

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E CLÍNICA DE PACIENTES COM  
EPIDERMÓLISE BOLHOSA DO BRASIL**

**Luiza Monteavaro Mariath**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lavínia Schüler Faccini**

**Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Elisa Kiszewski Bau**

Porto Alegre, janeiro de 2020.

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Médica e Evolução do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e contou com o suporte financeiro do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (INaGeMP/CNPq/FAPERGS, *grant* 465549/2014-4).

*“Although formidable obstacles undoubtedly remain, I believe the future for epidermolysis bullosa patients will prove to be a bright one”.*

*Jo-David Fine*

## **AGRADECIMENTOS**

---

À profa. Lavínia, agradeço pelos oito anos de orientação, desde a iniciação científica, passando pelo mestrado e, agora, no doutorado. Agradeço a oportunidade de descobrir a genética médica e de desenvolver projetos que tanto me enchem de orgulho. O teu exemplo foi muito importante para o meu crescimento profissional e pessoal e levarei sempre comigo.

À profa. Ana, agradeço por me apresentar ao mundo das genodermatoses e pelo privilégio de desenvolver meu doutorado em epidermólise bolhosa. Obrigada por todos os ensinamentos e por estar sempre disponível para tirar dúvidas, corrigir e revisar os trabalhos cuidadosamente. Obrigada pela orientação e pelo exemplo durante toda a caminhada.

À Banca Examinadora, Dra. Chong Ae Kim, Dr. Hiram Larangeira de Almeida Jr. e Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino, pela revisão e avaliação cuidadosa desse trabalho e pelas brilhantes contribuições para a versão final da tese.

Um agradecimento especial às pesquisadoras colaboradoras do trabalho. À Juliana, pela parceria durante e ajuda com os dados clínicos dos pacientes. À Dra. Jeanine, agradeço pela colaboração que formamos, que foi essencial para conseguirmos incluir um número tão significativo de pacientes no nosso projeto. Foi gratificante conhecer o teu trabalho e agradeço o teu empenho no recrutamento dos pacientes. À Dra. Maria Juliana, muito obrigada por colaborar conosco, recrutando e acompanhando os pacientes do estado do Maranhão. Agradeço a atenção especial que deste ao estudo da EB.

O meu mais sincero muito obrigada a todos os pacientes com epidermólise bolhosa que participaram desse estudo, para os quais dedico esse trabalho. Agradeço a confiança das famílias e a participação no estudo. Foi uma honra poder conhecer alguns de vocês e, de alguma forma, ajudar. Os maiores frutos desse trabalho foram o retorno que conseguimos dar a vocês e a contribuição à comunidade científica da EB. Um agradecimento especial às associações de EB do Brasil que colaboraram conosco: Debra-Brasil, APPEB-DF, ACPAPEB, APPAPEB, AAPEB-SP e AMAPEB.

Ao INaGeMP e às instituições CAPES, CNPq e FAPERGS, agradeço o apoio financeiro, essencial para a realização do trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial aos professores e colegas, agradeço pelo aprendizado e convívio. Um agradecimento especial ao Elmo, sempre disponível a ajudar.

Aos amigos do Lab 113, obrigada pela convivência diária, pelas discussões científicas e conversas informais. Em especial aos amigos André, Augusto, Bibiane, Bruna, Eduarda, Fernanda, Gabriela, João, Julia, Juliano, Lucas, Luzivan, Mariléa, Mateus, Nelson, Pedro, Perpétua, Thayne, Zuleide, e todos os outros que passaram pelo 113 durante os últimos oito anos: muito obrigada por tornarem essa jornada mais leve e alegre.

Às amigas que a Biotecnologia me deu, obrigada por esses dez anos de amizade e por dividirmos juntas os momentos de angústia, mas também as alegrias e as conquistas.

Aos amigos desde sempre, agradeço por serem parte da minha vida e pelos momentos felizes, que foram combustível de ânimo.

À Batiam, Eizo, Yumi, Eiji, Bruna e Benji, minha segunda família, obrigada pelo carinho e apoio de sempre.

À minha família, não tenho palavras que consigam expressar minha gratidão. Essa conquista também é de vocês.

Aos meus irmãos que tanto amo, Gustavo e Felipe, obrigada por estarmos juntos sempre, incondicionalmente. A vocês e à “cunha” Paula, obrigada pelos jogos, pelas conversas, pelos passeios e pelas risadas.

Aos meus avôs, vô Ramon e vô Ênio, que não estão mais presentes fisicamente, obrigada por todo o amor dedicado. Sei que estão orgulhosos de onde estiverem.

À vó Nita, obrigada pela companhia, torcida e alegria de sempre, pelo teu exemplo de força e determinação e pelo teu amor.

À vó Isa, obrigada por se manter viva no meu coração e por ter sido tão única na minha vida. Consigo sentir o teu amor e pensar no teu sorriso com essa conquista.

À minha mãe e ao meu pai, muito obrigada pelo amor infinito e incondicional. Pelos abraços nos dias difíceis e também pelos abraços nos dias felizes. Por sempre acreditarem em mim. Por serem a minha base. Amo muito e muito vocês.

Ao Hélio, obrigada por ter sido o melhor amigo, o melhor companheiro e o meu amor por absolutamente todos os dias dessa caminhada. Se finalizo essa etapa sorrindo, é graças a ti e à Vida, a cachorrinha que chamamos de “filha”. Te amo o infinito.

## SUMÁRIO

---

Lista de Abreviaturas .....	8
Lista de Figuras e Tabelas .....	10
Resumo .....	11
Abstract .....	14
Capítulo I – Introdução .....	17
1. Estrutura e Organização da Pele Humana .....	18
1.1 Epiderme .....	18
1.2 Derme .....	19
1.3 Zona da Membrana Basal.....	20
2. Epidermólise Bolhosa .....	22
2.1 Critérios de Classificação da Epidermólise Bolhosa .....	26
2.2 Epidermólise Bolhosa Simples.....	27
2.2.1 Subtipos Clínicos da Epidermólise Bolhosa Simples .....	27
2.2.2 A Genética da Epidermólise Bolhosa Simples.....	31
2.2.2.1 Queratinas 5 e 14.....	32
2.2.2.2 Plectina .....	34
2.2.2.3 Outras Proteínas Associadas e a Surpresa ‘Kelch-like’ .....	35
2.3 Epidermólise Bolhosa Juncional .....	35
2.3.1 Subtipos Clínicos da Epidermólise Bolhosa Juncional.....	36
2.3.2 A Genética da Epidermólise Bolhosa Juncional .....	39
2.3.2.1 Laminina-332 .....	40
2.3.2.2 Colágeno XVII .....	41
2.3.2.3 Integrinas $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 3\beta 1$ .....	41
2.4 Epidermólise Bolhosa Distrófica .....	42
2.4.1 Subtipos Clínicos da Epidermólise Bolhosa Distrófica.....	43
2.4.2 A Genética da Epidermólise Bolhosa Distrófica .....	47
2.4.2.1 Colágeno VII.....	47
2.5 Síndrome de Kindler .....	51
2.6 Outras Desordens de Fragilidade da Pele .....	53
2.7 Diagnóstico de Epidermólise Bolhosa .....	54
Capítulo II - Justificativa .....	57
Capítulo III - Objetivos.....	59

<b>Capítulo IV – Artigo 1.....</b>	<b>61</b>
An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants.	
<b>Capítulo V – Artigo 2 .....</b>	<b>80</b>
Epidermolysis bullosa with congenital absence of skin: Clinical and genetic characterization of a 23-case series	
<b>Capítulo VI – Artigo 3.....</b>	<b>84</b>
Genotype-phenotype correlations on epidermolysis bullosa with congenital absence of skin: a comprehensive review	
<b>Capítulo VII – Artigo 4 .....</b>	<b>113</b>
A importância do resultado genético para o diagnóstico de epidermólise bolhosa e como variantes de <i>splicing</i> podem influenciar a gravidade da doença	
<b>Capítulo VIII – Artigo 5.....</b>	<b>125</b>
Gene panel for diagnosis of epidermolysis bullosa: proposal of a feasible and efficient approach	
<b>Capítulo IX - Discussão.....</b>	<b>143</b>
Eficiência do Painel de Genes para Epidermólise Bolhosa .....145	
Caracterização Genética de Pacientes com Epidermólise Bolhosa do Brasil.....146	
Epidermólise Bolhosa com Ausência Congênita de Pele: Correlações Genótipo-Fenótipo.....147	
O Resultado Genético Como Ferramenta de Diagnóstico e as Variantes de <i>Splicing</i> Modulando Formas Leves de Epidermólise Bolhosa.....149	
O Painel de Genes como Primeira Escolha para o Diagnóstico de Epidermólise Bolhosa .....151	
Genética da Epidermólise Bolhosa: Avanços e Perspectivas .....153	
<b>Capítulo X – Conclusões .....</b>	<b>155</b>
<b>Capítulo XI – Perspectivas .....</b>	<b>158</b>
<b>Capítulo XII – Referências Bibliográficas .....</b>	<b>160</b>
<b>Capítulo XIII – Apêndices .....</b>	<b>172</b>
Apêndice 1 - Representação Esquemática das Amostras Incluídas nos Estudos ..... 173	
Apêndice 2 - Representação Esquemática dos Centros Colaborativos e dos Locais de Origem dos Pacientes Incluídos no Estudo ..... 174	
<b>Capítulo XIV – Anexos .....</b>	<b>175</b>
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética – Projeto Epidermólise Bolhosa ..... 176	
Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética - Emenda ..... 179	
Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Adultos) ..... 181	
Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Responsáveis) ..... 183	

