosa distrófica
- EBDD= Epidermólise bolhosa distrófica dominante
- EBDR= Epidermólise bolhosa distrófica recessiva
- EBJ= Epidermólise bolhosa juncional
- EBS= Epidermólise bolhosa simples
- EXPH5*= Gene codificador da exofilina 5
- FERMT1*= Gene codificador do homólogo 1 da família fermitina
- ITGA3*= Gene codificador da integrina subunidade alfa-3
- ITGA6*= Gene codificador da integrina subunidade alfa-6
- ITGB4*= Gene codificador da integrina subunidade beta-4
- JUP*= Gene codificador da placoglobina
- K14= Queratina 14
- K5= Queratina 5
- KRT14*= Gene codificador da queratina 14
- KRT5*= Gene codificador da queratina 5
- LAMA3*= Gene codificador da subunidade alfa-3 da laminina 332

LAMB3= Gene codificador da subunidade beta-3 da laminina 332

LAMC2= Gene codificador da subunidade gama-2 da laminina 332

NGS= Sequenciamento de nova geração

PKP-1= Gene codificador da placofilina-1

PLEC= Gene codificador da plectina

TGM5= Gene codificador da transglutaminase 5

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Lesões clínicas de pacientes com EB simples. Imagem A alteração de gene <i>KRT5</i> , imagem B alteração de gene <i>KRT14</i> e imagem C alteração de gene <i>PLEC</i>	7
Figura 2-	Alteração de pele de EB juncional. Imagem A e B alteração de gene <i>COL17A1</i>	9
Figura 3-	Alteração de pele EB distrófica. Imagem A e B relacionada a EB distrófica recessiva e imagem C EB distrófica dominante.....	11
Figura 4-	Distribuição tipos de EB por genes acometidos.....	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Subtipos de epidermólises bolhosas, modo de transmissão, proteínas alvo e genes responsáveis.....	13
Quadro 2- Classificação de epidermólise bolhosa (EB), de acordo com o imunomapeamento.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Achados clínicos de EBD Recessiva.....	31
Tabela 2-	Resultados moleculares de pacientes com EB distrófica recessiva no <i>COL7A1</i>	31
Tabela 3-	Comparação entre imunomapeamento e estudo molecular dos pacientes de EB distrófica recessiva – alteração de <i>COL7A1</i>	34
Tabela 4-	Achados clínicos de EBD Dominante.....	37
Tabela 5-	Resultados moleculares de pacientes com alteração no <i>COL7A1</i> dominante.....	38
Tabela 6-	Comparação entre imunomapeamento e estudo molecular dos pacientes de EB distrófica dominante – alteração de <i>COL7A1</i>	38
Tabela 7-	Achados clínicos de EB simples.....	43
Tabela 8-	O estudo molecular de 15 pacientes com EB Simples.....	44
Tabela 9-	Comparação entre imunomapeamento e estudo molecular dos pacientes de EB simples – alteração de <i>KRT5/KRT14/PLEC</i>	45
Tabela 10-	Resultado molecular da paciente com alteração no gene <i>COL17A1</i> Recessiva.....	47
Tabela 11-	Comparação entre imunomapeamento e estudo molecular do paciente de EB juncional – alteração de <i>COL17A1</i>	47

Resumo

Kelmann SV. Estudo genético da epidermólise bolhosa [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A epidermólise bolhosa (EB) é caracterizada por fragilidade cutânea e formação de bolhas. O diagnóstico é feito comumente por imunomapeamento envolvendo procedimento de biópsia cutânea. Recentemente, o estudo molecular tem se mostrado uma importante ferramenta para o diagnóstico preciso dessa doença. No Brasil, o acesso a esses métodos ainda é limitado. **Objetivos:** Descrever o quadro clínico dos pacientes com EB; Identificar as mutações dos genes envolvidos na EB e realizar aconselhamento genético; Correlacionar os achados histológicos e de imunomapeamento com estudos moleculares. **Métodos:** Os 67 pacientes (60 famílias) com EB foram avaliados clinicamente e realizados o sequenciamento completo de exoma de paciente e de seus pais. **Resultados:** Os resultados do estudo molecular 67 pacientes (M: 34 F: 33) foram classificados em: 47 pacientes com EB distrófica recessiva, 4 com EB distrófica dominante, 15 pacientes com EB simples e 1 paciente com EB juncional. Foram encontradas variantes novas não descritas na literatura: EB distrófica recessiva 10/86 variantes no *COL7A1*; EB distrófica dominante 3/4 variantes *COL7A1*; EB simples encontrou uma variante em homozigose no *KRT5* e uma variante em homozigose *PLEC*. O resultado do imunomapeamento em comparação com estudo molecular foi discordante em 22% dos pacientes e inconclusivo em 15%. Na EB distrófica recessiva todos pacientes apresentavam o quadro clínico com acometimento cutâneo generalizado exceto em duas pacientes irmãs com lesões localizadas pré tibiais; tres pacientes apresentaram carcinoma espinocelular e dois faleceram durante o estudo. Na EB simples, pacientes com alteração no gene *PLEC* autossômicos recessivos tiveram quadros clínicos mais graves que alteração nos genes *KRT5* e *KRT14*. **Conclusão:** Este estudo conseguiu analisar clinicamente e classificar de maneira precisa de todos os pacientes pelo estudo molecular, assim oferecer o aconselhamento genéticos adequado à família. Recomendamos o sequenciamento completo de exoma como método de escolha para o diagnóstico de EB.

Descritores: Epidermólise bolhosa. Doença genética. Microscopia de fluorescência. Sequenciamento completo do exoma. Aconselhamento genético. Diagnóstico.

Abstract

Kelmann SV. *Genetic study of epidermolysis bullosa* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Introduction: Epidermolysis bullosa (EB) is characterized by skin fragility and blistering. Diagnosis is commonly made by immunomapping involving a skin biopsy procedure. Recently, molecular studies have proved to be an important tool for the accurate diagnosis of this disease. In Brazil, access to these methods is still limited. **Objectives:** To describe the clinical picture of patients with EB; Identify mutations in genes involved in EB and carry out genetic counseling; Correlate histological and immunomapping findings with molecular studies. **Methods:** The 67 patients (60 families) with EB were clinically evaluated and complete exome sequencing of the patient and his parents was performed. **Results:** The results of the molecular study 67 patients (M: 34 F: 33) were classified into: 47 patients with recessive dystrophic EB, 4 with dominant dystrophic EB, 15 patients with simple EB and 1 patient with junctional EB. New variants not described in the literature were found: recessive dystrophic EB 10/86 variants in *COL7A1*; dominant dystrophic EB 3/4 variants *COL7A1*; Simple EB found a homozygous variant in *KRT5* and a homozygous variant in *PLEC*. The result of immunomapping compared to molecular study was discordant in 22% of patients and inconclusive in 15%. In recessive dystrophic EB, all patients had the clinical picture with generalized skin involvement, except for two sister patients with localized pre-tibial lesions; three patients had squamous cell carcinoma and two died during the study. In simple EB, patients with alterations in the autosomal recessive *PLEC* gene had more severe clinical conditions than alterations in the *KRT5* and *KRT14* genes. **Conclusion:** This study was able to clinical analysis and accurately classify all patients by molecular study, thus offering appropriate genetic counseling to the family. We recommend complete exome sequencing as the method of choice for the diagnosis of EB.

Descriptors: Epidermolysis bullosa. Genetic disease. Fluorescence microscopy. Complete exome sequencing. Genetic counseling. Diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

Epidermólise bolhosa (EB) é um denominador comum de uma série de alterações mucocutâneas que cursam com fragilidade intensa e aparecimento de bolhas¹. A maioria dos casos ocorre na infância, mas, diferentes faixas etárias são acometidas. As bolhas podem se manifestar já ao nascimento ou durante os primeiros anos de vida e se desenvolvem por traumas mínimos. Há uma fragilidade da zona da membrana basal, que, ao se romperem, permitem a entrada do fluido extracelular no espaço produzido na epiderme pela lesões².

A EB é uma doença hereditária muito rara, decorrente de mutações, envolvendo em torno de 18 genes que codificam as proteínas responsáveis pela aderência da pele, especialmente as da estrutura da zona da membrana basal (ZMB) dermoepidérmica³.

A prevalência é estimada em 8,22:1.000.000 e a incidência em 19,6:1.000.000 nativos nos Estados Unidos, sem grandes variações entre os demais países, nem predileção racial ou geográfica¹⁴.

Até o presente, são conhecidos mais de 30 tipos de EB⁵. A EB requer para a sua classificação o conhecimento: a) do modo de herança (dominante/recessivo); b) do resultado do exame histopatológico/imunomapeamento; e c) da gravidade ou não do quadro clínico⁶.

Até o momento, o padrão ouro para o diagnóstico da EB ainda é o estudo histopatológico e histoquímico/imunomapeamento por biópsia de pele. Esse exame permite diferenciar se o nível de clivagem da bolha é intraepidérmico e/ou subepidérmico, contudo não consegue classificar com exatidão qual o tipo de EB⁷. A EB divide-se em quatro grupos principais: EB

simples (EBS), EB juncional (EBJ) e EB distrófica (EBD), EB tipo misto (Síndrome de Kindler)^{3,8}.

A biópsia de pele é um método invasivo e, infelizmente, como os resultados histopatológicos nem sempre são conclusivos, algumas vezes, há necessidade de repetí-la para que se possa classificar a EB. O estudo molecular, na atualidade, constitui uma ferramenta importante para o diagnóstico mais preciso das múltiplas variedades de EB⁷.

Diante do exposto, preconizamos o estudo molecular para a investigação diagnóstica da EB pela: facilidade da coleta de material; precisão diagnóstica; e possibilidade de exclusão da biópsia de pele.

Tipos de Epidermólise Bolhosa

O estudo histopatológico da pele do paciente com EB, feito a partir de biópsia cutânea, 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.

A imunofluorescência direta é negativa em todos os casos de EB hereditária, sendo positiva apenas na EB adquirida⁹.

O imunomapeamento é uma técnica de imunofluorescência indireta, aplicada em fragmento de pele contendo uma bolha íntegra, que analisa a presença de proteínas da zona de membrana basal por meio da exposição a anticorpos monoclonais fluorescentes. Entre os anticorpos mais utilizados têm-se anticorpos contra: antígeno do penfigóide bolhoso, laminina, colágeno tipo IV e colágeno tipo VII. Além destes existem vários outros monoclonais utilizados em diversos serviços, porém estes são os que foram utilizados no

serviço de imunomapeamento analisado. Cada um destes antígenos é encontrado em locais específicos da junção dermoepidérmica: hemidesmossomos, lâmina lúcida, lâmina densa e sublâmina densa, respectivamente¹⁰.

A fluorescência pode aparecer na porção epidérmica (teto) ou dérmica (assoalho) da bolha ou estar ausente. Analisando-se a fluorescência obtida é possível determinar o local da clivagem em nível ultraestrutural e determinar o tipo de EB¹¹.

As desvantagens do método de imunomapeamento consistem na impossibilidade de se visualizar diretamente as características estruturais da pele aonde ocorre a clivagem, em alguns casos de doenças de herança dominante, pelo fato delas serem mínimas ou não detectáveis. Em situações de pouca fluorescência não é possível revelar o plano de clivagem por impossibilidade de conclusão analítica, nem caracterizar alguns subtipos de epidermólise bolhosas^{12,13}. Além disso, convém ressaltar que, todos os métodos que envolvem análises de pele, obrigatoriamente, constituem um procedimento médico invasivo, que exigem a retirada de um fragmento cutâneo, com anestesia local e posterior sutura. Isso, para um paciente com fragilidade intensa e difícil cicatrização, oferece muito mais riscos e é relativamente mais nefasto do que a retirada de uma amostra de sangue para análise molecular.

A microscopia eletrônica, antes considerada padrão-ouro no diagnóstico de EB, tem sido gradualmente menos utilizada devido ao seu custo e dificuldade de acesso. Poucos serviços dispõem desta aparelhagem e a técnica exige capacitação ímpar^{12,13}. O estudo molecular é, atualmente,

considerado padrão-ouro para o estabelecimento do diagnóstico. Com a retirada de apenas uma amostra de sangue periférico (ou mesmo saliva), o diagnóstico é possível. Entretanto, esses testes moleculares no Brasil ainda são pouco realizados, devido: a) à grande heterogeneidade genética da doença que, até o momento, apresenta 18 genes estruturais envolvidos e mais de 1000 diferentes mutações²; b) ao custo mais elevado; e c) à indisponibilidade desses testes moleculares ainda em múltiplos centros. Portanto, é fundamental a realização do estudo molecular na EB, que, por definir a mutação detectada, constitui um método diagnóstico muito mais preciso e abrangente, ao incluir os diagnósticos pré-natais e pré-implantacionais¹⁴ fatos essenciais para o manejo mais adequado e a instituição de uma possível terapia gênica no futuro^{3,15}.

Epidermólise Bolhosa Simples

A forma mais comum de EB é representada por este tipo, correspondendo a mais de 85% de todos os casos. Também chamada de epidermólise epidermolítica³. Ocorre por alteração dos genes *KRT5* e *KRT14* que codificam queratinas filamentosas⁶. Traumas mínimos levam ao aparecimento de bolhas que se curam completamente e não deixam cicatrizes na pele. Em alguns casos pode haver comprometimento leve de mucosas e unhas, mas o estado geral é bom e há uma tendência de regressão das lesões com o passar dos anos. Na variante localizada, há bolhas apenas em mãos e pés – locais e maiores atritos. São de herança autossômica dominante em sua maioria⁶.

Classificação de EB simples atual é:

EBS Suprabasal (TGM5, DSP, JUP, PKP1)

- EBS acantolítica
- EBS com deficiência de placofilina 1
- EBS superficial
- Síndromes de pele frágil

EBS Basal (KRT5, KRT14, EXPH5, PLEC, DST)

- EBS localizada (Weber-Cockayne)
- EBS generalizada severa (Dowling-Meara)
- EBS generalizada intermediária
- EBS com pigmentação mosqueada
- EBS autossômica recessiva K14
- EBS com distrofia muscular
- EBS com atresia do piloro
- EBS autossômica recessiva com deficiência BP230
- EBS autossômica recessiva com deficiência de exofilina 5
- EBS Ogha
- EBS com eritema migratório circinado

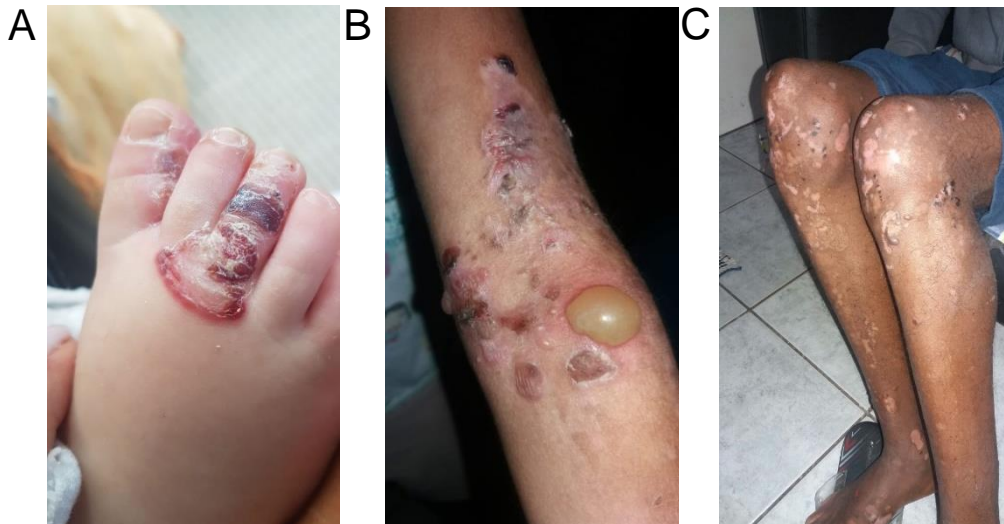


Figura 1- Lesões clínicas de pacientes com EB simples. Imagem A alteração de gene *KRT5*, imagem B alteração de gene *KRT14* e imagem C alteração de gene *PLEC*

Nas formas EB Simples generalizada o quadro bolhoso é mais intenso e as alterações pós-inflamatórias maiores muitas vezes que se iniciam desde o nascimento. No caso de EBS generalizada severa as bolhas podem adquirir aparência herpetiforme e há gradual comprometimento palmo-plantar com queratodermia e alteração dentárias e ungueais¹⁶.

Existe uma variedade EB Simples associada à distrofia muscular por alteração da plectina, constituinte da placa interna do hemidesmossoma e do músculo liso. Há também a EB Simples associada à atresia de piloro que pode ser fatal⁵.

O nível de clivagem da bolha observado pelo exame anatomopatológico é intraepidérmico¹⁷.

Pelo imunomapeamento, como todos os anticorpos monoclonais localizam-se abaixo do nível de clivagem, há fluorescência no assoalho da bolha.

Epidermólise Bolhosa 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 na lâmina lúcida. Na lâmina lúcida 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. O modo de herança da EB Juncional é autossômico recessivo. O quadro clínico pode variar de muito grave, como na forma letal, em que a deficiência da laminina 332 é muito significativa; ou leve, como na EB Juncional mitis, em que a alteração da laminina 332 é menor e pode inclusive melhorar com o passar dos anos⁶.

Os atuais subtipos de EB juncional⁶ são:

EBJ Generalizada (*LAMA3, LAMB3, LAMC2, COL17A1, ITGA3, ITGB4, ITGA6*)

- Generalizada severa (Herlitz)
- Generalizada intermediária (não Herlitz)
- Com atresia do piloro
- De início tardio
- Com envolvimento respiratório e renal

EBJ Localizada (*LAMA3, LAMB3, LAMC2, COL17A1, ITGB4, LAMA3A*)

- Localizada
- Inversa
- Síndrome laringo-onico-cutâneo

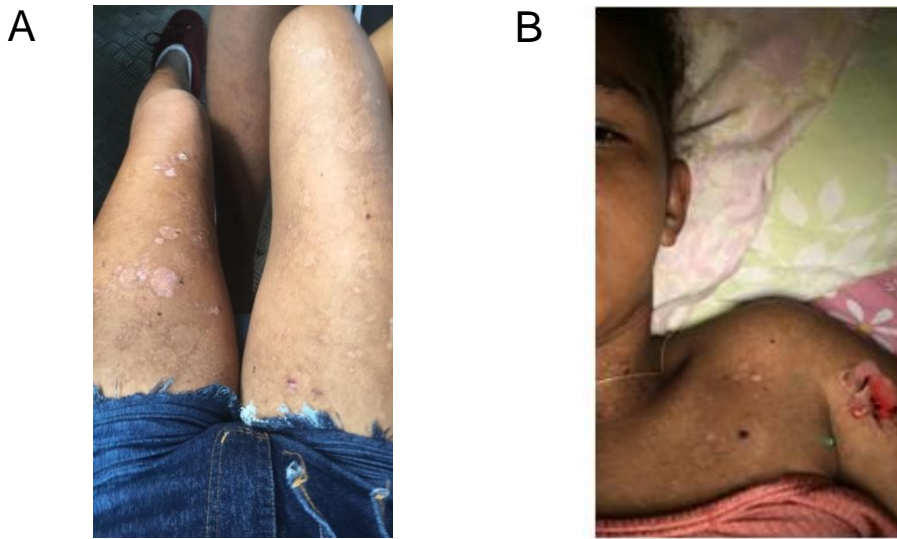


Figura 2- Alteração de pele de EB juncional. Imagem A e B alteração de gene *COL17A1*

Na variante Herlitz as bolhas aparecem desde o nascimento, há acometimento ungueal, dentário, capilar e de mucosas como a ocular, oral, esofágica e anal. Na região perioral pode haver um tecido de granulação característico. Esta forma pode ser letal já na primeira infância. As principais causas de mortalidade são constituídas por falência respiratória e sepse.¹⁸ Em contrapartida, na variante mitis ou não-Herlitz, com a mutação mais focada no colágeno XVII, a manifestação clínica é mais leve com sobrevida semelhante à da população. Contudo, essa variante também exhibe acometimentos capilares, dentários e ungueais em graus variáveis¹⁶.

O exame anatomopatológico mostra um nível de clivagem subepidérmico. O imunomapeamento demonstrará fluorência depositada, no teto da bolha, com o antígeno do penfigóide bolhoso (AgPB); e no assoalho da bolha, com os outros marcadores, devido sua clivagem ocorrer na lâmina lúcida.

Epidermólise Bolhosa Distrófica

A EB distrófica é considerada uma forma grave. Ela é causada por alterações no gene do colágeno VII que é parte principal das fibrilas ancorantes fundamentais, na junção da lâmina densa à derme. O padrão de herança é autossômico dominante ou recessivo. Após a formação de bolhas pós-traumas, formam-se cicatrizes permanentes maiores ou menores, dependendo da intensidade do atrito. A destruição dos folículos pilosos nas áreas de cicatrização leva à formação de micropapulas amareladas e endurecidas conhecidas por milium. Pode haver pseudossindactilia de dedos de mãos e de pés, locais sempre mais sujeitos a traumas, inclusive com perda de função. É descrito um aumento na incidência de carcinoma espinocelular nos pacientes com EB distrófica mesmo em áreas fotoprotegidas¹⁹, razão pela qual é fundamental o exame físico cutâneo regular desses pacientes.

Nos casos de EB distrófica dominante as bolhas surgem mais em extremidades e, mesmo havendo cicatrizes e milium, não costumam haver alterações dentárias, as alterações mucosas são leves e estado geral é bom. Porém, nos casos de EB distrófica recessiva, as manifestações clínicas são muito extensas, mutilantes devido às pseudossinéquias. O acometimento mucoso é intenso, afetando inclusive a nutrição. Há 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 morbi-mortalidade, ocorrendo, em decorrência do intenso potencial metastático, óbito em torno dos 40 anos de idade em mais de 55% dos casos^{20,21}.

As apresentações clínicas da EB distróficas são divididas em⁶:

EBD Dominante (COL7A1)

- Generalizada
- Acral
- Pré-tibial
- Pruriginosa
- Ungueal
- Dermólise bolhosa do recém-nascido

EBD Recessiva (COL7A1)

- Generalizada severa
- Generalizada intermediária
- Inversa
- Localizada
- Pré-tibial
- Pruriginosa
- Centrípeta
- Dermólise bolhosa do recém-nascido

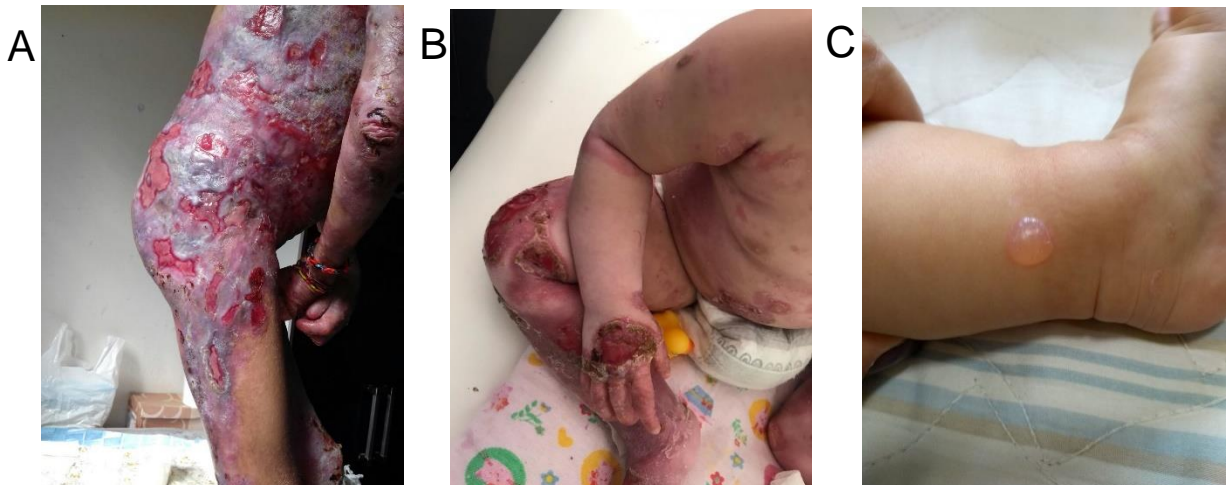


Figura 3- Alteração de pele EB distrófica. Imagem A e B relacionada a EB distrófica recessiva e imagem C EB distrófica dominante

A diferenciação entre esse tipo e a EB juncional de acordo com o nível de clivagem subepidérmico pelo exame anatopatológico não é possível pois ambas podem ter clivagem subepidérmica. Entretanto, pela técnica do imunomapeamento há inclusive como diferenciar a EB distrófica dominante da recessiva. Assim, em ambas haverá fluorescência no teto da bolha (exatamente o oposto do observado na EB simples); mas, na EB distrófica recessiva, o marcador de anticorpo anticolágeno VII terá sua fluorescência ausente ou muito diminuída⁹.

Síndrome de Kindler

A síndrome de Kindler foi, recentemente incluída na classificação da EB. Ela é causada pela mutação do gene *KLIND-1* (alguns denominam *FERMT1*) que codifica a proteína FFH1 e atinge os queratinócitos basais. Clinicamente, a síndrome de Kindler é uma mistura das anteriores, com formação de bolhas em decorrência de traumas leves. Apresenta-se com poiquilodermia, atrofia da pele, fotossensibilidade e risco aumentado para câncer de pele²². A herança é autossômica recessiva.

Dependendo da gravidade do quadro do paciente, o nível de clivagem é variável o que caracteriza como uma síndrome bolhosa mista. Por essa razão, a histopatologia não é bem caracterizada²³.