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

<b>AD</b>	Autossômico Dominante
<b>AR</b>	Autossômico Recessivo
<b>CAS</b>	<i>Congenital Absence of Skin</i> (ausência congênita de pele)
<b>CD151</b>	Gene codificador da molécula CD151 ( <i>Cluster of Differentiation 151</i> )
<b>COL17A1</b>	Gene codificador do colágeno tipo XVII
<b>COL7A1</b>	Gene codificador do colágeno tipo VII
<b>DDEB</b>	Dominant Dystrophic Epidermolysis Bullosa
<b>DEB</b>	Dystrophic Epidermolysis Bullosa
<b>Debra</b>	Associação de epidermólise bolhosa do Brasil
<b>DSP</b>	Gene codificador da desmoplaquina
<b>DST</b>	Gene codificador da distonina
<b>EB</b>	Epidermólise Bolhosa ( <i>Epidermolysis Bullosa</i> )
<b>EBA</b>	Epidermólise Bolhosa Adquirida
<b>EBD</b>	Epidermólise Bolhosa Distrófica
<b>EBDD</b>	Epidermólise Bolhosa Distrófica Dominante
<b>EBDR</b>	Epidermólise Bolhosa Distrófica Recessiva
<b>EBDR-loc</b>	Epidermólise Bolhosa Distrófica Recessiva - localizada
<b>EBJ</b>	Epidermólise Bolhosa Juncional
<b>EBS</b>	Epidermólise Bolhosa Simples ( <i>Epidermolysis Bullosa Simplex</i> )
<b>EBK</b>	Epidermólise Bolhosa Kindler
<b>EXPH5</b>	Gene codificador da exofilina 5
<b>FERMT1</b>	Gene codificador do homólogo 1 da família fermitina
<b>HIP</b>	<i>Helix Initiation Motif</i> (Motivo de iniciação da hélice)
<b>HTP</b>	<i>Helix Termination Peptides</i> (Peptídeos de terminação da hélice)
<b>IFM</b>	<i>Immunofluorescence Mapping</i> (mapeamento por imunofluorescência)
<b>ITGA3</b>	Gene codificador da integrina subunidade alfa-3
<b>ITGA6</b>	Gene codificador da integrina subunidade alfa-6
<b>ITGB4</b>	Gene codificador da integrina subunidade beta-4



<b>JEB</b>	Junctional Epidermolysis Bullosa
<b>K5</b>	Queratina 5
<b>K14</b>	Queratina 14
<b>KLHL24</b>	Gene codificador da proteína Kelch-like 24
<b>KRT5</b>	Gene codificador da queratina 5
<b>KRT14</b>	Gene codificador da queratina 14
<b>JUP</b>	Gene codificador da placoglobina
<b>LAMA3</b>	Gene codificador da subunidade alfa-3 da laminina-332
<b>LAMB3</b>	Gene codificador da subunidade beta-3 da laminina-332
<b>LAMC2</b>	Gene codificador da subunidade gama-2 da laminina-332
<b>MIF</b>	Mapeamento por Imunofluorescência
<b>MET</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<b>NGS</b>	<i>Next-Generation Sequencing</i> (sequenciamento de nova geração)
<b>PLEC</b>	Gene codificador da plectina
<b>PKP1</b>	Gene codificador da placofilina-1
<b>RDEB</b>	Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse Transcriptase</i> -PCR (transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase)
<b>SK</b>	Síndrome de Kindler
<b>TEM</b>	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (microscopia eletrônica de transmissão)
<b>TGM5</b>	Gene codificador da transglutaminase 5
<b>THD</b>	<i>Triple-Helix Domain</i> (domínio de tripla hélice do colágeno tipo VII)
<b>ZMB</b>	Zona da Membrana Basal

## **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

---

### **Lista de Figuras**

<b>Figura 1</b>	Estrutura e organização das camadas da pele .....	19
<b>Figura 2</b>	Representação da zona da membrana basal, seus componentes e interações .....	22
<b>Figura 3</b>	Representação das camadas da pele associadas aos diferentes tipos de epidermólise bolhosa (EB) .....	24
<b>Figura 4</b>	Campanha de conscientização sobre epidermólise bolhosa, desenvolvida pela Debra-Internacional .....	26
<b>Figura 5</b>	Subtipos clínicos principais da epidermólise bolhosa simples (EBS). .....	29
<b>Figura 6</b>	Representação dos complexos e proteínas associadas aos diferentes subtipos de epidermólise bolhosa simples (EBS) .....	32
<b>Figura 7</b>	(A) Representação esquemática da rede de filamentos intermediários de queratina. (B) Organização dos domínios das queratinas.....	33
<b>Figura 8</b>	Subtipos clínicos principais da epidermólise bolhosa junctional (EBJ). .....	39
<b>Figura 9</b>	Representação das principais estruturas envolvidas na adesão das camadas da pele .....	40
<b>Figura 10</b>	Subtipos clínicos principais da epidermólise bolhosa distrófica (EBD).....	45
<b>Figura 11</b>	Estrutura do colágeno tipo VII .....	48
<b>Figura 12</b>	Representação da síntese dos polipeptídeos de colágeno pro- $\alpha$ 1(VII) e sua montagem em fibrilas de ancoragem sob condições fisiológicas e alterações nesses processos que levam às formas distróficas de epidermólise bolhosa .....	49
<b>Figura 13</b>	Representação esquemática dos componentes e complexos responsáveis pela integridade da adesão célula-célula dos queratinócitos e pela associação da epiderme à derme através da zona da membrana basal .....	55

### **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1</b>	Subtipos clínicos da epidermólise bolhosa simples (EBS).....	28
<b>Tabela 2</b>	Subtipos clínicos da epidermólise bolhosa junctional (EBJ).....	36
<b>Tabela 3</b>	Subtipos clínicos da epidermólise bolhosa distrófica (EBD) .....	43
<b>Tabela 4</b>	Outras desordens de fragilidade da pele .....	53

## RESUMO

---

A epidermólise bolhosa (EB) hereditária compreende um grupo de doenças genéticas caracterizadas por fragilidade cutânea e formação de bolhas na pele e membranas mucosas em resposta a trauma mínimo. A EB é clínica e geneticamente heterogênea, sendo classificada em quatro tipos principais de acordo com a camada da pele na qual ocorre a formação de bolhas: EB simples (EBS; intraepidérmica), EB juncional (EBJ; dentro da lâmina lúcida da membrana basal), EB distrófica (EBD; abaixo da membrana basal) e Síndrome de Kindler (padrão misto de clivagem da pele). Além disso, a EB é subclassificada em diversos subtipos, que levam em consideração as características clínicas, a distribuição das bolhas e a gravidade dos sinais cutâneos e extra cutâneos. Variantes patogênicas em ao menos 16 genes, que codificam proteínas essenciais para integridade e adesão das camadas da pele, já foram associadas aos distintos subtipos de EB. Dada a escassez de estudos genéticos sobre esta doença no Brasil, o objetivo desse trabalho foi realizar uma caracterização genética e clínica de pacientes com EB do Brasil, visando contribuir para a melhor compreensão das bases moleculares associadas. Mais ainda, a identificação de variantes prevalentes tem importante implicação para definição de prioridades em testes genéticos futuros.

Um total de 109 pacientes, sendo 87 casos índice (25 do subtipo EBS, 4 EBJ e 58 EBD) e 22 familiares afetados (10 EBS, 1 EBJ, 11 EBD) foram incluídos no estudo. Um painel de genes baseado em sequenciamento de nova geração foi desenvolvido para a análise genética dos pacientes e incluiu os 11 genes principais associados à EB (*KRT5*, *KRT14*, *PLEC*, *TGM5*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *COL7A1* e *FERMT1*). A caracterização das variantes patogênicas da amostra estudada indicou um total de 72 variantes distintas, sendo 32 novas. Entre as variantes recorrentes, duas substituições que afetam o mesmo resíduo da queratina 14 (p.Arg125Cys e p.Arg125His) estiveram presentes em 32% dos casos de EBS. Com relação aos casos de EBD, quatro variantes no gene do colágeno tipo VII (p.Arg1683Ter, c.325\_326insCG, c.7380+2T>C e c.1758del) apresentaram alta frequência, representando 34,9% de todos os alelos do gene *COL7A1*.