Quadro 1- Subtipos de epidermólises bolhosas, modo de transmissão, proteínas alvo e genes responsáveis^{17,6}

Tipos de EB	Herança	Subtipo de EB	Proteínas alvo	Genes Responsáveis	
EBS					
Supra basal	AR	Síndrome da pele descamante acral	Transglutaminase 5	<i>TGM5</i>	
	AD AR	EBS superficial EBS acantolítica	Desconhecida Desmoplaquina, Placoglobina	<i>DSP/PKP1/JUP</i>	
Basal		Síndromes da fragilidade de pele	Desmoplaquina, Placoglobina, Placofilina-1		
	AD	EBS localizado	K5, K14	<i>KRT5/KRT14</i>	
	AD	EBS generalizada severa	K5, K14	<i>KRT5/KRT14</i>	
	AD	EBS generalizada intermediária	K5, K14	<i>KRT5/KRT14</i>	
	AD	EBS com pigmentação moteada	K5	<i>KRT5</i>	
	AD	EBS circinada migratória	K5	<i>KRT5</i>	
	AR	EBS autossômica recessiva K14	K14	<i>KRT14</i>	
	AR	EBS com distrofia muscular	Plectina	<i>PLEC</i>	
	AR	EBS Ogna	Plectina	<i>PLEC</i>	
	AR	EBS com atresia de piloro	Plectina, integrina $\alpha 6\beta 4$	<i>PLEC/ ITGB4/ITGA6</i>	
	AR	EBS autossômica recessiva deficiência de BP230	Antígeno 1 do penfigóide bolhoso		
	AR	EBS autossômica recessiva deficiência de exofilina 5	Exofilina 5	<i>EXPH5</i>	
EBJ generalizada	AR	EBJ generalizada severa	Laminina-332	<i>LAMA3/LAMB3/LAMC2</i>	
	AR	EBJ generalizada intermediária	Laminina-332, Colágeno XVII	<i>LAMA3/LAMB3/LAMC2/ COL17A1</i>	
	AR	EBJ com atresia pilórica	$\alpha 6\beta 4$ Integrina	<i>ITGB4/ITGA6</i>	
	AR	EBJ início tardio	Colágeno XVII	<i>COL17A1</i>	
EBJ localizada	AR	JEB pulmonar e renal	Integrina sub $\alpha 3$	<i>ITGA3</i>	
	AR	EBJ localizada	Laminina-332, Colágeno XVII, integrina $\alpha 6\beta 4$	<i>LAMA3/LAMB3/LAMC2/ COL17A1/ ITGB4</i>	
	AR	EBJ inversa	Laminina-332	<i>LAMA3/LAMB3/LAMC2</i>	
EBD	AR	Síndrome LOC	Laminina-332, cadeia $\alpha 3$	<i>LAMA3A</i>	
	EBDD				
EBDD	AD	EBDD generalizada		<i>COL7A1</i>	
		EBDD acral	Colágeno tipo VII	<i>COL7A1</i>	
		EBDD pré-tibial		<i>COL7A1</i>	
		EBDD pruriginosa		<i>COL7A1</i>	
		EBDD ungueal apenas		<i>COL7A1</i>	
		EBDD dermólise do recém nascido		<i>COL7A1</i>	
	EBDR	AR	EBDR generalizada severa	Colágeno tipo VII	<i>COL7A1</i>
			EBDR generalizada outras		<i>COL7A1</i>
			EBDR inversa		<i>COL7A1</i>
			EBDR pré tibial		<i>COL7A1</i>
		EBDR pruriginosa		<i>COL7A1</i>	
		EBDR centripeta		<i>COL7A1</i>	
		EBDR dermólise do recém-nascido		<i>COL7A1</i>	
Síndrome de Kindler	AR	...	Kindlina-1	<i>FERMET1</i>	

AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva; EBS, epidermólise bolhosa simples; EBJ, epidermólise bolhosa juncional; EBDD, epidermólise bolhosa distrófica dominante; EBDR, epidermólise bolhosa distrófica recessiva.
 FONTE: modificado de Intong L.R.A.¹⁷ e Fine J.D.⁶

Manejo Clínico e Tratamento

É fundamental o manejo adequado da pele para evitar as contraturas causadas após as cicatrizações, especialmente nos casos de EB distrófica. A prevenção para a não formação de bolhas, os cuidados com as feridas abertas após o rompimento das lesões evitando infecções secundárias, o aporte nutricional e psicossocial adequado, são necessários para manutenção da qualidade de vida dos pacientes^{24,25}.

A extrema fragilidade cutânea impõe uma manipulação muito delicada do paciente, evitando ao máximo as forças de tração. O uso de materiais suaves pela limpeza da pele, roupas e sapatos confortáveis, aplicação de hidratantes e lubrificantes, incluindo olhos e narinas, devem ser cuidados diários. Ambientes climatizados também trazem sensação intensa de bem estar nestes pacientes ^{24,25}.

Após a formação de bolhas, preconiza-se que elas sejam puncionadas, para se evitar o descolamento dos tecidos adjacentes, por pressão do próprio líquido, mas, a epiderme/derme não deve ser removida, para que formem uma barreira mecânica protetora¹⁶.

Diversos tipos de curativos podem ser empregados entre espumas, telas, gazes, hidrocolóides, alginatos, hidrofibras dependendo do local e tipo de bolhas formadas. Os curativos atuais também podem ser sintéticos ou biológicos. Evitar o uso de fitas adesivas ou de curativos demasiadamente aderentes, sobre a pele.

O paciente deve ser tratado por uma equipe multidisciplinar composta pelos seguintes especialistas: pediatras, clínicos gerais, dermatologista, ortopedista, oftalmologista, otorrinolaringologista, gastroenterologista,

nefrologista, hematologista, endocrinologista, cardiologista, especialista em tratamento da dor e cirurgião plástico. Deve se fazer parte ainda da equipe: enfermeiros, assistente social, psicólogo, fisioterapeuta, fonoaudiólogas, terapeuta ocupacional e nutricionista.

O cuidado deve ser planejado de forma individual baseando-se na idade, gravidade, sintomatologia, complicações e prioridades dos pacientes. O intervalo entre as consultas deve respeitar a necessidade de medidas complementares com atendimento da equipe multidisciplinar.

O adequado cuidado destes pacientes implica em monitorização cuidadosa das complicações e sequelas.

A terapia de reposição enzimática para conter a formação de bolhas já está sendo testada, ainda de modo experimental, em alguns centros. Os estudos atuais concentram-se nos defeitos causados pelo gene *COL7A1* utilizando-se de injeções de colágeno tipo VII recombinante intravenosas, em camundongos atímicos, com melhora da aderência dermo-epidérmica²⁶.

A terapia gênica específica para os pacientes com EB, é uma área de investigação crescente já com ensaios clínicos para EBJ e EBDR se mostrando segura e efetiva, mas ainda em processo de melhorias múltiplas antes de uma implementação em maior escala²⁷.

Um trabalho realizado em 2006 na Itália²⁸ a partir do uso de um retrovírus vetor expressando *LAMB3* transgênico em queratinócitos autólogos, foi enxertado em pernas de pacientes com EBJ e até o seguimento, publicado em 2009²⁹, a pele se manteve forte e sem aparecimento de novas bolhas.

Igualmente, a partir de enxerto de queratinócitos, a terapia gênica natural, utiliza as próprias células não afetadas dos pacientes com mosaicismo

revertente, situação observada em alguns pacientes com EB³⁰.

A terapia baseada em células, que utiliza injeções intradérmicas de fibroblastos alogênicos em pacientes com EBDR, pode levar a expressão gênica regular do *COL7A1* por três a seis meses e um aumento de colágeno VII por 9 a 12 meses³¹.

O transplante alogênico de medula óssea reduziu a formação de bolhas e aumentou o depósito de colágeno VII em pacientes com EBDR, porém deve ser considerada como uma terapia de alta morbi-mortalidade indicada para casos de maior gravidade selecionados³².

2. HIPÓTESE

O estudo molecular conseguiria o diagnóstico da epidermólise bolhosa dispensando a biópsia de pele que é um procedimento invasivo, tem limitações, pode necessitar de repetições e nem sempre é conclusivo, sendo atualmente único exame disponível no SUS?

3. JUSTIFICATIVA

Embora tenha sido divulgado recentemente (2021) pelo próprio Ministério da Saúde o PCDT (Protocolo Clínico de Diretrizes e Tratamento) que reconhece oficialmente a importância do sequenciamento genético como ferramenta diagnóstica, no Brasil, ainda não há disponibilidade do estudo molecular que confirme o tipo de epidermólise bolhosa aos pacientes do SUS.

O primeiro estudo brasileiro foi publicado em 2019, por Mariath et al do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, em 87 pacientes de EB , utilizando um painel de 11 genes³³, seguido por outras três publicações da mesma autora em 2020^{34,35} e 2021³⁵ . A tendência é cada vez mais pesquisadores brasileiros mostrem a importância do estudo molecular dos pacientes EB.

Há no Ambulatório da Dor no Instituto da Criança cerca de 60 famílias com crianças com diagnóstico de epidermólise bolhosa em seguimento para tratamento paliativo. O diagnóstico molecular beneficiaria o aconselhamento genético adequado a estas famílias assim como, para novos pacientes de EB.

4. OBJETIVOS

- Descrever o quadro clínico dos pacientes com EB;
- Identificar as mutações dos genes envolvidos na EB e realizar aconselhamento genético;
- Correlacionar os achados histológicos e de imunomapeamento com estudos moleculares.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

Foram estudados 67 pacientes com EB provenientes de seguimento em ambulatório da Unidade de Dor, sob a supervisão da Dra. Silvia Maria Macedo Barbosa e em parceria com a Unidade de Genética, sob a supervisão da Dra. Chong Ae Kim, do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e também provenientes do ambulatório do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Métodos

Protocolo Clínico

Foi elaborado um protocolo clínico com a história familiar dos pacientes, exame físico e dermatológico, a evolução clínica e intercorrências. Além disso, foi feito o heredograma e documentação fotográfica.

Imunomapeamento

O imunomapeamento é uma técnica de imunofluorescência indireta, aplicada em fragmento de pele contendo uma bolha íntegra, que analisa a presença de antígenos da zona de membrana basal por meio da exposição a anticorpos monoclonais fluorescentes

A maioria dos pacientes já dispunha resultados de exames de imunomapeamento de biópsias realizados no Hospital das Clínicas, no Laboratório de Imunopatologia, aonde, são usados os anticorpos contra: antígeno do penfigóide bolhoso, laminina, colágeno tipo IV e colágeno tipo VII. Cada um destes antígenos é encontrado em locais específicos da junção

dermoepidérmica: hemidesmossomos, lâmina lúcida, lâmina densa e sublâmina densa, respectivamente.

Todos os laudos foram liberados pela Prof. Dra Zilda Najjar Prado de Oliveira, dermatologista chefe do Ambulatório de Dermatologia do HC da FMUSP e do Laboratório de Imunopatologia da Divisão de Dermatologia.

Quadro 2 – Classificação de epidermólise bolhosa (EB), de acordo com o imunomapeamento

Tipo de EB	EB simples			EB Juncional			EB Distrófica Dominante			EB Distrófica recessiva		
	T	A	Au	T	A	Au	T	A	Au	T	A	Au
Nível de Clivagem												
PB		+		+			+				+	
Laminina		+		+	+		+				+	
Colágeno IV		+			+		+				+	
Colágeno VII		+			+		+	+				+

Abrev: T: Teto de bolha; A: Assoalho de bolha; Au: Ausente; PB: Anticorpos contra Antígenos Penfigoide Bolhoso.

Estudo Molecular

O sequenciamento de exoma pela técnica de NGS (Sequenciamento de Nova Geração) nos 67 pacientes e seus respectivos progenitores, foram realizados em parceria com Prof. Dr. Naomichi Matsumoto da Universidade de Yokohama do Japão.

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos do estudo molecular de 67 pacientes (60 famílias) foram:

- EB distrófica recessiva – 47 pacientes (43 famílias)
- EB distrófica dominante - 4 pacientes (4 famílias)
- EB simples – 15 pacientes (12 famílias)
- EB juncional – 1 paciente (1 família)

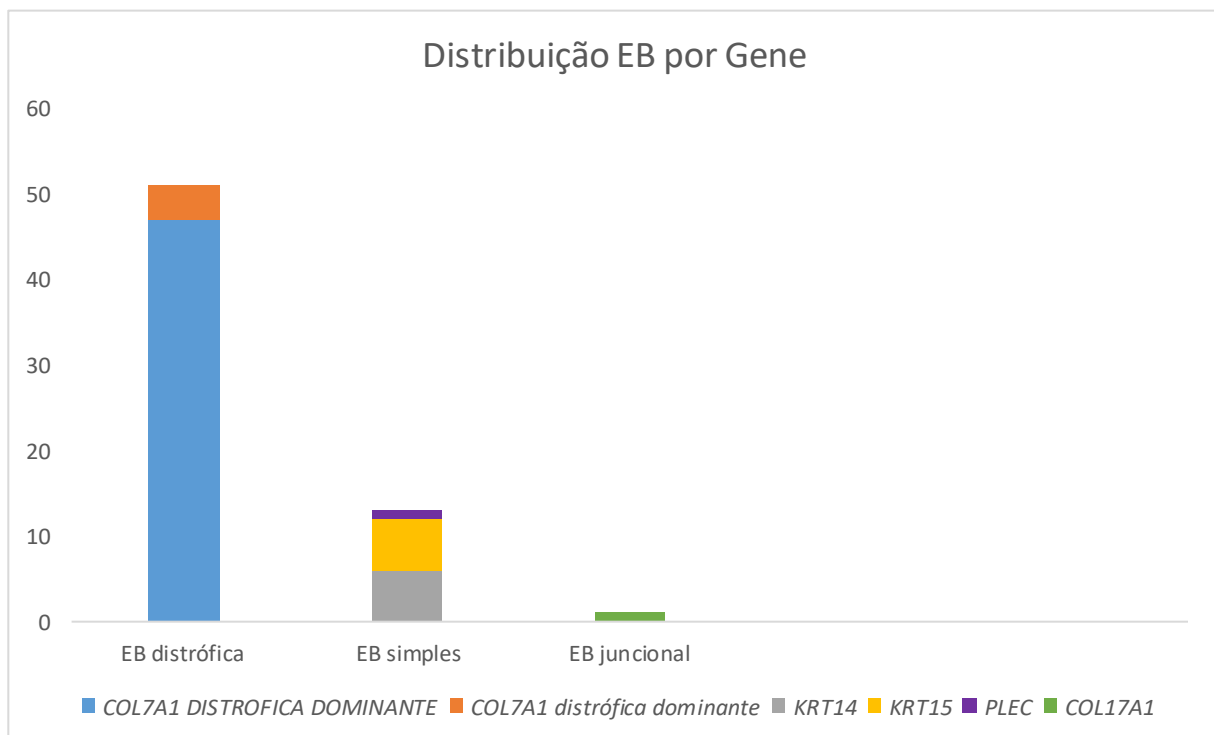


Figura 4 – Distribuição tipos de EB por genes acometidos

EB distrófica - Alteração do gene *COL7A1*

- EB distrófica recessiva – 47 pacientes (43 famílias)
- EB distrófica dominante – 4 pacientes (4 famílias)

Epidermólise Bolhosa Distrófica Recessiva

Quadro Clínico

A EB distrófica recessiva foi encontrada no estudo molecular em 47 pacientes, constituída de F21:M26. Foram provenientes de 43 famílias sendo: uma com 3 filhos afetados e duas com dois filhos afetados cada.

A consanguinidade dos pais estava presente em 8/43 famílias (18,6%).

Todas mães referiram gestação sem intercorrências.

Nasceram a termo em 44/47 pacientes (93,6%), exceto três pacientes que nasceram, pré termo: uma de 34 semanas com 2kg, outro com 37 semanas com 2,160kg e 42 cm e outra com 36 semanas 2900kg. Dos pacientes que nasceram a termo, o peso estava adequado variando entre 2540g até 3880g. Receberam alta com a mãe. Um paciente ficou internado em UTI pediátrica por 3 meses pois nasceu com muitas áreas de ausência de pele, e no interior do estado (Olimpia –SP) optaram por manter a criança internada.

Todos os pacientes apresentaram bolhas nos dois primeiros dias de vida.

O diagnóstico de EB foi feito ao nascimento até um mês de vida em 34/47 pacientes (72,34%), 11 pacientes (23,4%) foi feito diagnóstico até 1 ano de vida e em 2 pacientes (4,25%) foi feito após um ano (1 paciente com 1 ano e 2 meses e 1 paciente com 3 anos).

Todos os pacientes nasceram com todas as unhas em mãos e pés exceto 2 pacientes que nasceram sem as unhas dos pés.

Em 28 pacientes (28/47 - 59,6%) apresentaram estenose de esôfago com necessidade de realização de dilatação esofágica em média aos 8 anos de idade.

Anemia foi encontrada em 23/47 (48,9%) sendo que destes 14 (29,8%) tiveram necessidade de transfusões de sangue devido a anemia grave.

A idade dos pacientes na minha avaliação dermatológica variou de 1 ano a 35 anos (média – 10,8 anos e mediana –11 anos)

Em metade dos pacientes peso e estatura estavam abaixo do percentil 5.

Mães de 11 pacientes (23%) relataram que as mesmas demoraram um pouco mais a andar por causa das bolhas que se formaram.

A dor crônica foi referida em 36 pacientes (78%) especialmente na hora do banho e troca de curativos, sendo esta também, a frequente causa de não comparecimento às escolas associado as dificuldades de mobilidades e enfaixamentos levando a atrasos intelectuais em 17/47 pacientes (36%).

As bolhas estavam localizadas nas extremidades 33/47 pacientes (72%). Em dobras em 16/47 (36%), lesões cicatriciais pós bolhas em 39 (83%), mília em cicatrizes 45/47 (96%).

Pseudo-sindactilia em mãos e/ou pés ocorreram em 24/47 pacientes (51%) e em 3 (11%) pacientes apenas em pés. Hiperkeratose em planta de pés em 6/47 pacientes (13%).

Em 36/47 (78,5%) não apresentaram unha em nenhum dedo das mãos e pés. Os demais 11/47 (22%) apresentaram poucas unhas.

Em 10/47 (22%) dos pacientes os dentes estavam com cáries e alterações de esmaltes. Os cabelos em 8/47 (18%) pacientes os cabelos eram finos quebradiços e com redução do crescimento.

A hiperhidrose estava presente em 26/47 pacientes (55%).

A desnutrição foi referida em 35/47 (71,5%) pacientes em alguma época

da vida.

A escoliose foi observada em 6 pacientes, após adolescência.

Todos pacientes referiram intenso prurido.

dificuldade de deambulação foi encontrada em 28/47 pacientes (61%) e quatro eram cadeirantes, um desde 6 anos, dois aos 11 anos e um nunca andou.

Três pacientes (6,3%) tiveram Carcinoma Espíno-Celular (CEC) aos 11 anos e 15 anos, ambos em calcâneos. As lesões começaram como pequenas feridas que nunca cicatrizaram e cresceram lentamente. Ao exame físico não havia mais as lesões pois haviam sido removidas cirurgicamente. Outro paciente com grande lesão tumoral em pé esquerdo teve necessidade de amputação de mesmo aos 17 anos.

Quatro pacientes (8,51%) faleceram posteriormente à minha avaliação e coleta de dados devido a pneumonia com sepse e falência de múltiplos órgãos. Suas idades eram: 2 anos, 12 anos, 15 anos e 20 anos.

Classificação da Lesão Dermatológica

Analisando clinicamente os pacientes com EBD recessiva encontrados foi possível classificá-los clinicamente seguindo o último consenso dermatológico publicado de 2014⁶ em:

- Generalizada severa: 27 pacientes
- Generalizada intermediária: 13 pacientes
- Inversa: 2 pacientes
- Localizada: nenhum paciente
- Pré-tibial: 2 pacientes

- Pruriginosa: 1 paciente
- Centrípeta: 2 pacientes

Tabela1- Achados clínicos de EBD Recessiva

COL7A1	
Achados clínicos	EB Distrófica recessiva
Sexo	21 F / 26 M
Pais Cosanguíneos	08/47
Nascimento a Termo	44/47
Presença de bolhas	47/ 47
Ausência de Unha	36/47
Estenose de esôfago	28/47
Bolhas nas extremidades	33/47
Bolhas nas dobras	16/47
lesões cicatriciais pós bolhas	39/47
mílias em cicatrizes	45/47
Pseudo-sindactilia	27/47
Hiperkeratose	06/47
Cáries e alterações de esmaltes	10/47
Cabelos finos e quebradiços	08/47
Hiperhidrose	26/47
Escoliose	06/47
Dor crônica	36/47
Desnutrição	35/47
Dificuldade de deambulação	28/47
Carcinoma Espino-Celular	03/47

Tabela 2- Resultados moleculares de pacientes com EB distrófica recessiva no COL7A1

Família	Paciente	SEXO	Resultado Molecular	Literatura	Variante patogênica	Consanguinidade
1	1	M	NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)	Já descrita	Homozigoto	Não
	2	M	NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)		Homozigoto	
	3	M	NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)		Homozigoto	
2	4	F	NM_000094: c.2171del: p.(Gly724Alafs*30)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.887del: p.(Gly296Valfs*5)			
2	5	M	NM_000094: c.2171del: p.(Gly724Alafs*30)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.887del: p.(Gly296Valfs*5)			
3	6	F	NM_000094: c.6502-2A>G	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.6182G>A:p.(Gly2061Glu)			

	7	F	NM_000094: c.6502-2A>G		Heterozigoto Composto	
4	8	F	NM_000094: c.6182G>A: p.(Gly2061Glu)	Já descrita	Homozigoto	Não
5	9	F	NM_000094: c.6528dup: p.(Gly2177Trpfs*113)		Homozigoto	Sim
6	10	F	NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)	Já descrita	Homozigoto	Não
7	11	F	NM_000094: c.7249C>T: p.(Gln2417*)	Já descrita	Heterozigoto composto	Sim
8	12	F	NM_000094: c.5572G>T: p.Gln1858*	INÉDITA	Homozigoto	Sim
9	13	M	NM_000094: c.4018C>T: p.(Arg1340*)	Já descrita	Homozigoto	Não
10	14	M	NM_000094: c.7757C>T: p.(Gln2586*)	INÉDITA	Homozigoto	Sim
11	15	M	NM_000094: c.6081dup: p.(Gly2028Argfs*71)	Já descrita	Homozigoto	Sim
12	16	M	NM_000094: c.6527dup: p.(Gly2177Trpfs*113)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)			
13	17	M	NM_000094: c.7344G>A: p.(Val2448=)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)			
14	18	M	NM_000094: c.6022C>T: p.(Arg2008Cys)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.425A>G: p.(Lys142Arg)			
15	19	F	NM_000094: c.5132_5133insTCACC: p.(Gly1712Hisfs*131)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.58_70del: p.(Arg20Serfs*6)			
16	20	M	NM_000094: c.7078G>A: p.(Gly2360Arg)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.6527dup: p.(Gly2177Trpfs*113)			
17	21	M	NM_000094: c.6527dup: p.(Gly2177Trpfs*113)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094:c.6040C>T: p.(Gln2014*)	INÉDITA		
18	22	F	NM_000094: c.6134del: p.(Pro2045Glnfs*161)	INÉDITA	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.5132_5133insTCACC: p.(Gly1712Hisfs*131)	Já descrita		
19	23	M	NM_000094: c.2783_2784insGACAC: p.(Gln929Thrfs*6)	INÉDITA	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.325_326insCG: p.(Glu109Alafs*39)	Já descrita		
20	24	F	NM_000094: c.4378C>T: p.(Gln1460*)	INÉDITA	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.1758del: p.(Ser587Valfs*28)	Já descrita		
21	25	M	NM_000094: c.7828C>T: p.(Arg2610*)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.4018C>T: p.(Arg1340*)			
22	26	F	NM_000094: c.2784_2785insGACAC: p.(Gln929Aspfs*6)	INÉDITA	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.5134_5135insTCACC: p.(Gly1712Serfs*131)	Já descrita		
23	27	F	NM_000094: c.7474C>T: p.(Arg2492*)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não

			NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)			
24	28	F	NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.676C>T: p.(Arg226*)			
25	29	M	NM_000094: c.6528dup: p.(Gly2177Trpfs*113)	Já descrita	Homozigoto	Não
26	30	M	NM_000094: c.6716G>A: p.(Gly2239Asp)	INÉDITA	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094:c.2783_2784insG ACAC: p.(Gln929Thrfs*6)	INÉDITA		
27	31	F	NM_000094: c.4678G>A: p.(Gly1560Arg)	Já descrita	Heterozigoto composto	Não
			NM_000094: c.657del: p.(Gly220Valfs*5)			
28	32	F	NM_000094: c.8304+1G>A	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)			
29	33	M	NM_000094: c.5018G>A: p.(Gly1673Glu)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.4183_4189dup: p.(Ala1397Glyfs*7)	INÉDITA		
30	34	F	NM_000094: c.6022C>T: p.(Arg2008Cys)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)			
31	35	M	NM_000094: c.6082G>A: p.(Gly2028Arg)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.4018C>T: p.(Arg1340*)			
32	36	M	NM_000094: c.7249C>T: p.(Gln2417*)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.8245G>A: p.(Gly2749Arg)			
33	37	F	NM_000094: c.7380+2T>C	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.6527dup: p.(Gly2177Trpfs*113)			
34	38	M	NM_000094: c.7078G>A: p.(Gly2360Arg)	Já descrita	Homozigoto	Sim
35	39	M	NM_000094: c.58_70del: p.(Arg20Serfs*6)	Já descrita	Homozigoto	Não
36	40	F	NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.4018C>T: p.(Arg1340*)			
37	41	M	NM_000094: c.706C>T:p.(Arg236*)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.325_326insCG:p.Glu109Alafs *39			
38	42	M	NM_000094: c.7222C>T: p.(Gln2408*)	INÉDITA	Heterozigoto composto	Não
			NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)	Já descrita		
39	43	F	NM_000094: c.4463del: p.Leu1488Argfs*222	INÉDITA	Homozigoto	Sim
40	44	M	NM_000094: c.4613G>A: p.Arg1538His	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.6216+5G>T			
41	45	M	NM_000094: c.1080G>A: p.(Trp360*)	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.887del: p.(Gly296Valfs*5)	Já descrita		
42	46	M	NM_000094: c.5047C>T: p.(Arg1683*)	Já descrita	Homozigoto	Sim
43	47	F	NM_000094: c.8109+1G>A	Já descrita	Heterozigoto Composto	Não
			NM_000094: c.4018C>T: p.(Arg1340*)	Já descrita		

Encontramos 13 pacientes com variantes em homozigose e 2/13 variantes eram inéditas não reportadas na literatura , 30 pacientes eram em heterozigose composta e 10/60 variantes não descritas na literatura.