A ausência congênita de pele é um sinal clínico raro associado aos principais subtipos de EB. Na amostra analisada, foram identificados 26 pacientes que nasceram com essa condição clínica, indicando que a ausência congênita de pele pode ser um sinal clínico mais

frequente do que anteriormente sugerido. A análise de possíveis correlações genótipo-fenótipo em 23 desses pacientes corroborou hipótese prévia de uma influência de variantes próximas às interrupções do domínio de tripla hélice do colágeno tipo VII à ocorrência desse fenômeno em EBD. Além disso, foi realizada uma extensa revisão de casos previamente descritos na literatura sobre EB com ausência de pele congênita, o que caracterizou, ao que sabemos, a maior revisão acerca dessa condição.

Entre os diversos subtipos de EB existe uma significativa sobreposição entre os sinais clínicos de algumas formas da doença, o que dificulta o diagnóstico baseado apenas na avaliação clínica. Considerando essa problemática, foi realizada uma comparação entre a hipótese clínica inicial e o resultado genético definitivo dos pacientes com EB incluídos nesse estudo. Para 42,1% dos casos, o resultado genético foi essencial para o diagnóstico do subtipo de EB, demonstrando que a avaliação clínica não resolve todos os casos da doença, mesmo se realizada por especialistas. Ademais, foi encontrada elevada frequência de variantes de *splicing* em indivíduos com formas leves de EBD recessiva. É possível que tais variantes estejam naturalmente associadas a *in-frame exon-skipping*, um mecanismo que gera a exclusão completa de um éxon sem causar alteração no restante da proteína formada. Esse mecanismo vem sendo estudado como potencial terapia para casos graves de EB.

Historicamente, o diagnóstico de EB é realizado por mapeamento de imunofluorescência (MIF) ou microscopia eletrônica de transmissão (MET). No Brasil, no entanto, o acesso aos métodos de diagnóstico é limitado e, conseqüentemente, muitos pacientes não têm diagnóstico preciso do tipo de EB associado. Dada a alta eficiência de diagnóstico do painel de genes desenvolvido (94,3%), foi realizada uma avaliação do custo-benefício do método proposto em comparação às técnicas de MIF e MET, analisando benefícios e limitações e aspectos econômicos envolvidos. Ainda que os métodos de MIF e MET tenham precisão diagnóstica, eles não indicam o modo de herança genética, dependem da experiência do analista e exigem biópsia de pele. O painel de genes desenvolvido apresenta alta eficiência diagnóstica, dispensa a necessidade de biópsia de pele e possibilita o prognóstico, o diagnóstico genético pré-natal e pré-implantacional, e o aconselhamento genético. Os resultados da avaliação apoiam o painel de genes como método de primeira escolha para o diagnóstico de EB no Brasil.

Em conclusão, o presente trabalho descreveu, pela primeira vez, as bases genéticas de uma grande amostra brasileira de EB, expandiu o espectro de variantes patogênicas

conhecidas, explorou potenciais correlações genótipo-fenótipo em sinais clínicos e variantes genéticas específicas, e apresentou um método viável e eficiente para o diagnóstico da doença. As descobertas aqui apresentadas serão importantes para a melhor compreensão do complexo *background* molecular existente na EB. Esse estudo tem importantes implicações para o diagnóstico genético dos pacientes, para o aconselhamento genético e para futuros estudos em terapias moleculares para EB.

## ABSTRACT

---

Inherited epidermolysis bullosa (EB) comprises a group of genetic disorders characterized by skin fragility and blistering of the skin and mucous membranes in response to minimal trauma. EB is clinically and genetically heterogeneous, and is classified in four main types according to the level of skin within which blisters develop: EB simplex (EBS; intraepidermal), junctional EB (JEB; within the lamina lucida of the basement membrane), dystrophic EB (DEB; below the basement membrane) and Kindler syndrome (mixed pattern of blistering). Additionally, EB is subclassified in a diversity of subtypes that takes into account the clinical features involved, the distribution of blisters and the severity of cutaneous and extracutaneous signs. Pathogenic variants in at least 16 genes, which encode proteins essential for skin integrity and adhesion, have been associated to the distinct EB subtypes. Given the scarcity of genetic studies about this disease in Brazil, the objective of this work was to perform a genetic and clinical characterization of patients with EB from Brazil, aiming to contribute to a better understanding of the molecular bases associated. Moreover, the identification of recurrent variants has important implication for management of priorities in future genetic tests.

A total of 109 patients, being 87 index cases (25 EBS, 4 JEB, 58 DEB) and 22 affected family members (10 EBS, 1 JEB, 11 DEB) were included in this study. A next-generation sequencing-based gene panel was designed for the genetic analysis and included the 11 main genes associated with EB (*KRT5*, *KRT14*, *PLEC*, *TGM5*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *COL7A1* and *FERMT1*). The characterization of the pathogenic variants in the studied sample indicated a total of 72 distinct variants, 32 of them novel. Among the recurrent variants, two substitutions affecting the same residue of keratin 14 (p.Arg125Cys and p.Arg125His) were present in 32% of all EBS cases. In DEB, four variants in type VII collagen gene (p.Arg1683Ter, c.325\_326insCG, c.7380+2T>C, c.1758del) showed a high frequency, representing 34.9% of all *COL7A1* alleles.

Congenital absence of skin is a rare clinical sign associated with the main EB subtypes. In the studied sample, 26 patients presenting this clinical condition were identified, indicating that the congenital absence of skin may be a clinical sign more frequent than previously suggested. The analysis of possible genotype-phenotype correlations in 23 of these patients corroborated the previous hypothesis suggesting an influence of variants

occurring near triple-helix domain interruptions to the occurrence of this phenomenon in DEB. In addition, an extensive literature revision about EB with congenital absence of skin was performed, which characterized, to the best of our knowledge, the largest review on this condition.

Among the various EB subtypes, there is a marked overlapping of clinical signs in distinct forms of the disease, making it difficult the diagnosis based only on the clinical evaluation. Considering that, we performed a comparison between the initial clinical hypothesis and the definitive genetic result of the EB patients included in this study. For 42.1% of cases, the genetic result was essential for the diagnosis of the EB subtype, demonstrating that the clinical exam does not solve all cases, even when performed by experts. Moreover, a high frequency of splicing variants was observed in patients with mild forms of recessive DEB. It is possible that these variants are naturally associated with *in-frame exon-skipping*, a mechanism that leads to the complete absence of an entire exon, but with no change in the rest of the protein formed. This mechanism is the focus of studies on potential therapies for severe cases of EB.

Historically, EB diagnosis is achieved by immunofluorescence mapping (IFM) or transmission electron microscopy (TEM). In Brazil, however, access to EB diagnostic methods is limited, and consequently, most patients do not have an accurate diagnosis. Given the high diagnostic efficiency of the designed gene panel (94.3%), a cost-benefit assessment was performed to compare the proposed method in contrast to IFM and TEM techniques by analyzing its benefits, limitations and the economic aspects involved. Although both IFM and TEM present diagnostic accuracy, they do not indicate the mode of genetic inheritance, they are dependent on the investigator's expertise and they also require skin biopsy. The designed gene panel presents high diagnostic efficiency, excludes the need for biopsy, and allows for prognosis, prenatal or preimplantation genetic diagnosis, and genetic counseling. The results of the comparison study support the gene panel as the first-choice method for EB diagnosis in Brazil.

In conclusion, the present work described, for the first time, the genetic bases from a large Brazilian sample, extended the spectrum of known pathogenic variants, explored possible genotype-phenotype correlations in clinical signs and specific genetic variants, and presented a feasible and efficient method for EB diagnosis. The findings here shown will be

important for a better understanding of the complex molecular background underlying EB. This study has important implications for the genetic diagnosis of patients, for the genetic counseling and for future studies on molecular therapies for EB.