Imunomapeamento x Estudo molecular de *COL7A1* recessivo

O resultado comparativo do exame de imunomapeamento e estudo molecular destes 47 pacientes estão na tabela a seguir:

Tabela 3- Comparação entre imunomapeamento e estudo molecular dos pacientes de EB distrófica recessiva – alteração de *COL7A1*

Familia	Paciente	Estudo Molecular	Imunomapeamento	Resultado
1	1	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
	2	EB distrófica recessiva	Inconclusivo	NA
	3	EB distrófica recessiva	Inconclusivo	NA
2	4	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
	5	EB distrófica recessiva	Não realizado	NA
3	6	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
	7	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
4	8	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
5	9	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
6	10	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
7	11	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
8	12	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
9	13	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
10	14	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
11	15	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
12	16	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
13	17	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
14	18	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
15	19	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
16	20	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
17	21	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
18	22	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
19	23	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
20	24	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
21	25	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
22	26	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
23	27	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante

24	28	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
25	29	EB distrófica recessiva	EB distrófica recessiva	Concordante
26	30	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
27	31	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
28	32	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
29	33	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
30	34	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
31	35	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
32	36	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
33	37	EB distrófica recessiva	EB juncional	Discordante
34	38	EB distrófica recessiva	EB distrófica dominante	Discordante
35	39	EB distrófica recessiva	Inconclusivo	NA
36	40	EB distrófica recessiva	Inconclusivo	NA
37	41	EB distrófica recessiva	Inconclusivo	NA
38	42	EB distrófica recessiva	Inconclusivo	NA
39	43	EB distrófica recessiva	Não realizado	NA
40	44	EB distrófica recessiva	EB distrófica – sem subtipo	NA*
41	45	EB distrófica recessiva	Não realizado	NA
42	46	EB distrófica recessiva	Não realizado	NA
43	47	EB distrófica recessiva	Não realizado	NA

Legenda: NA - Não Aplicável / NA* resultado parcial

No total de 47 pacientes, a biópsia não foi realizada em cinco pacientes e resultado de imunomapeamento foi inconclusivo em seis pacientes.

Assim, em 36 pacientes foi feita a comparação do resultado molecular e imunomapeamento, o resultado foi concordante em 23/36 (63,8%), discordante em 12 pacientes (33,3%) e em um paciente mostrou EB distrófica, mas não houve relato de ser recessivo ou dominante.

Epidermólise Bolhosa Distrófica Dominante

Quadro Clínico

A EB distrófica dominante foi encontrada no estudo molecular em 4 pacientes, constituída de F3:M1. Não houve outro caso na mesma família e os pais não eram afetados.

Todas mães referiram gestação sem intercorrências e pacientes

nasceram a termo e com peso entre 3100g a 3315g.

Nasceram com todas as unhas e pele íntegra sem bolhas

As bolhas surgiram após 18 dias, 20 dias e 60 dias de vida em 3 pacientes. Um paciente teve incompatibilidade ABO e necessitou fototerapia. Refere aparecimento de bolhas nesta ocasião.

O diagnóstico de EB foi feito entre 2 meses a 10 meses nos 4 pacientes.

A avaliação dermatológica foi feita nas idades entre 2 anos e 17 anos (média 9,5 anos, mediana 9,5 anos).

Apresentavam bolhas em extremidades, porém as mesmas só surgem se executam movimentos mais intensos e raras lesões em dobras.

Dentes e cabelos sem alterações. Presença de cicatrizes e algumas miliárias no local das bolhas rotas.

Todos pacientes não tinham unhas nas mãos e/ou pés. Não havia pseudossindactilias nem hiperkeratoses em pés.

Os três pacientes referiram hiperhidrose exceto um.

Não apresentaram estenose de esôfago, desnutrição nem anemia. Também não apresentou escoliose e deambulação era normal.

Tabela 4- Achados clínicos de EBD Dominante

COL7A1	
Achados clínicos	EB Distrófica dominante
Sexo	3 F / 1 M
Nascimento a termo	4/4
Presença de bolhas	0/ 4
Ausência de unha	0/4
Estenose de esôfago	0/4
Bolhas nas extremidades	4/4
Bolhas nas dobras	0/4
Lesões cicatriciais pós bolhas	4/4
Mílias em cicatrizes	4/4
Pseudo-sindactilia	0/4
Hiperkeratose	0/4
Cáries e alterações de esmaltes	0/4
Cabelos finos e quebradiços	0/4
Hiperhidrose	3/4
Escoliose	0/4
Dor crônica	0/4
Desnutrição	0/4
Dificuldade de deambulação	0/4
Carcinoma espinocelular	0/4

Classificação da Lesão Dermatológica

Analisando clinicamente os pacientes com EBD dominante encontrados foi possível classifica-los clinicamente seguindo o último consenso dermatológico publicado de 2014⁶ em:

- Generalizada: 3 pacientes
- Acral: 1 paciente
- Pré-tibial: nenhum paciente
- Pruriginosa: nenhum paciente
- Ungueal: nenhum paciente
- Dermólise bolhosa do recém-nascido: nenhum paciente
- Todas as 4 variantes patogênicas encontradas no resultado molecular

eram já descritas na literatura.

Tabela 5- Resultados moleculares de pacientes com alteração no *COL7A1* dominante

Família	Paciente	SEXO	Resultado Molecular	Literatura	Variante patogênica
44	48	M	c.6100_6120del:p.(Gly2034_Gly2040del)	INÉDITA	Heterozigoto <i>de novo</i>
45	49	F	c.6110G>A:p.Gly2037Glu	Já descrita	Heterozigoto <i>de novo</i>
46	50	F	c.6218G>A:p.(Gly2073Asp)	INÉDITA	Heterozigoto <i>de novo</i>
47	51	F	c.6026G>T:p.(Gly2009Val)	INÉDITA	Heterozigoto <i>de novo</i>

Em 3/4 variantes (75%) foram inéditas , não reportadas na literatura.

Houve concordância dos resultados de imunomapeamento e estudo molecular em todos quatro pacientes EB distrófica dominante.

Tabela 6- Comparação entre imunomapeamento e estudo molecular dos pacientes de EB distrófica dominante – alteração de *COL7A1*

Família	Paciente	Estudo molecular	Imunomapeamento	Resultado
44	48	EB distrófica dominante	EB distrófica dominante	Concordante
45	49	EB distrófica dominante	EB distrófica dominante	Concordante
46	50	EB distrófica dominante	EB distrófica dominante	Concordante
47	51	EB distrófica dominante	EB distrófica dominante	Concordante

EB simples - Alteração dos genes *KRT5/KRT14/PLEC*

EB Simples – 15 pacientes

- Alteração *KRT5* - 6 pacientes
- Alteração *KRT14* - 6 pacientes
- Alteração *PLEC* - 3 pacientes

EB simples - Alteração do gene *KRT5*

Quadro Clínico

Foram encontrados 6 pacientes (5 famílias) com alteração no gene *KRT5* sendo F5:M1. Em uma família a mãe e filha eram afetadas.

As mães negaram complicações durante a gestação e todos nasceram a termo.

Todos pacientes nasceram com bolhas nos primeiros 10 dias de vida.

O diagnóstico de EB foi feito ao nascimento em dois pacientes e em 1 mês, 3 meses, 6 meses e 1 ano e 2 meses em 4 pacientes.

A idade dos pacientes na minha avaliação dermatológica variou de 1 ano a 29 anos (média 9,6 anos; mediana 8 anos).

As bolhas em extremidades estavam presentes nos seis pacientes e em um paciente também em dobras. Nesta mesma paciente havia presença de hiperkeratose em pés com a pele um pouco mais espessa. A presença de miliárias e cicatrizes é mínima. Todos tinham ausência de algumas em unhas em mãos e pés. Cabelos e dentes não puderam ser bem avaliados em 2 pacientes pois tinham 1 ano apenas. Em outros 3 pacientes eram adequados, mas um apresentava dentes frágeis.

Todos seis apresentaram dor crônica, prurido e intensa sudorese.

Nenhum dos pacientes referiu estenose de esôfago.

Dois pacientes de um ano de idade ainda não andavam sozinhos. Nos outros quatro pacientes maiores, a deambulação era normal.

Classificação da Lesão Dermatológica

Analisando clinicamente os pacientes com EB simples com alteração do gene *KRT5* encontrados foi possível classificá-los clinicamente seguindo o último consenso dermatológico publicado de 2014⁶ em:

- Localizada: 2 pacientes
- Generalizada severa: 1 paciente
- Generalizada intermediária: 1 paciente
- Com pigmentação moteada: 2 pacientes
- Migratório circinado: nenhum paciente

EB simples com Alteração do gene *KRT14*

Quadro Clínico

Foram encontrados 6 pacientes com alteração no gene *KRT14* sendo F2:M4.

As mães negaram complicações durante a gestação.

Cinco pacientes nasceram a termo enquanto que, um paciente nasceu de 34 semanas por falta de líquido amniótico com 1,750kg.

Todos apresentaram bolhas nos primeiros dias de vida e o diagnóstico de EB já foi feito nos primeiros três dias de vida.

A idade dos pacientes na minha avaliação dermatológica foi média de 17,3 anos e mediana de 12,5 anos. Todos estavam dentro da normalidade em peso e estatura.

As bolhas em extremidades estavam presentes em 3 pacientes e em 2 pacientes também em dobras. Ausência de pseudo sindactilia e miliária.

Todos tinham as unhas das mãos, mas faltavam algumas dos pés. Um

paciente apresentou alteração do esmalte dos dentes com perfurações e predisposição a cáries e cabelos rarefeitos e poucos. Outros cinco tinham dentes e cabelos normais.

Três não apresentavam hiperhidrose e três, sim.

Três pacientes tiveram anemia na primeira infância e um com necessidade de transfusão sanguínea. Os outros 3 não.

Dois apresentavam dor crônica e nenhum relatou prurido.

Nenhum com estenose de esôfago, mas cinco pacientes com alguma dificuldade de deglutição a alimentos secos e disfagia.

A mobilidade adequada em todos.

Classificação da Lesão Dermatológica

Analisando clinicamente os pacientes com EB simples com alteração do gene *KRT14* encontrados foi possível classifica-los clinicamente seguindo o último consenso dermatológico publicado de 2014⁶ em:

- Localizada: 4 pacientes
- Generalizada severa: nenhum paciente
- Generalizada intermediária: 2 pacientes
- Autossômica recessiva K14: nenhum paciente

EB simples - Alteração do gene *PLEC*

Quadro Clínico

Foram encontrados dois pacientes com alteração no gene *PLEC* sendo F2:M1.

As mães negaram complicações durante a gestação.

Nasceram a termo e com bolhas nas primeiras horas de vida. O

diagnóstico de EB foi feito com 15 dias de vida, 2 e 3 meses cada

A idade dos pacientes na minha avaliação dermatológica foi de 3 anos, 19 anos e 31 anos. Estavam dentro da normalidade em peso e estatura.

As bolhas em extremidades estavam presentes nos três pacientes, mas não em dobras. Havia pseudo sindactilia em uma paciente em pés. A presença de miliárias era mínima. Tinham ausência de algumas unhas em pés. Dentes de com cáries e alterações no esmalte. Cabelos adequados.

Dois pacientes tiveram que fazer dilatação por estenose de esôfago.

Dois pacientes apresentavam hiperhidrose. Negaram desnutrição e anemia, mas apresentavam intensa disfagia. A mobilidade com dificuldade em um paciente (aquele que possuía a pseudo sindactilia em pés). Um apresentava dor crônica e os outros três tinham prurido.

Classificação da Lesão Dermatológica

Analisando clinicamente os pacientes com EB simples com alteração do gene *PLEC* encontrados foi possível classifica-los clinicamente seguindo o último consenso dermatológico publicado de 2014⁶ em:

- Intermediária dominante: 1 paciente
- Intermediária recessiva: 2 pacientes

Tabela 7- Achados clínicos de EB simples

Achados clínicos	KRT5	KRT14	PLEC
Sexo	5 F / 1M	2 F / 4M	2 F / 1M
Nascimento a termo	6/6	5/6	3/3
Presença de bolhas	4/6	3/6	3/3
Ausência de unha	6/6	0/6	3/3
Estenose de esôfago	0/6	2/6	2/3
Bolhas nas extremidades	6/6	3/6	3/3
Bolhas nas dobras	1/6	2/6	1/3
Lesões cicatriciais pós bolhas	0/6	0/6	3/3
Mílias em cicatrizes	0/6	0/6	3/3
Pseudo-sindactilia	1/6	0/6	1/3
Hiperkeratose	4/6	6/6	1/3
Cáries e alterações de esmaltes	1/6	4/6	2/3
Cabelos finos e quebradiços	0/6	1/6	0/3
Hiperhidrose	6/6	3/6	2/3
Escoliose	0/6	1/6	1/3
Dor crônica	6/6	2/6	2/3
Desnutrição	2/6	2/6	0/3
Dificuldade de deambulação	0/6	0/6	2/3
Carcinoma espinocelular	0/6	0/6	0/3

Tabela 8- O estudo molecular de 15 pacientes com EB Simples

Família	Paciente	SEXO	Gene	Resultado Molecular	Literatura	Variante patogênica	Herança
48	52	F	<i>KRT5</i>	NM_000424: c.555+1G>A	Já descrita	Heterozigoto	AD
48	53	F	<i>KRT5</i>	NM_000424: c.555+1G>A	Já descrita	Heterozigoto	AD
49	54	F	<i>KRT5</i>	NM_000424: c.598T>C:p.(Trp200Arg)	Já descrita	Heterozigoto composto	AR
				NM_000424: c.770+2T>A	INÉDITA		
50	55	M	<i>KRT5</i>	NM_000424: c.598T>C:p.(Trp200Arg)	Já descrita	Homozigoto	AR
51	56	F	<i>KRT5</i>	NM_000424: c.449T>C:p.(Leu150Pro)	Já descrita	<i>De novo</i>	AD
52	57	F	<i>KRT5</i>	c.1429G>A:p.(Glu477Lys)	Já descrita	<i>De novo</i>	AD
53	58	M	<i>KRT14</i>	NM_000526: c.373C>G:p.Arg125Gly	Já descrita	Heterozigoto	AD
53	59	M	<i>KRT14</i>	NM_000526: c.373C>G:p.Arg125Gly	Já descrita	Heterozigoto	AD
53	60	M	<i>KRT14</i>	NM_000526: c.373C>G:p.Arg125Gly	Já descrita	Heterozigoto	AD
54	61	F	<i>KRT14</i>	NM_000526: c.374G>A:p.Arg125His	Já descrita	<i>De novo</i>	AD
55	62	F	<i>KRT14</i>	NM_000526: c.373C>T:p.Arg125Cys	Já descrita	<i>De novo</i>	AD
56	63	M	<i>KRT14</i>	NM_000526: c.1243T>C:p.Tyr415His	Já descrita	Heterozigoto	AD
57	64	F	<i>PLEC</i>	NM_000445: c.7393C>T:(p.Arg2465*)	Já descrita	Homozigoto	AR
58	65	F	<i>PLEC</i>	NM_000445: c.9976C>T:p.(Arg3326Trp)	Já descrita	Heterozigoto	AD
59	66	M	<i>PLEC</i>	NM_000445: c.4543C>T:p.(Gln1515*)	INÉDITA	Homozigoto	AR

Legenda: AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva

Assim, no estudo molecular de 15 pacientes com EB Simples:

Alteração no gene ***KRT5***:

Foram 6 pacientes (5 famílias), sendo três famílias de herança autossômica dominante e duas famílias de herança autossômica recessiva.