## **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO**

---

## **1. Estrutura e Organização da Pele Humana**

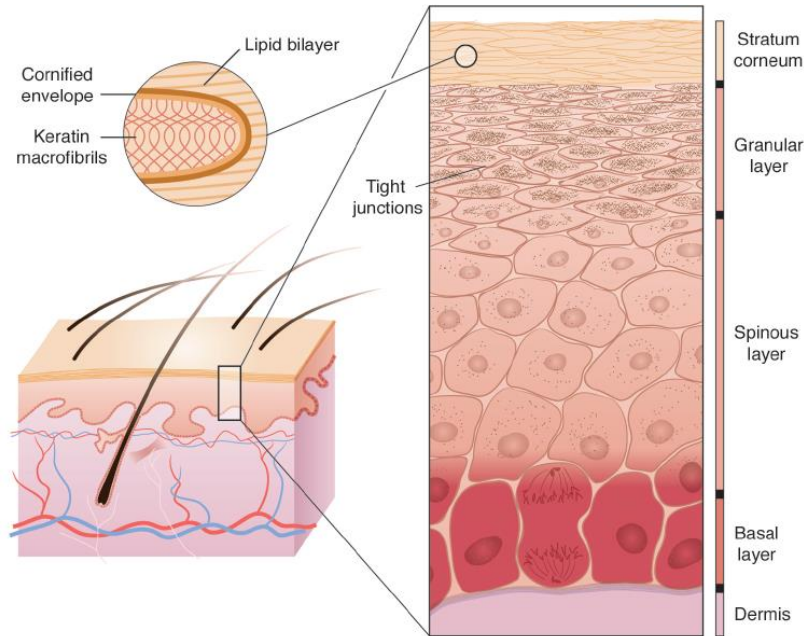
A pele humana é organizada em duas camadas principais, a epiderme, formada de células estratificadas, e a derme, presente em um nível subjacente, formada por tecido conjuntivo. Abaixo da derme há uma camada de gordura subcutânea, também denominada hipoderme. A pele é o maior órgão do corpo humano, pesando cerca de 5 kg e cobrindo uma área de aproximadamente 2 m<sup>2</sup>, considerando-se um indivíduo de 70 kg (McGrath e Uitto, 2010). Ela atua como um envelope para o corpo, desenvolvendo funções essenciais de homeostase, termorregulação e proteção contra patógenos, impactos mecânicos e outros agentes externos, tais como radiação ultravioleta e agentes químicos. Além disso, a pele tem importantes funções imunológicas, endocrinológicas e sensoriais (McGrath e Uitto, 2010; Wong *et al.*, 2016; Abdallah *et al.*, 2017).

A estrutura cutânea é organizada dinamicamente de forma a minimizar a tensão através do tecido, permitindo o alongamento e a compressão da pele em diferentes direções quando tracionada por movimentos ou forças externas (Wong *et al.*, 2016). Uma rede composta de inúmeras proteínas atua dentre as camadas cutâneas, permitindo a fixação estável da epiderme à derme e fornecendo, ao mesmo tempo, flexibilidade e rigidez à pele (Has *et al.*, 2018b). Alterações que levam à ausência de uma dessas proteínas ou à ruptura de interações proteína-proteína essenciais, resultam em perturbação da organização estrutural da pele e em consequente fragilidade cutânea (Has *et al.*, 2018b).

### **1.1. Epiderme**

A epiderme é a camada mais externa da pele, constituída principalmente de queratinócitos, que se organizam em quatro camadas distintas de acordo com a direção da diferenciação celular: camada basal, espinhosa, granular e córnea (Figura 1) (Segre, 2006; McGrath e Uitto, 2010; Khani *et al.*, 2018). Ao final da diferenciação, os queratinócitos assumem um formato achatado e uma organização linear que remete a uma parede de tijolos, estruturada graças à presença de um citoesqueleto formado por uma rede de filamentos intermediários de queratina (McGrath e Uitto, 2010). Essa rede exerce importante papel na manutenção da integridade da epiderme, sendo a grande responsável por suportar tensões e estresses ambientais (Khani *et al.*, 2018). Um balanço dinâmico e coordenado entre os processos de proliferação, regeneração, diferenciação e descarte dos queratinócitos é

essencial para a manutenção dessas funções, o que também aponta para um papel importante das adesões célula-célula e célula-matriz (Has e Bruckner-Tuderman, 2014).



**Figura 1. Estrutura e organização das camadas da pele.** Esquema apresentando os estágios da diferenciação dos queratinócitos na camada epidérmica. Fonte: Segre (2006).

A adesão célula-célula dos queratinócitos é realizada por diferentes componentes, como os desmossomos, as junções aderentes, as junções comunicantes (*gap*) e as junções compactas (ou zônula oclusiva). Em cada um desses complexos, diferentes proteínas atuam de modo a regular a montagem dos componentes celulares e a permitir a ligação ao citoesqueleto de queratinas, destacando-se as proteínas caderinas, desmoplaquinas, placoglobinas e placofilinas. Uma vez que as interações entre as proteínas ocorrem de forma altamente coordenada para assegurar a adesão célula-célula, é de se esperar que alterações genéticas que alterem a estrutura ou função dessas proteínas resultem em fragilidade da epiderme (Has e Bruckner-Tuderman, 2014).

## 1.2. Derme

A derme é a camada mais espessa da pele e se localiza abaixo da epiderme, sendo constituída de células, nervos, vasos, glândulas e outros apêndices, em meio a uma matriz

extracelular. A derme é formada por dois componentes proteicos principais, o colágeno e a elastina. O colágeno é a principal proteína da matriz extracelular, representando 80 a 85% do peso líquido da derme. As fibras de elastina, por sua vez, constituem não mais do que 2-4% da matriz extracelular da derme e conferem elasticidade à pele (McGrath e Uitto, 2010; Losquadro, 2017). A derme também é composta por outras glicoproteínas como as fibronectinas, fibulinas e integrinas, componentes da matriz extracelular que facilitam a adesão e a motilidade celular (McGrath e Uitto, 2010).

O colágeno, principal componente da matriz extracelular, constitui uma superfamília de 29 proteínas distintas (Chung e Uitto, 2010). As moléculas de colágeno são formadas por três subunidades de polipeptídeos, designadas como cadeias- $\alpha$ , que se formam como um homotrímero (quando as subunidades são iguais) ou heterotrímero (subunidades diferentes) (Myllyharju e Kivirikko, 2004). Uma característica estrutural comum às moléculas de colágeno é a presença de um domínio de conformação de tripla hélice, que as fornece a estabilidade necessária para dar integridade aos tecidos conectivos. O dobramento das cadeias- $\alpha$  na conformação de tripla hélice ocorre graças à sequência primária, que é constituída de múltiplas repetições de três aminoácidos Glicina-X-Y (*Gly-X-Y*), nos quais X e Y podem ser qualquer aminoácido (Chung e Uitto, 2010). Um total de 29 diferentes tipos de colágenos já foram identificados em tecidos humanos, dos quais pelos menos 12 são expressos na pele (McGrath e Uitto, 2010). Os principais colágenos da pele humana são os do tipo I e III, que formam as grandes fibras extracelulares características da derme humana, e os do tipo IV e V que constituem, respectivamente, a junção derme-epiderme e a superfície dos órgãos internos. A derme ainda apresenta outros colágenos, que se restringem a localizações específicas, como o colágeno VII, que é o principal componente das fibrilas de ancoragem (Sakai *et al.*, 1986; Chung e Uitto, 2010; McGrath e Uitto, 2010).

### **1.3. Zona da Membrana Basal**

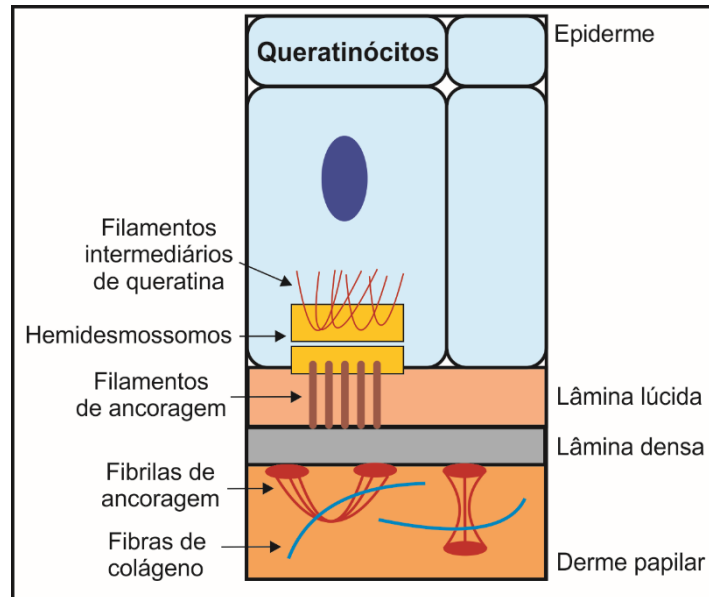
A interface entre a porção inferior da epiderme e a camada superior da derme compreende a zona da membrana basal (ZMB), uma complexa estrutura de macromoléculas que se entrelaçam, fortalecendo a adesão derme-epiderme e, assim, mantendo a integridade da pele (Fine *et al.*, 1991; McGrath e Uitto, 2010). A ZMB é composta de uma camada superior, conhecida como lâmina lúcida, que se conecta diretamente com os queratinócitos

basais, e uma porção inferior, chamada de lâmina densa, que interage com a matriz mesenquimal da camada superior da derme (Figura 2) (Fuchs, 2007; McGrath e Uitto, 2010).

Associados à ZMB, diversos componentes macromoleculares atuam como complexos de adesão, formando uma rede que se estende do meio intracelular dos queratinócitos basais em direção ao meio extracelular, atravessando a membrana basal derme-epiderme e alcançando a porção superior da derme (McGrath e Uitto, 2010; Has *et al.*, 2018b). Os componentes dessa rede são os hemidesmossomos, os filamentos de ancoragem e as fibrilas de ancoragem (Figura 2).

O hemidesmossomo consiste em um complexo de proteínas que se estende do meio intracelular dos queratinócitos basais em direção ao espaço extracelular e, assim, promove a fixação da epiderme à membrana basal subjacente (de Pereda *et al.*, 2009a; Has *et al.*, 2018b). Os componentes dos hemidesmossomos incluem proteínas transmembranas como o colágeno tipo XVII, a integrina  $\alpha 6\beta 4$  e a tetraspanina CD151, bem como as proteínas intracelulares plectina e uma isoforma do antígeno penfigoide bolhoso 1 (BP230) (Sonnenberg *et al.*, 1991; McGrath e Uitto, 2010; Has *et al.*, 2018b). A porção superior do complexo hemidesmossomal, designada por alguns autores como placa interna, interage com filamentos intermediários de queratina, constituídos das queratinas 5 e 14, via ligação de BP230 e plectina. No espaço extracelular, a porção inferior do complexo, ou placa hemidesmossomal externa, se conecta aos filamentos de ancoragem, constituídos da proteína laminina-332, dentro da lâmina lúcida da membrana basal (Uitto e Christiano, 1992; McGrath e Uitto, 2010; Has *et al.*, 2018b). Já na região da derme, as fibrilas de ancoragem, constituídas por colágeno VII, formam estruturas em forma de U, nas quais suas extremidades interagem com a lâmina densa e estabilizam a ligação da membrana basal à derme subjacente (Figura 2) (Villone *et al.*, 2008; Chung e Uitto, 2010; Has *et al.*, 2018b).

Dessa forma, há uma complexa rede de proteínas que atravessam a zona da membrana basal cujas interações são essenciais para a estabilidade da adesão derme-epiderme. Alterações em qualquer um desses componentes levam a perturbações das interações proteína-proteína, consequentemente resultando em vários níveis de fragilidade da pele e fenótipos distintos (Uitto e Christiano, 1992; Has *et al.*, 2018b). A integridade dos complexos proteicos e a sua correta estrutura e organização na matriz extracelular são essenciais para a atividade fisiológica normal da pele (Has *et al.*, 2018b).



**Figura 2. Representação da zona da membrana basal, seus componentes e interações.** Os complexos de adesão hemidesmossomos, filamentos de ancoragem e fibrilas de ancoragem têm papel essencial para a estável associação dos queratinócitos basais na epiderme à zona da membrana basal e para a ligação da lâmina densa à porção superior da derme (derme papilar). As proteínas responsáveis pela adesão derme-epiderme e os complexos adicionais envolvidos no processo serão apresentados em figuras mais detalhadas subsequentemente.

## 2. Epidermólise Bolhosa

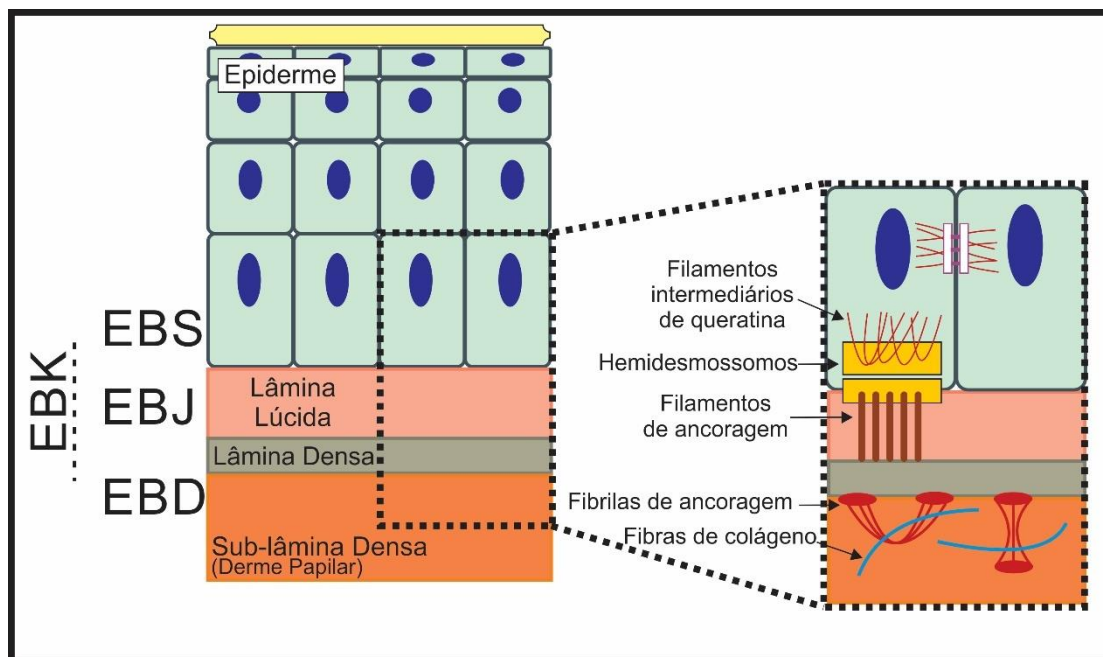
A epidermólise bolhosa (EB) hereditária compreende um grupo de doenças genéticas associadas à fragilidade cutânea, a qual leva à formação de bolhas, erosões e cicatrizes na pele e em mucosas em resposta a mínimos traumas mecânicos (Has e Fischer, 2019). A EB é clínica e geneticamente muito heterogênea, compreendendo fenótipos com níveis contrastantes de gravidade e envolvendo alterações em, pelo menos, 16 genes diferentes (Has *et al.*, 2020). Dada tal heterogeneidade, a EB é classificada em quatro tipos principais e, ainda, em diversos subtipos clínicos. A classificação principal se relaciona à camada da pele na qual ocorre a formação de bolhas: EB Simples (EBS; camada intraepidérmica), EB Juncional (EBJ; dentro da lâmina lúcida da membrana basal), EB Distrófica (EBD; abaixo da membrana basal) e EB Kindler (EBK; padrão misto de clivagem da pele) (Fine *et al.*, 2014; Has e Fischer, 2019; Has *et al.*, 2020).

Outras desordens envolvendo a fragilidade da pele, mas cuja presença de bolhas é apenas uma parte mínima do quadro clínico ou cuja clivagem da pele ocorre de forma muito superficial, são classificadas em categorias separadas (Has *et al.*, 2020). Entre elas,

destacam-se as desordens de descamação da pele, as erosivas, as hiperkeratóticas e as do tecido conectivo com fragilidade da pele (Has *et al.*, 2020). Até a mais recente reclassificação dos tipos de EB, publicada em 2020, muitas dessas desordens eram antes consideradas subtipos de EB (Fine *et al.*, 2014; Has *et al.*, 2020). Cabe destacar, também, a existência de uma forma distinta da EB hereditária, que é conhecida como epidermólise bolhosa adquirida (EBA), que não será foco do presente estudo. A EBA é uma doença bolhosa autoimune rara, que pode se manifestar em qualquer idade e que resulta na formação de vesículas e bolhas na pele e em membranas mucosas (Kridin *et al.*, 2019).

Os dados epidemiológicos acerca da incidência e prevalência da EB no mundo são bastante variáveis entre os estudos. Um dos principais grupos de pesquisa em EB, em uma amostra de 3.271 pacientes com EB dos Estados Unidos, estimou a incidência (entre os anos de 1986-2002) e a prevalência (ano de 2002) da doença no país em 19,57 e 11,07 por um milhão de indivíduos, respectivamente (Fine, 2016). No Brasil não há estudos epidemiológicos sobre a EB, entretanto, a Debra-Brasil (associação de apoio a pacientes com EB do Brasil) apresenta registro de mais de 900 pacientes no país (dados não publicados).

Os genes associados à EB codificam proteínas com funções estruturais na epiderme, na zona da membrana basal ou na porção superior da derme, sendo importantes para a integridade da pele e para a adesão derme-epiderme (Has e Bruckner-Tuderman, 2014). Dessa forma, alterações genéticas que alteram a dinâmica e função dessas proteínas resultam em falha das estruturas que conferem estabilidade mecânica à epiderme (como o citoesqueleto de queratina e os desmossomos) e à zona da membrana basal (como os hemidesmossomos, as adesões focais, os filamentos de ancoragem e as fibrilas de ancoragem) (Figura 3) (Has *et al.*, 2019). A camada na qual as bolhas se desenvolvem nos diferentes tipos de EB está correlacionada à localização da proteína alterada na estrutura da pele.