Foi encontrada uma variante em homozigose não reportada na literatura. Demais variantes já foram relatadas na literatura.

Alteração no gene ***KRT14***

Foram 6 pacientes (4 famílias) eram de autossômica dominante e as variantes eram já reportadas na literatura.

Uma família apresentava dois irmãos e pai afetados.

Alteração no gene ***PLEC***

Foram três pacientes sendo dois pacientes de herança autossômica recessiva e um paciente de herança autossômica dominante.

Um variante em homozigose foi inédita , não descrita na literatura.

Imunomapeamento x Estudo Molecular

Tabela 9- Comparação entre imunomapeamento e estudo molecular dos pacientes de EB simples – alteração de *KRT5/KRT14/PLEC*

Família	Paciente	Gene	Resultado molecular	Imunomapeamento	Resultado
48	52	<i>KRT5</i>	EB simples	EB simples	Concordante
48	53	<i>KRT5</i>	EB simples	Não realizado	NA
49	54	<i>KRT5</i>	EB simples	EB simples	Concordante
50	55	<i>KRT5</i>	EB simples	EB simples	Concordante
51	56	<i>KRT5</i>	EB simples	EB simples	Concordante
52	57	<i>KRT5</i>	EB simples	Inconclusivo	NA
53	58	<i>KRT14</i>	EB simples	EB simples	Concordante
53	59	<i>KRT14</i>	EB simples	Não realizado	NA
53	60	<i>KRT14</i>	EB simples	Não realizado	NA
54	61	<i>KRT14</i>	EB simples	EB simples	Concordante
55	62	<i>KRT14</i>	EB simples	EB simples	Concordante
56	63	<i>KRT14</i>	EB simples	EB distrófica dominante	Discordante
57	64	<i>PLEC</i>	EB simples	EB simples	Concordante
58	65	<i>PLEC</i>	EB simples	Inconclusivo	NA
59	66	<i>PLEC</i>	EB simples	Inconclusivo	NA

Legenda: NA: Não aplicável

Em seis pacientes com variante no gene *KRT5*, o imunomapeamento foi concordante exceto em um paciente que foi inconclusivo.

No gene *KRT14* três pacientes eram da mesma família e o imunomapeamento foi concordante em um deles e em outros dois não foi realizada biópsia de pele. Em outros dois pacientes o resultado de imunomapeamento foi concordante. Mas em um paciente o resultado foi discordante mostrando imunomapeamento como EB distrófica.

Quanto ao gene *PLEC* apenas um paciente o resultado foi concordante

e outros dois pacientes o resultado de imunomapeamento foi inconclusivo.

EB Juncional - Alteração do gene COL17A1

Apenas uma paciente apresentou EB juncional com alteração do gene COL17A1:

Quadro Clínico

A mãe da paciente com EB juncional relata que gestação ocorreu sem intercorrências, nasceu a termo, com a pele íntegra e sem bolhas. Aos 3 dias de vida apresentou início de bolhas nos pés. O diagnóstico de EB foi feito aos 3 anos.

Já teve desnutrição e anemia leve com dificuldade de deglutir alimentos secos, mas sem necessidade de dilatação esofágica

Referia dor crônica em mãos que incham desde os 5 anos e prurido constante.

A minha avaliação dermatológica foi aos 16 anos. No momento com 1,62m e 47kg. Apresentava bolhas em dobras e extremidades, que cicatrizavam com certa dificuldade, mas sem miliárias. Sem pseudo sindactilia mas com hiperkeratose em pés. Ausentes as unhas dos pés, mas íntegras as das mãos, cabelos ralos e quebradiços e dentes alterados com predisposição às caries.

Apresentava leve escoliose. Conseguia andar mas mostrava dificuldade em subir escadas

Classificação da Lesão Dermatológica

Analisando clinicamente a paciente com EB juncional com alteração do gene COL17A1 encontrados foi possível classifica-los clinicamente seguindo o

último consenso dermatológico publicado de 2014⁶ em:

- Generalizada intermediária: 1 paciente
- De princípio tardio: nenhum paciente
- Localizada: nenhum paciente

Tabela 10- Resultado molecular da paciente com alteração no gene *COL17A1* Recessiva

Paciente	Sexo	Gene	Resultado Molecular	Literatura	Variante patogênica
67	F	<i>COL17A1</i>	NM_000494: c.2383C>T;p.(Arg795*)	Já descrita	Homozigoto

A variante no gene *COL17A1* encontrada na paciente já foi descrita como patogênica e seus pais eram consanguíneos.

Imunomapeamento x Estudo Molecular

Foi concordante o estudo no caso de EB juncional.

Tabela 11- Comparação entre imunomapeamento e estudo molecular do paciente de EB juncional – alteração de *COL17A1*

Paciente	Resultado Molecular	Imunomapeamento	Resultado
67	EB juncional	EB juncional	Concordante

7. DISCUSSÃO

Nosso estudo compreendeu no total de 67 pacientes de 60 famílias sendo EB Distrófica 51 pacientes (47 recessiva e 4 dominante), EB Simples (15 pacientes) e EB juncional (1 paciente).

Considerando se a casuística de pacientes estudados provenientes principalmente da Unidade de Dor, um serviço de referência já era esperado que estudaríamos casos mais graves e de difícil controle. Desta forma, houve um predomínio acentuado de EB Distrófica 51/67 (76%), com quadro clínico mais grave diferente da literatura³⁶.

EB Distrófica Recessiva – COL7A1

Nossos casos de EB distrófica recessivas apresentaram quadros clínicos mais graves semelhantes aos descritos na literatura¹⁷.

Nos sete casos familiares, de 3 famílias, a lesão dermatológica era generalizada intermediária em 2 famílias e localizada em 1 família sendo semelhantes entre as irmandades afetadas. Nas duas famílias com lesão dermatológica intermediária uma família tinha apresentava variante em homozigose e outra em heretozigoto composto. E a família com lesão localizada eram variantes heterozigoto composto.

Os pacientes nasceram a termo 44/47 (93,6%), todos apresentaram as bolhas nos primeiros dois dias de vida e com a presença de unhas nas mãos e pés exceto 2 pacientes que nasceram sem as unhas dos pés.

Em 28 pacientes (59,6%) apresentaram estenose esôfago com necessidade de realização da dilatação esofágica em média de 8 anos. E anemia foi encontrada em 23/47 (48,9%) sendo que 14 (29,8%) necessitaram de transfusões de sangue pela anemia grave.

A desnutrição foi referida em 35 pacientes (71,5%) em alguma época da vida. Em metade dos pacientes peso e estatura estavam abaixo do percentil 5.

Todos os pacientes referiram intenso prurido. A dor crônica foi referida em 36 pacientes (78%) especialmente na troca do banho e curativo e frequentes faltas nas escolas pelas dificuldades de mobilidade levando a atrasos intelectuais em 17 pacientes (36%).

Evoluíram para pseudo-sindactilias em mãos e pés em 24 pacientes (51%) e 3 pacientes apenas em pés (11%).

As unhas estavam ausentes nas mãos e pés em 36 (78,5%) e os outros com poucas unhas.

A escoliose foi observada em 6 pacientes após a adolescência.

Três pacientes tiveram carcinoma espinocelular aos 11, 15 e 17 anos sendo 2 pacientes em calcâneo unilateral e um em pé esquerdo com necessidade de amputação.

Quatro pacientes faleceram durante o estudo aos 2, 12, 15 e 20 anos. E últimos dois deles tinham carcinoma espinocelular em calcâneo.

EB Distrófica Dominante – COL7A1

Em quatro pacientes estudados, todos eram casos esporádicos.

Todos nasceram a termo com peso entre 3100g a 3315g.

As bolhas surgiram nos primeiros 2 meses de vida e nasceram com todas as unhas.

As lesões dermatológicas foram classificadas generalizadas em 3 pacientes e acral em 1 paciente.

Nenhum deles evoluiu com pseudo-sindactilia mas havia ausência

parcial de unhas. Nenhum deles tinha dificuldade de ambulação.

O quadro clínico foi mais brando como descrito na literatura³⁷.

EB Simples

Na literatura a EB simples é o tipo mais frequente e com quadro clínico mais brando causada por sete diferentes genes, mas principalmente pelas alterações dos genes *KRT5* e *KRT14* que correspondem de 60-70% respectivamente e outros incluindo *PLEC*⁴.

Em nosso estudo encontramos EB simples em 15 pacientes e foram identificados 3 genes: *KRT5* (6 pacientes), *KRT14* (6 pacientes) e *PLEC* (3 pacientes).

KRT5 (6 pacientes)

Todos nasceram a termo e apresentaram bolhas nos primeiros 10 dias de vida. Todos tinham unhas ao nascimento.

Todos os seis apresentaram dor crônica, prurido e intensa sudorese. Nenhum dos pacientes referiu estenose de esôfago.

Todas apresentavam bolhas em extremidades e um paciente também em dobras com hiperqueratose em pés. A presença de miliárias e cicatrizes é mínima. Todos tinham ausência de algumas unhas em mãos e pés. Cabelos e dentes não puderam ser bem avaliados em 2 pacientes pois tinham 1 ano apenas. Em outros 3 pacientes eram adequados, mas um apresentava dentes frágeis.

A deambulação era normal.

Dos seis pacientes estudados quatro eram autossômicos dominantes e dois autossômicos recessivos.

A família com filha e mãe afetadas de herança autossômica dominante a manifestação clínica foi leve, no entanto um caso esporádico apresentou quadro mais acentuado com hiperkeratose.

Não observamos a diferença da gravidade do quadro clínico entre os casos de autossômica recessiva e dominante.

KRT14 (6 pacientes)

Dos seis pacientes estudados 3 eram da mesma família (pai e dois filhos afetados de mães diferentes). Outros três pacientes também eram de herança autossômica dominante.

Cinco pacientes nasceram a termo e um paciente pré-termo de 34 semanas com oligoamnio. E todos apresentaram bolhas nos primeiros dias de vida.

Nenhum tinha pseudo-sindactilia e miliária. Todos tinham unhas das mãos mas alguns não tinham dos pés. Metade dos pacientes tinha hiperhidrose e anemia na primeira infância. Não apresentaram prurido.

PLEC (3 pacientes)

Dois pacientes eram autossômicos recessivos e um autossômico dominante

Nasceram a termo e com bolhas nas primeiras horas de vida, evoluíram com peso e estatura normal.

As bolhas em extremidades estavam presentes nos três pacientes, mas não em dobras. A presença de miliárias era mínima.

Dois pacientes autossômicos recessivos tiveram que fazer dilatação por estenose de esôfago e uma delas apresentava pseudo-sindactilia em pés.

EB Juncional

EB juncional tem quadro clínico muito variável de grave com óbito precoce até formas leves sendo o quadro mais raro das EBs³⁸. É causada pelas alterações de 7 genes conhecidos sendo um deles *COL17A1*, todos de herança autossômica recessiva.

O único caso encontrado com EB juncional seguiu as características clínicas dermatológicas intermediárias descritas na literatura de *COL17A1*³⁵. Os pais eram consanguíneos e a variante foi encontrada em homozigose.

A paciente teve bolhas com três dias de vida. Evoluiu com desnutrição e anemia leve. Refere dor crônica e prurido constante.

Avaliação dermatológica realizada aos 16 anos com bolhas em dobras sem miliárias. Os cabelos eram finos e quebradiços e ausência de unhas de pés,.

Andava com dificuldade.

Estudo molecular

O sequenciamento completo de exoma identificou algumas variantes não descritas na literatura :

EB distrófica recessiva : 47 pacientes (43 famílias)

Alteração no ***COL7A1***

Homozigose em 2/ 13 variantes foram inéditas.

Heterozigose composta foi encontrada em 30 pacientes e 10/60 variantes foram inéditas não descritas na literatura.

EB distrófica dominante

Alteração no **COL7A1**

Das 3 /4 variantes foram inéditas.

EB simples

Alteração no gene **KRT5**: 6 paciente (5 famílias)

Foi encontrada uma variante no gene em homozigose não reportada na literatura.

Alteração no gene **PLEC** : 3 pacientes (3 famílias)

Um variante em homozigose foi inédita , não descrita na literatura.

Resumindo , as variantes encontradas foram inéditas na EB distrófica recessiva foi 12/73 variantes(16%), na EB distrófica dominante 3/4 variantes, na EB simples uma variante em homozigose no gene **KRT5** e uma em homozigose no gene **PLEC**.

Estudo Molecular x Imunomapeamento

Quando comparamos todos os resultados de estudos moleculares e imunomapeamentos :

Dos 67 pacientes EB com resultado molecular 8 não haviam realizado previamente a biópsia.

Assim pudemos comparar o estudo molecular e imunomapeamento em 59 pacientes:

- 37/59 (63%) pacientes houve concordância dos resultados
- 13/59 (22%) pacientes houve discordância entre resultados
- 9/59 (15%) pacientes o resultado de imunomapeamento veio

inconclusivo

Apesar do imunomapeamento ser útil em nosso meio, comparando com o estudo molecular, foi concordante em 63%, discordante em 22% e inconclusivo em 15%.

Portanto, o estudo molecular é fundamental para o aconselhamento genético adequado à família.

8. CONCLUSÕES

O estudo analisou 67 pacientes (M: 34 F: 33) com EB provenientes dos ambulatórios da Unidade da dor e cuidados paliativos do Instituto da Criança e de Dermatologia do HC sob aspecto clínico e dermatológico e foi realizado o estudo molecular pelo sequenciamento completo de exoma.

O estudo molecular pelo sequenciamento completo de exoma em 67 pacientes foram classificados em: 47 pacientes com EB distrófica recessiva, 4 com EB distrófica dominante, 15 pacientes com EB simples e 1 paciente com EB juncional.

Foram encontradas variantes novas não descritas na literatura: na EB distrófica recessiva 12/73 variantes(16%), na EB distrófica dominante 3/4 variantes, na EB simples uma variante em homozigose no gene *KRT5* e uma em homizigose no gene *PLEC*.

O resultado do imunomapeamento em comparação com estudo molecular foi concordante em 63% dos pacientes, no entanto, foi discordante em 22% dos pacientes e inconclusivo em 15%.

Na EB distrófica recessiva todos pacientes apresentavam o quadro clínico mais grave com acometimento cutâneo generalizado exceto em duas pacientes irmãs com lesões localizadas pré tibiais; três pacientes apresentaram carcinoma espinocelular e quatro faleceram durante o estudo.

Na EB simples, pacientes com alteração no gene *PLEC* autossômicos recessivos tiveram quadros clínicos mais graves que alteração nos genes *KRT5* e *KRT14*.

Este estudo conseguiu analisar clinicamente e classificar de maneira precisa de todos os pacientes pelo sequenciamento completo de exoma (100%), assim oferecer o aconselhamento genéticos adequado à família.

Recomendamos o sequenciamento completo de exoma como método de escolha para o diagnóstico de EB.

Anexo 1 – Aprovação CAPPesq

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo Genético da Epidermólise Bolhosa

Pesquisador: Chong Ae Kim

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 62641716.8.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO

PARECER

Número do

Parecer:

2.269.829

Apresentação do Projeto:

Aplicação de técnica de sequenciamento de nova geração na investigação de mutações causais por meio da construção de um painel de genes específicos associados à epidermólise bolhosa.

Objetivo da Pesquisa: identificar variantes genômicas relacionadas aos diferentes tipos de epidermólise bolhosa e, padronizar e implantar o método de desenvolvimento de painel específico e sequenciamento por NGS

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos envolvidos, a não ser os decorrentes da coleta de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não apresenta questionamentos éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentam ementa solicitando a inclusão de Amom Mendes Nascimento como pesquisador, o trabalho terá a finalidade acadêmica de mestrado será orientado pela Dra Leslie Domenici Kulikowski participante do projeto.

Página 01 de

Continuação do Parecer: 2.269.829

Recomendações:

APROVADO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_965650_E1.pdf	18/08/2017 10:50:56		Aceito
Outros	ANUENCIAamom.pdf	21/07/2017 11:08:10	Chong Ae Kim	Aceito
Outros	Emenda.pdf	21/07/2017 11:04:34	Chong Ae Kim	Aceito
Outros	PROJETOAMOM_FAPESP.pdf	21/07/2017 10:58:00	Chong Ae Kim	Aceito
Outros	Carta_RespostaPendencia_30Mar17.pdf	30/03/2017 15:49:38	Chong Ae Kim	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisa_EB.docx	30/03/2017 15:48:16	Chong Ae Kim	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisa_EB.pdf	30/03/2017 15:48:01	Chong Ae Kim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_Pais_Responsaveis_verso_1_0_10Mar17_EB.doc	17/03/2017 11:51:36	Chong Ae Kim	Aceito

Ausência				
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pais_Responsaveis_verso_1_0_10Mar17_EB.pdf	17/03/2017 11:51:23	Chong Ae Kim	Aceito
Outros	CartaSubmPendencia_17Mar17.pdf	17/03/2017 11:50:59	Chong Ae Kim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Assentimento_13_18anos_EB.pdf	13/03/2017 16:38:50	Chong Ae Kim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Assentimento_13_18anos_EB.doc	13/03/2017 16:38:39	Chong Ae Kim	Aceito

Página 02 de

Continuação do Parecer: 2.269.829

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Assentimento_7_12anos_EB.pdf	13/03/2017 16:38:24	Chong Ae Kim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Assentimento_7_12anos_EB.doc	13/03/2017 16:38:10	Chong Ae Kim	Aceito
Outros	Anexoll_online14427.pdf	13/03/2017 16:37:24	Chong Ae Kim	Aceito
Outros	cartaSubmccappesq_13Mar17.pdf	13/03/2017 16:37:03	Chong Ae Kim	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_260916.pdf	26/09/2016 10:57:17	Chong Ae Kim	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 12 de Setembro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Anexo 2 - Termo de consentimento - TCLE paciente epidermólise

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 RG Nº: SEXO: M F DATA NASCIMENTO:/...../.....
 END..... Nº.....
 APTO:BAIRRO:

CIDADE ESTADO:

CEP:.....TELEFONE:(.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

RG :.....SEXO: M F DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 END..... Nº.....
 APTO:BAIRRO:

CIDADE ESTADO:

CEP:.....TELEFONE:(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

“Estudo Clínico e Molecular de Epidermólise Bolhosa”

PESQUISADOR: **Chong Ae Kim**

CARGO/FUNÇÃO: **Chefe da Unidade de Genética do Instituto da Criança do HC-FMUSP**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **CRM 40.054.**

UNIDADE DO HCFMUSP:... **Unidade de Genética do Instituto da Criança**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

3..DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, de uma pesquisa **“Estudo Clínico e Molecular de Epidermólise Bolhosa”**. Esta pesquisa quer avaliar os pacientes portadores de epidermólise bolhosa que seguem no ambulatório da dor e fazer seu estudo clínico e molecular.

Para participar desta pesquisa este termo deverá ser assinado pelos pais ou responsáveis pelo paciente.

Se você aceitar participar será realizada uma coleta de sangue na veia do paciente para que a gente possa fazer as análises necessárias. Esta coleta poderá ser feita junto com outros exames solicitados ou exclusivamente para esta pesquisa, caso não existam outros exames a serem feitos.

O risco que o paciente corre ao participar da pesquisa é ter um hematoma (“roxo”) e dor no local da coleta.

Nós queremos classificar crianças que tenham esta doença e assim conseguir fornecer mais informações sobre a doença e o tratamento, se necessário também poderemos investigar os familiares que tiverem alguma suspeita de terem a mesma doença, caso eles concordem.

Não será cobrado nada do paciente que escolher participar da pesquisa e não receberá nenhuma recompensa em dinheiro.

Você poderá tirar dúvidas sobre qualquer aspecto que desejar em qualquer etapa do estudo, com os profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dr a Chong Ae Kim, que pode ser encontrado na unidade de genética do Instituto da Criança, Av Dr Enéas Carvalho de Aguiar 647, telefone 2661-8671. A qualquer momento, você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas na Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar, tel: 2661-6442 (ramais 16, 17, 18), e-mail:cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Você poderá pedir para que seu filho saia da pesquisa a qualquer momento e o tratamento dele no ICr não será prejudicado.

A participação na pesquisa é voluntária e caso não queira participar não haverá problemas ou punições.

Depois que a pesquisa acabar, os resultados serão informados para você e poderão ser divulgados em trabalhos científicos sem revelar o seu nome.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo Clínico e Molecular em Epidermólise Bolhosa”. Eu discuti com o Dra Chong Ae Kim, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

Anexo 3 - Termo de consentimento - TCLE pais paciente epidermólise

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº
..... APTO:
BAIRRO: CIDADE
.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL
.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
.....
BAIRRO: CIDADE:
.....
CEP: TELEFONE: DDD
(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Estudo Genético da Epidermólise
Bolhosa

PESQUISADOR : Chong Ae Kim..

CARGO/FUNÇÃO: Médico Pesquisador..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40054.....

UNIDADE DO HCFMUSP: .Genética do Instituto da Criança do HCFMUSP.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO X RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : .24 Meses.....

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 – O seu(a) filho(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo genético que pretende avaliar os aspectos clínicos, laboratoriais e moleculares de pacientes com epidermólise bolhosa. Pretendemos também classificar qual o tipo de epidermólise que seu(a) filho(a) apresenta e, talvez, seja necessário investigar outros familiares com alguma suspeita de terem a mesma doença de seu filho(a). Assim, caso concordem, eles também poderão participar da pesquisa.

2 – Serão realizados em uma consulta médica previamente agendada: a) uma entrevista inicial com os pais e/ou responsável legal, incluindo uma história familiar (árvore genealógica) da doença atual e doenças anteriores; b) um exame físico completo do seu(a) filho(a); c) solicitação de exames complementares pertinentes se necessário;

3 – Será coletada uma amostra de 3,0 ml de sangue periférico por uma veia do antebraço;

4 – Os desconfortos e riscos esperados serão apenas aqueles decorrentes da coleta de sangue de uma veia periférica, limitando-se à dor da punção venosa e os secundários a um pequeno extravasamento de sangue por ocasião da coleta (hematoma – mancha roxa no local da punção);

5 – O benefício direto para o(a) seu(a) filho(a) será o de evitar que a biópsia de pele tenha de ser repetida para determinar o tipo específico da epidermólise, uma vez que nem sempre esse exame é capaz de esclarecer qual é o tipo de epidermólise que seu(a) filho(a) apresenta. Quando não se sabe o tipo de epidermólise não podemos definir a abordagem mais adequada e também se haverá repetição da doença na família.

6 – Será garantido o acesso a todos os dados obtidos. Assim, em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Chong Ae Kim , que pode ser encontrado no endereço: Av Dr Eneas de

Carvalho Aguiar, 647. São Paulo, Sp. CEP 05403-000 Telefone:2661-8671. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;

7 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

8 – O participante e seus familiares serão mantidos atualizados sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9 – Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;

10 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e permitida a desistência deixando de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu(a) filho(a) tratamento na Instituição;

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Estudo Genético da Epidermólise Bolhosa”.

Eu discuti com o Dra. Chong Ae Kim sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

..... APTO:

BAIRRO: CIDADE

.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

.....

2.RESPONSÁVEL LEGAL

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar de um estudo genético que pretende avaliar os aspectos clínicos, laboratoriais e moleculares de pacientes com epidermólise bolhosa. Pretendemos também classificar qual o tipo de epidermólise que seu filho apresenta e talvez, seja necessário investigar outros familiares com alguma suspeita de terem a mesma doença. Assim, caso todos concordem eles também participarão da pesquisa.

2 – Serão realizados em uma consulta médica previamente agendada: a) uma entrevista inicial com os pais e/ou responsável legal, incluindo uma história familiar (árvore genealógica) da doença atual e moléstias progressas; b) um exame físico completo do paciente; c) solicitação de exames complementares pertinentes se necessário;

3 – Será coletada uma amostra de 4,0 ml de sangue periférico por uma veia do antebraço;

4 – Os desconfortos e riscos esperados serão apenas aqueles decorrentes da coleta de sangue de uma veia periférica, limitando-se à dor da punção venosa e os secundários a um pequeno extravasamento de sangue por ocasião da coleta (hematoma – mancha roxa no local da punção);

5 – O benefício direto para o seu filho será o de evitar que a biópsia de pele tenha de ser repetida para determinar o tipo específico da epidermólise, uma vez que nem sempre esse exame é capaz de esclarecer qual é o tipo de epidermólise que seu filho apresenta. Quando não se sabe o tipo de epidermólise não podemos definir a abordagem mais adequada e também se haverá repetição da doença na família.

7 – Será garantido o acesso a todos os dados obtidos. Assim, em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Chong Ae Kim, que pode ser encontrado no endereço: Av Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 647. São Paulo, Sp. CEP 05403-000 Telefone:2661-8671. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;

8 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

9 – O participante e seus familiares serão mantidos atualizados sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

10 – Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;

11 – O(a) senhor(a) será consultado(a) novamente para autorizar ou não a utilização do material genético do seu(a) filho(a) armazenado no laboratório em eventual futura pesquisa aprovada pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas – CAPPesq;

12 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e permitida a desistência deixando de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Estudo Genético da Epidermólise Bolhosa”.

Eu discuti com o Dra. Chong Ae Kim sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data / /

Anexo 4 - Termo de assentimento 6 a 12 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO SUJEITOS DE PESQUISA DE 06 A 12 ANOS DE IDADE INCOMPLETOS

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

..... APTO:

BAIRRO: CIDADE

.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

.....