**Figura 3. Representação das camadas da pele associadas aos diferentes tipos de epidermólise bolhosa (EB).** Na epiderme, os queratinócitos estão retratados. A epiderme é anexada à derme pela membrana basal, formada pela lâmina lúcida e lâmina densa. Ao lado esquerdo da figura é apresentado o tipo principal de EB próximo à respectiva camada da pele na qual ocorre a formação das bolhas. A clivagem na EB simples (EBS) ocorre dentro dos queratinócitos basais, na EB juncional (EBJ) dentro da lâmina lúcida e na EB distrófica (EBD) ocorre na sublâmina densa, na porção superior da derme (derme papilar). Na EB Kindler (EBK), a clivagem pode ocorrer nos queratinócitos basais, na lâmina lúcida ou abaixo da lâmina densa. Ao lado direito da figura são apresentados os principais complexos de adesão das camadas da pele que estão associados aos subtipos de EB, conforme mostrado na figura anterior.

O fenótipo característico das diferentes formas da EB está correlacionado ao gene que está alterado. Por outro lado, diferentes genes também levam a fenótipos muito similares de EB, o que adiciona complexidade ao entendimento dos mecanismos patogênicos associados (Fine *et al.*, 2014). Além da associação de determinados genes com fenótipos específicos, estudos têm demonstrado a existência de certa correlação genótipo-fenótipo com variantes distintas de um mesmo gene. Tais resultados apontam que a natureza e a posição da variante patogênica, bem como a sua consequência a nível de mRNA e proteína, estão correlacionados às manifestações clínicas da doença (Dang e Murrell, 2008; Arin *et al.*, 2010; Kiritsi *et al.*, 2013a). A expressividade fenotípica na EB é altamente variável, não apenas entre os diferentes subtipos, mas também dentro de cada um deles. O espectro da EB inclui pacientes com discretos sinais cutâneos, muitas vezes quase imperceptíveis, até pacientes que apresentam lesões cutâneas e extracutâneas graves, causadas por sério acometimento da adesão derme-epiderme (Bruckner-Tuderman e Has, 2012).



O principal sinal clínico da EB é a formação de bolhas na pele nos locais de trauma mecânico. Dependendo da camada de clivagem da pele, as bolhas podem ser mais superficiais e resultar em erosões, como no caso da EBS, ou podem ser mais profundas e levar a ulcerações, como nos casos da EBJ, EBD e EBK. A distribuição das bolhas pode se dar de forma localizada nas extremidades ou generalizada, afetando diferentes locais do corpo. As lesões na pele podem se tornar crônicas quando o trauma mecânico é permanente ou recorrente. As membranas das mucosas oral, esofágica, traqueal, geniturinária e ocular também podem ser afetadas por erosões, úlceras e cicatrizes. Em subtipos específicos de EB, alterações em unhas e cabelos também podem ocorrer (Fine *et al.*, 2014; Has *et al.*, 2019). A cicatrização progressiva pode resultar em contraturas e/ou mutilações das extremidades, microstomia e estenose esofágica, características comuns em casos mais graves de EBD e EBK. Subtipos específicos de EB associados a fenótipos graves podem apresentar envolvimento de outros órgãos e sistemas, tais como osteoporose, contraturas articulares, cardiomiopatia, amiloidose renal, atraso no crescimento, entre outros (Fine *et al.*, 2014; Has *et al.*, 2019).

A Debra-Internacional, associação de apoio a pacientes com EB do mundo todo, realiza campanhas para divulgação de conhecimento e conscientização acerca da doença, visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes e promover o desenvolvimento de pesquisas e tratamentos para EB. A Figura 4 apresenta imagens da campanha realizada pela Debra, distribuída em diferentes países, voltada à reflexão sobre como vivem os pacientes com as formas graves de EB, os quais convivem com uma dor crônica que é causada pelo mais suave contato com objetos comuns do dia a dia (Figura 4).



**Figura 4. Campanha de conscientização sobre epidermólise bolhosa, desenvolvida pela Debra-Internacional.** Versão em português intitulada: “Assim é como se sentem aqueles que vivem com EB”. Objetos comuns do dia a dia são apresentados com partes cortantes, a fim de conscientizar acerca da fragilidade da pele dos pacientes com EB e de como a sua rotina pode ser de constante dor. Fonte: Debra ([www.debra-international.org](http://www.debra-international.org)).

## 2.1. Critérios de Classificação da Epidermólise Bolhosa

A classificação da EB é deveras complexa, uma vez que compreende uma gama de fenótipos com variáveis níveis de gravidade, associados a alterações em um número significativo de genes. Dessa forma, pesquisadores especialistas em EB realizam periodicamente reuniões internacionais para elaborar e atualizar uma classificação consensual para EB. A classificação mais atualizada, publicada em 2020 (Has *et al.*, 2020), indicou um total de 34 subtipos distintos de EB (14 EBS, 9 EBJ e 11 EBD), que levam em consideração a camada da pele em que a clivagem ocorreu, as características fenotípicas (como a distribuição e gravidade das bolhas e a presença de características cutâneas e extracutâneas específicas), o padrão de herança genético, a expressão da proteína alterada e a alteração genética. Nas próximas seções, os principais tipos e subtipos de EB serão apresentados, com destaque às características clínicas e às bases genéticas que constituem as diferentes formas da doença.

## **2.2. Epidermólise Bolhosa Simples**

A epidermólise bolhosa simples (EBS) é caracterizada por clivagem e formação de bolhas no nível epidérmico da pele, estando associada a fenótipos com variável espectro de gravidade (Arin, 2009; Coulombe *et al.*, 2009). A EBS apresenta um complexo background genético, estando associada a alterações em pelo menos 7 genes diferentes e, comparativamente aos demais tipos principais de EB, é a que apresenta a maior diversidade de subtipos clínicos, incluindo pelo menos 14 subtipos distintos (Fine *et al.*, 2014; Has e Fischer, 2019; Has *et al.*, 2019; Has *et al.*, 2020). A maior parte dos casos de EBS é herdada de maneira autossômica dominante, embora a herança autossômica recessiva seja mais comum em algumas regiões do mundo (Has *et al.*, 2020).

Dados epidemiológicos mostram que a EBS é a que apresenta a maior incidência e prevalência em comparação aos demais tipos principais de EB, respectivamente 7,87 e 6,0 por 1 milhão de indivíduos, considerando uma amostra dos Estados Unidos (Fine, 2016). A forma localizada da doença, que inclui fenótipos mais brandos, é o subtipo mais comum de EBS (prevalência de 3,9/1 milhão) (Fine, 2016). Uma vez que a EBS está frequentemente associada a fenótipos clínicos mais leves, é possível que exista um subdiagnóstico da doença e que, conseqüentemente, a prevalência desse tipo de EB seja ainda mais elevada.

### **2.2.1. Subtipos Clínicos da Epidermólise Bolhosa Simples**

A EBS é o tipo de EB que compreende o maior número de subgrupos clínicos distintos. Na última classificação proposta por Has *et al.* (2020), os autores apresentaram um total de 14 subtipos de EBS associados a 7 genes diferentes. A Tabela 1 traz a classificação dos subtipos de EBS, destacando o gene e a proteína alterados, bem como o padrão de herança.

**Tabela 1. Subtipos clínicos da epidermólise bolhosa simples (EBS).**

<b>Tipo Principal (padrão de herança)</b>	<b>Subtipos de EBS</b>	<b>Gene (proteína)</b>
<b>EBS (autossômica dominante)</b>	<b>EBS, localizada</b>	<i>KRT5</i> (queratina 5 - K5) <i>KRT14</i> (queratina 14 - K14)
	<b>EBS, intermediária</b>	<i>KRT5</i> (queratina 5 - K5) <i>KRT14</i> (queratina 14 - K14)
	<b>EBS, grave</b>	<i>KRT5</i> (queratina 5 - K5) <i>KRT14</i> (queratina 14 - K14)
	EBS com pigmentação moteada	<i>KRT5</i> (queratina 5 - K5)
	EBS, circinado migratório	<i>KRT5</i> (queratina 5 - K5)
	EBS, intermediária	<i>PLEC</i> (plectina)
	EBS, intermediária com cardiomiopatia*	<i>KLHL24</i> (Kelch-like 24)
<b>EBS (autossômica recessiva)</b>	<b>EBS, intermediária ou grave</b>	<i>KRT5</i> (queratina 5 - K5) <i>KRT14</i> (queratina 14 - K14)
	EBS, intermediária	<i>PLEC</i> (plectina)
	EBS, localizada ou intermediária com deficiência de BP230	<i>DST</i> (antígeno penfigoide bolhoso 1 - BP230 <sup>a</sup> )
	EBS, localizada ou intermediária com deficiência de exofilina-5	<i>EXPH5</i> (exofilina-5 <sup>b</sup> )
	EBS, intermediária com distrofia muscular*	<i>PLEC</i> (plectina)
	EBS, grave com atresia pilórica*	<i>PLEC</i> (plectina)
	EBS, localizada com nefropatia*	<i>CD151</i> (antígeno CD151 <sup>c</sup> )

Tabela modificada a partir da classificação de Has *et al.* (2020).

Em negrito estão os três subtipos mais prevalentes de EBS.

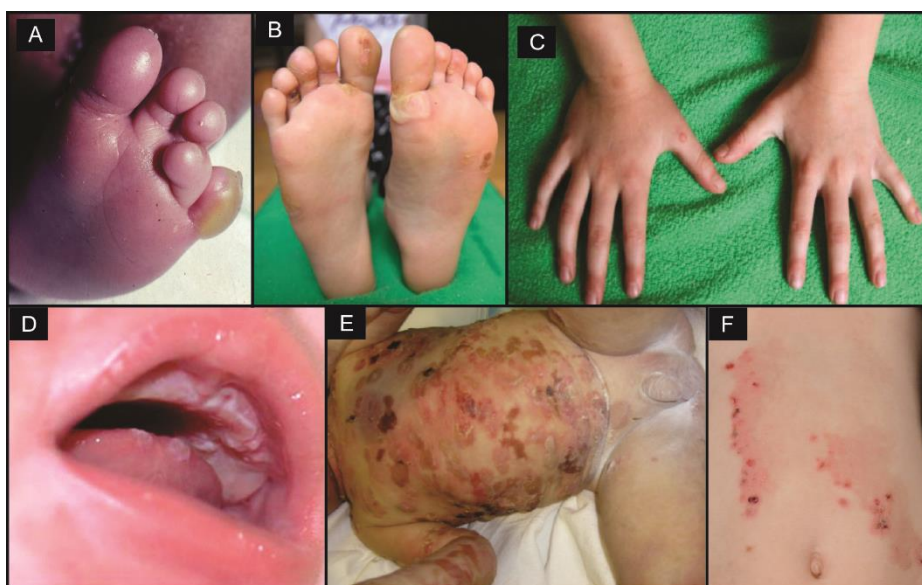
\* Subtipos de EBS síndrômicos.

<sup>a</sup> BP230, BPAG1e e distonina são sinônimos. <sup>b</sup> Exofilina-5 e Slac2-b são sinônimos. <sup>c</sup> Antígeno CD151 e tetraspanina 24 são sinônimos.

As formas localizada, intermediária e grave são as mais frequentes na EBS, apresentando juntas uma prevalência de 4,69 por 1 milhão, enquanto todas as outras formas de EBS atingem juntas uma prevalência de 1,31 por 1 milhão (Fine, 2016). Os três subtipos principais são causados por variantes patogênicas nos genes *KRT5* ou *KRT14*, que codificam as queratinas 5 e 14, respectivamente, e representam 60-70% dos casos de EBS (Has e Fischer, 2019). A EBS-localizada, anteriormente conhecida como EBS-Weber-Cockayne, é caracterizada pela distribuição das bolhas limitada às regiões das palmas das mãos e solas dos pés. As lesões também podem surgir em outras regiões de trauma recorrente e elas tendem a piorar em meses mais quentes. As bolhas geralmente não estão presentes ao nascimento, mas se desenvolvem cedo na infância, especialmente quando a criança começa a engatinhar e caminhar. Ceratodermia palmoplantar focal (espessamento da pele das mãos e pés) pode aparecer em alguns casos durante a vida adulta. Entre as complicações que

podem surgir, as infecções secundárias às lesões bolhosas nos pés são as mais comuns (Arin, 2009; Coulombe *et al.*, 2009; Fine *et al.*, 2014) (Figura 5).

A EBS-grave, antes designada como generalizada grave ou EBS-Dowling-Meara, apresenta um fenótipo clínico único, com bolhas graves generalizadas, que podem ocorrer de forma aglomerada (bolhas “herpetiformes”) e podem ser hemorrágicas (Coulombe *et al.*, 2009). Durante a infância, as bolhas se desenvolvem por todo o corpo, atingindo mais frequentemente as mãos e os pés, a região ao redor da boca e as regiões do tronco e pescoço. É comum nesse subtipo o envolvimento da mucosa oral, a ocorrência de ceratose palmoplantar progressiva e a distrofia de unhas (Arin, 2009). As lesões comumente curam sem cicatrizes, mas pode ocorrer inflamação, especialmente das bolhas hemorrágicas, que é seguida de mília e hipo- e hiperpigmentação da pele. Como nos demais subtipos de EBS, as bolhas tendem a melhorar com a idade, entretanto, a ceratodermia palmoplantar é mais grave para a maioria dos casos (Arin, 2009; Coulombe *et al.*, 2009; Fine *et al.*, 2014) (Figura 5).



**Figura 5. Subtipos clínicos principais da epidermólise bolhosa simples (EBS).** (A-C) EBS-localizada. (D-F) EBS-generalizada grave. Fontes: (A) Fine, 2010a; (C,B) Stawczyk-Macieja *et al.*, 2019; (D) Arin, 2009; (E) Intong e Murrell, 2012; (F) Kim *et al.*, 2017.

A EBS-intermediária, anteriormente conhecida como EBS-generalizada intermediária ou EBS-Koebner, frequentemente se manifesta ao nascimento com a distribuição generalizada de bolhas, mas sem a formação de conglomerados herpetiformes. A apresentação clínica é mais leve em comparação à forma grave, não envolvendo

acometimento extracutâneo. Ainda que a distribuição seja generalizada, as bolhas atingem predominantemente as mãos e os pés. Ceratodermia palmoplantar focal pode ocorrer e as lesões tendem a piorar com o calor (Arin, 2009; Coulombe *et al.*, 2009; Fine *et al.*, 2014).

Os três subtipos principais de EBS, detalhados acima, são causados por alterações nos genes que codificam as queratinas 5 e 14 do citoesqueleto dos queratinócitos, como será melhor detalhado na próxima seção. Além deles, outras formas de EBS também merecem destaque por representarem uma fração considerável de todos os casos. Variantes patogênicas no gene *PLEC*, que codifica a proteína plectina, podem resultar em diferentes subtipos com distintos padrões de herança, que juntos representam até 8% dos casos de EBS (Bolling *et al.*, 2014; Has e Fischer, 2019). A forma autossômica dominante resulta em EBS-intermediária, enquanto a forma recessiva pode resultar em EBS-intermediária, EBS-intermediária com distrofia muscular e EBS-grave com atresia pilórica (Has *et al.*, 2020). A EBS-intermediária com distrofia muscular é caracterizada pela ocorrência de bolhas desde o nascimento e fraqueza muscular progressiva de início tardio (Gache *et al.*, 1996; Natsuga, 2015). A EBS-grave com atresia pilórica apresenta como principais características a ocorrência de bolhas no período neonatal, a presença de atresia pilórica e, frequentemente, a morte prematura (Pfundner e Uitto, 2005; Natsuga, 2015). Em contraste, o subtipo com herança autossômica dominante, antes conhecido como EBS-Ogna, sendo agora apenas EBS-intermediária, se caracteriza por um quadro clínico brando, que inclui leve fragilidade da pele e ausência de envolvimento de outros órgãos (Rezniczek *et al.*, 2010; Kiritsi *et al.*, 2013b; Natsuga, 2015).