BAIRRO: CIDADE:

.....

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Estudo Genético da Epidermólise
Bolhosa

PESQUISADOR : Chong Ae Kim..

CARGO/FUNÇÃO: Médico Pesquisador..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40054.....

UNIDADE DO HCFMUSP: .Genética do Instituto da Criança do HCFMUSP.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO X

RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : .24 Meses.....

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO
SUJEITOS DE PESQUISA DE A 12 ANOS DE IDADE INCOMPLETOS**

Título do documento Termo de Assentimento para Sujeitos de 01 a 10 anos de idade incompletos

Título do estudo Estudo genético da Epidermólise Bolhosa

Estudo descritivo

O médico vai perguntar a você se pode ser examinado. Ele vai olhar a sua pele. O papai e a mamãe sabem disto e estão juntos com você na sala de consulta

O que vai acontecer durante o estudo?

O médico vai olhar a sua pele, pesar e medir você

Rubrica da pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Assentimento	Rubrica dos Pais ou Representante(s) Legal(is)
---	---

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO
SUJEITOS DE PESQUISA DE 06 A 12 ANOS DE IDADE INCOMPLETOS**

**Seu médico explicará a você que vai precisar pegar
um pouquinho do seu sangue.**

**Uma agulha pequena vai ser colocada na veia de
seu braço (ou mão). Isto vai ser uma espetadinha,
mas vai passar logo.**

O sujeito de pesquisa é incapaz de ler o Termo de Assentimento, porém, as informações foram verbalmente explicadas a ele, que forneceu verbalmente sua aceitação para participar do estudo.

Nome da pessoa que obteve o assentimento:

Assinatura da pessoa que obteve o assentimento:

Data: _____

Rubrica da pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Assentimento	Rubrica dos Pais ou Representante(s) Legal(is)
---	---

Anexo 5 - Termo de assentimento 12 a 18 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO SUJEITOS DE PESQUISA DE 12 A 18 ANOS DE IDADE INCOMPLETOS

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

..... APTO:

BAIRRO: CIDADE

.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

.....

BAIRRO: CIDADE:

.....

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Estudo Genético da Epidermólise
Bolhosa

PESQUISADOR : Chong Ae Kim..

CARGO/FUNÇÃO: Médico Pesquisador..... INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 40054.....

UNIDADE DO HCFMUSP: .Genética do Instituto da Criança do HCFMUSP.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO X

RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : .24 Meses.....

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO
SUJEITOS DE PESQUISA DE 12 A 18 ANOS DE IDADE INCOMPLETOS**

Título do documento Termo de Assentimento para Sujeitos de 01 a 10 anos de idade incompletos

Título do estudo Estudo genético da Epidermólise Bolhosa
Estudo descritivo

Seu médico vai perguntar se você quer participar de uma pesquisa médica. Seus pais já foram informados sobre os detalhes desta pesquisa.

O que acontecerá comigo se eu aceitar participar do estudo?

Você será examinado pelo seu médico e ele vai te pesar, medir a sua altura e examinar a sua pele. Seus pais ou responsável estarão presentes durante e este exame.

Em seguida será coletado um pouco de sangue a partir da veia de seu braço, ou mão, com uma agulha fina. Isto pinica um pouco, mas acaba rapidamente.

Rubrica da pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Assentimento	Rubrica dos Pais ou Representante(s) Legal(is)
---	---

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO
SUJEITOS DE PESQUISA DE 12 A 18 ANOS DE IDADE INCOMPLETOS**

Com quem devo falar se eu tiver dúvidas?

Caso tenha perguntas ou dúvidas gerais sobre esta pesquisa ou quaisquer queixas relacionadas à pesquisa, você poderá falar com: Instituto da Criança, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 647, sétimo andar, unidade de Genética, telefone(11)2661-8671.

Obrigado por ler este documento.

Assinatura da aceitação do
paciente: _____

Data: _____

Rubrica da pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Assentimento	Rubrica dos Pais ou Representante(s) Legal(is)
---	---

Anexo 6 – Protocolo clínico

PROTOCOLO AVALIAÇÃO PACIENTES EPIDERMÓLISE BOLHOSA Data _____

Nome: _____ Reg _____

DN _____ / _____ / _____ Sexo _____

End _____

CEP _____

Fones _____

Mãe _____

Idade _____

Pai _____

Idade _____

PRÉ-NATAL

Pais consangüíneos Fez pré-natal Uso de medicamentos durante a gestação: _____

NASCIMENTO

Parto normal cesária Apgar: _____ Peso ao nascer: _____ Estatura ao nascer: _____ PC: _____

Desenvolvimento neuro-motor: _____

Aprendizado: _____

SINAIS DERMATOLÓGICOS

Ao nascimento Primeira infância Quais: _____

HISTÓRIA CLÍNICA

Prurido Dor

Medicamentos em uso: _____

Desenvolvimento de neoplasia Atresia de piloro Contraturas

esofágicas Comprometimento auditivo Otites de repetição

EXAME FÍSICO DERMATOLÓGICO

Descrição pele atual: _____

Erosões perioculares/perinasais/perilabiais Bolhas íntegras Feridas crônicas

Presença de tecido de granulação Cicatrizes Miliuns

Pseudodactilia Carcinomas Poiquilodermia Lesões albolupulóides Áreas expostas ao sol

Hiperkeratose/ceratodermia palmo-plantar Lesão pré-tibial Mucosas acometidas

Unhas Cabelos/pêlos Acometimento de dentes Distrofia muscular

EXAME FÍSICO GERAL

Peso: Estatura:

Olhos:

Aparelho digestivo:

Cardio-pulmonar:

Rouquidão Tosse Dispneia Esplenomegalia/hepatomegalia

Dores articulares

Dentes: anquiloglossia microstomia

BIÓPSIA

Anatomopatológico:

Imunomapeamento/Imunofluorescência:

ESTUDO MOLECULAR:

HEREDOGRAMA:

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fine, J. D. Inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2010) doi:10.1186/1750-1172-5-12.
2. Bruckner-Tuderman, L., Mcgrath, J. A., Robinson, E. C. & Uitto, J. Progress in epidermolysis Bullosa research: Summary of DEBRA international research conference 2012. in *Journal of Investigative Dermatology* (2013). doi:10.1038/jid.2013.127.
3. Fine, J. D. *et al.* The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J. Am. Acad. Dermatol.* (2008) doi:10.1016/j.jaad.2008.02.004.
4. Pfendner, E., Uitto, J. & Fine, J. D. Epidermolysis bullosa carrier frequencies in the US population [9]. *Journal of Investigative Dermatology* (2001) doi:10.1046/j.1523-1747.2001.01279-11.x.
5. Fine, J. D. & Mellerio, J. E. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa. Part I. Epithelial associated tissues. *Journal of the American Academy of Dermatology* (2009) doi:10.1016/j.jaad.2009.03.052.
6. Fine, J. D. *et al.* Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification. *Journal of the American Academy of Dermatology* (2014) doi:10.1016/j.jaad.2014.01.903.
7. El Hachem, M., Giancristoforo, S. & Diociaiuti, A. Inherited epidermolysis bullosa. *G. Ital. di Dermatologia e Venereol.* (2014) doi:10.14219/jada.archive.2011.0321.
8. Boeira, V. L. S. Y. *et al.* Inherited epidermolysis bullosa: clinical and therapeutic aspects. *An. Bras. Dermatol.* (2013) doi:10.1590/s0365-05962013000200001.
9. De Oliveira, Z. N. P., Périgo, A. M., Fukumori, L. M. I. & Aoki, V. Imunomapeamento nas epidermólises bolhosas hereditárias. *Anais Brasileiros de Dermatologia* (2010) doi:10.1590/S0365-05962010000600012.

10. Pohla-Gubo, G., Cepeda-Valdes, R. & Hintner, H. Immunofluorescence mapping for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Dermatologic Clinics* (2010) doi:10.1016/j.det.2009.12.005.
11. Cepeda-Valdés, R. *et al.* Immunofluorescence mapping for diagnosis of congenital epidermolysis bullosa. *Actas Dermosifiliogr.* (2010) doi:10.1016/S1578-2190(10)70697-1.
12. Berk, D. R., Jazayeri, L., Marinkovich, M. P., Sundram, U. N. & Bruckner, A. L. Diagnosing epidermolysis bullosa type and subtype in infancy using immunofluorescence microscopy: The stanford experience. *Pediatr. Dermatol.* (2013) doi:10.1111/j.1525-1470.2012.01880.x.
13. Yiasemides, E., Walton, J., Marr, P., Villanueva, E. V. & Murrell, D. F. A comparative study between transmission electron microscopy and immunofluorescence mapping in the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Am. J. Dermatopathol.* (2006) doi:10.1097/01.dad.0000211510.44865.6d.
14. Pfendner, E. G., Nakanol, A., Pulkkinen, L., Christiano, A. M. & Uitto, J. Prenatal diagnosis for epidermolysis bullosa: A study of 144 consecutive pregnancies at risk. *Prenat. Diagn.* (2003) doi:10.1002/pd.619.
15. Uitto, J. & Pulkkinen, L. The genodermatoses: Candidate diseases for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* (2000) doi:10.1089/104303400750035807.
16. Gonzalez, M. E. Evaluation and treatment of the newborn with epidermolysis bullosa. *Seminars in Perinatology* (2013) doi:10.1053/j.semperi.2012.11.004.
17. Intong, L. R. A. & Murrell, D. F. Inherited epidermolysis bullosa: New diagnostic criteria and classification. *Clin. Dermatol.* **30**, 70–77 (2012).
18. Fine, J. D., Johnson, L. B., Weiner, M. & Suchindran, C. Cause-Specific Risks of Childhood Death in Inherited Epidermolysis Bullosa. *J. Pediatr.* (2008) doi:10.1016/j.jpeds.2007.06.039.
19. Fine, J. D. & Mellerio, J. E. Extracutaneous manifestations and

- complications of inherited epidermolysis bullosa. Part II. Other organs. *Journal of the American Academy of Dermatology* (2009) doi:10.1016/j.jaad.2009.03.053.
20. Mallipeddi, R. Epidermolysis bullosa and cancer. *Clinical and Experimental Dermatology* (2002) doi:10.1046/j.1365-2230.2002.01130.x.
21. Venugopal, S. S. & Murrell, D. F. Treatment of skin cancers in epidermolysis bullosa. *Dermatologic Clinics* (2010) doi:10.1016/j.det.2010.01.009.
22. D'Souza, M. A. M. A., Kimble, R. M. & McMillan, J. R. Kindler Syndrome Pathogenesis and Fermitin Family Homologue 1 (Kindlin-1) Function. *Dermatologic Clinics* (2010) doi:10.1016/j.det.2009.10.012.
23. Yazdanfar, A. & Hashemi, B. Kindler syndrome: Report of three cases in a family and a brief review. *International Journal of Dermatology* (2009) doi:10.1111/j.1365-4632.2009.03936.x.
24. Elluru, R. G., Contreras, J. M. & Albert, D. M. Management of manifestations of epidermolysis bullosa. *Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery* (2013) doi:10.1097/MOO.0000000000000004.
25. Pope, E. *et al.* A consensus approach to wound care in epidermolysis bullosa. *J. Am. Acad. Dermatol.* (2012) doi:10.1016/j.jaad.2012.01.016.
26. Woodley, D. T. *et al.* Intravenously injected human fibroblasts home to skin wounds, deliver type VII collagen, and promote wound healing. *Mol. Ther.* (2007) doi:10.1038/sj.mt.6300041.
27. Marinkovich, M. P. & Tang, J. Y. Gene Therapy for Epidermolysis Bullosa. *Journal of Investigative Dermatology* (2019) doi:10.1016/j.jid.2018.11.036.
28. Mavilio, F. *et al.* Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.* (2006) doi:10.1038/nm1504.

-
29. De Luca, M., Pellegrini, G. & Mavilio, F. Gene therapy of inherited skin adhesion disorders: A critical overview. *British Journal of Dermatology* (2009) doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09243.x.
30. Pasmooij, A. M. G., Jonkman, M. F. & Uitto, J. Revertant mosaicism in heritable skin diseases: mechanisms of natural gene therapy. *Discovery medicine* (2012).
31. Wong, T. *et al.* Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* (2008) doi:10.1038/jid.2008.78.
32. Wagner, J. E. *et al.* Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N. Engl. J. Med.* (2010) doi:10.1056/NEJMoa0910501.
33. Mariath, L. M. *et al.* An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants. *Clin. Genet.* (2019) doi:10.1111/cge.13555.
34. Mariath, L. M., Santin, J. T., Schuler-Faccini, L. & Kiszewski, A. E. Inherited epidermolysis bullosa: update on the clinical and genetic aspects: Inherited epidermolysis bullosa. *An. Bras. Dermatol.* (2020) doi:10.1016/j.abd.2020.05.001.
35. Mariath, L. M. *et al.* Genotype-phenotype correlations on epidermolysis bullosa with congenital absence of skin: A comprehensive review. *Clinical Genetics* (2021) doi:10.1111/cge.13792.
36. M., E. H. *et al.* Multicentre consensus recommendations for skin care in inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2014).
37. Murrel, D. Overview of the management of epidermolysis bullosa. *UpToDate* (2019).
38. Fine, J. D. Epidemiology of inherited epidermolysis bullosa based on incidence and prevalence estimates from the national epidermolysis Bullosa registry. *JAMA Dermatology* (2016)

doi:10.1001/jamadermatol.2016.2473.