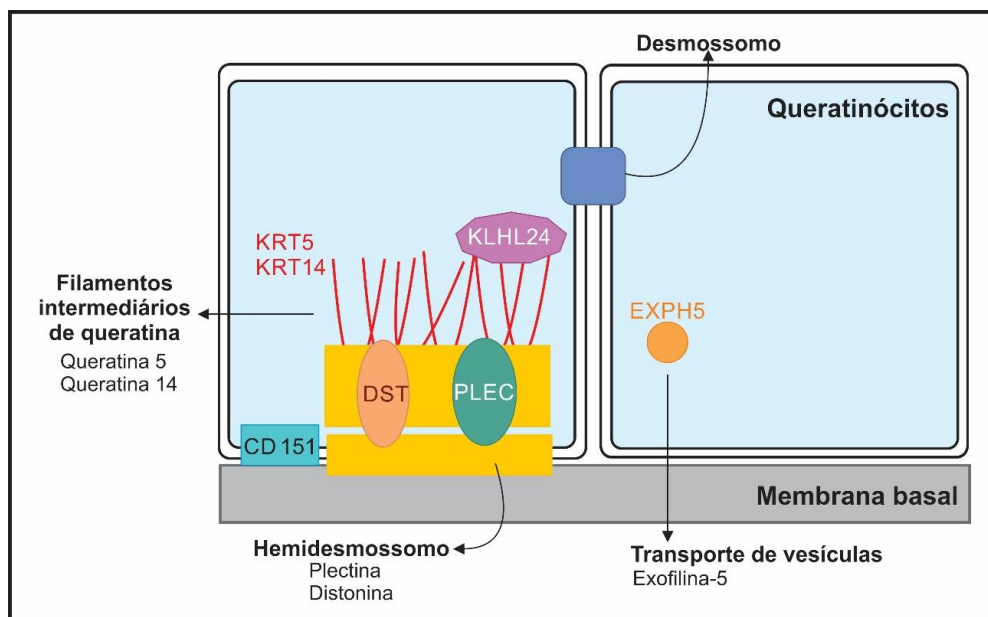
Em 2016, dois estudos independentes (He *et al.*, 2016b; Lin *et al.*, 2016), quase simultaneamente, identificaram variantes patogênicas no gene *KLHL24*, codificante da proteína Kelch-like 24, em um total de 15 pacientes com fenótipo compatível com EB, não relacionados entre si. A partir de então, outros pesquisadores passaram a investigar possíveis variantes nesse gene em pacientes que permaneciam até aquele momento sem a mutação genética identificada. Diversos casos com sinais típicos de EB e mutações em *KLHL24* foram, então, descritos (Lee *et al.*, 2017; Alkhalifah *et al.*, 2018; Yenamandra *et al.*, 2018a; El Hachem *et al.*, 2019; Schwieger-Briel *et al.*, 2019). Estima-se que 5% dos casos de EBS sejam associados a mutações nesse gene (Has e Fischer, 2019). Os sinais clínicos típicos desse subtipo de EBS ainda estão sendo caracterizados, à medida que mais estudos e mais pacientes vêm sendo descritos. Os relatos iniciais apontavam que o fenótipo envolveria

quase que exclusivamente a fragilidade da pele, com lesões desde o nascimento, especialmente em pernas, e formação de bolhas em tronco e membros superiores (Lee *et al.*, 2017). A partir de relatos adicionais, um fenótipo mais sindrômico parece estar relacionado, com envolvimento extracutâneo que incluiria uma forte associação com cardiomiopatia (Yenamandra *et al.*, 2018a; Schwieger-Briel *et al.*, 2019). Estudos demonstraram que 85% dos pacientes com variantes patogênicas em *KLHL24* apresentam algum envolvimento cardíaco, evidenciado pela presença elevada de biomarcadores ou por comprovação de cardiomiopatia dilatada (40%) (Bolling e Jonkman, 2019; Schwieger-Briel *et al.*, 2019). Problemas neurológicos, tais como atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, problemas de memória e miopatia também são descritos em alguns casos (Bolling e Jonkman, 2019). Futuros estudos serão indispensáveis para uma caracterização clínica completa desse novo subtipo de EBS, designado na mais recente classificação de EB como EBS-intermediária com cardiomiopatia (Has *et al.*, 2020).

Os demais subtipos de EBS descritos na Tabela 1 são considerados raros, nenhum deles representando mais do que 1% do total de casos de EBS (Has e Fischer, 2019). Alguns deles apresentam sinais clínicos específicos, como a presença de pigmentação moteada e placas circinadas de carácter migratório nos subtipos que levam esses nomes. Outros subtipos se caracterizam por sinais clínicos com diferentes níveis de gravidade, que se sobrepõem a outras formas da doença (Fine *et al.*, 2014). Para esses casos, o exame clínico não é suficiente para o diagnóstico, sendo necessária a realização de técnicas adicionais para identificação da proteína alterada ou da variante genética patogênica (Fine *et al.*, 2008).

### **2.2.2. A Genética da Epidermólise Bolhosa Simples**

Ainda que a expressividade clínica seja variável entre as diferentes formas de EBS, quase todas são causadas por alterações em genes que codificam componentes dos queratinócitos importantes para a organização do citoesqueleto e para as junções célula-célula (Coulombe *et al.*, 2009; Natsuga, 2013). Dessa forma, a maior parte das proteínas associadas à EBS, detalhadas abaixo, têm como principal função fornecer suporte estrutural aos queratinócitos da epiderme (Figura 6) (Coulombe *et al.*, 2009).



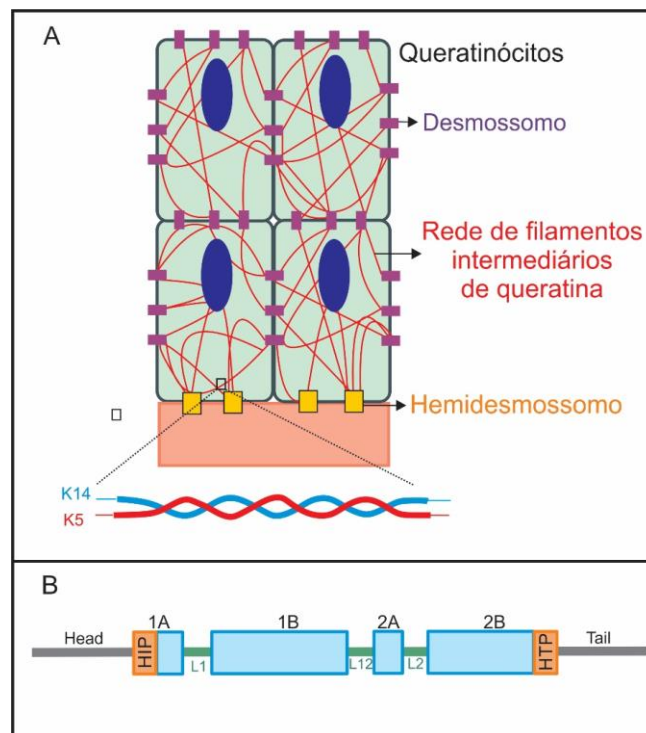
**Figura 6. Representação dos complexos e proteínas associadas aos diferentes subtipos de epidermólise bolhosa simples (EBS).** Alterações em componentes estruturais dos hemidesmossomos, dos filamentos intermediários de queratina e do transporte de vesículas celulares estão por trás do espectro de fenótipos da EBS. Apenas as proteínas associadas à EBS são apresentadas na figura.

### 2.2.2.1. Queratinas 5 e 14

As queratinas são proteínas do citoesqueleto que fornecem estabilidade mecânica às células e tecidos epiteliais. Os filamentos de queratina se inserem entre os desmossomos e hemidesmossomos, formando uma rede que permite não apenas a ligação célula-célula dos queratinócitos, mas também entre estes e a camada subjacente da junção epiderme-derme (Arin, 2009; Coulombe *et al.*, 2009). As queratinas 14 (K14) e 5 (K5) são proteínas dos filamentos intermediários do tipo I e II, respectivamente, e são expressas nos queratinócitos basais na epiderme. No estado fisiológico, K14 e K5 formam heterodímeros de filamentos intermediários tipo I/tipo II, dos quais milhares deles se agrupam formando o citoesqueleto de filamentos intermediários de queratina (Figura 7A) (Coulombe *et al.*, 2009).



Variantes patogênicas nos genes *KRT14* e *KRT5*, que codificam, respectivamente, K14 e K5, prejudicam a montagem da rede de filamentos intermediários no citoplasma dos queratinócitos, resultando no fenótipo de EBS (Arin *et al.*, 2010). As substituições de aminoácidos (variantes *missense*) são o principal tipo de alteração genética nesses genes e o padrão de herança é autossômico dominante, com algumas exceções. A gravidade clínica da EBS está correlacionada, na maioria dos casos, ao local das alterações genéticas. Assim, variantes nas extremidades altamente conservadas dos domínios *rod* de  $\alpha$ -hélice, essenciais para a montagem dos filamentos de queratina, estão frequentemente associadas aos casos mais graves da doença (EBS-grave) (Figura 7B) (Arin *et al.*, 2010; Bolling *et al.*, 2011). Entretanto, essa correlação não é verdadeira para todos os casos, uma vez que alguns resíduos podem ser mais ou menos importantes para a proteína e a natureza dos aminoácidos substituídos, como sua estrutura e polaridade, também influencia no fenótipo (Porter e Lane, 2003; Muller *et al.*, 2006; Arin *et al.*, 2010; Lalor *et al.*, 2019). A forma mais leve, EBS-localizada, está comumente associada a variantes na região de ligação (*linker*), enquanto a forma intermediária (EBS-intermediária) compreende variantes que tendem a se distribuir ao longo das sequências de K5 e K14 (Irvine e McLean, 1999; Porter e Lane, 2003; Arin *et al.*, 2010).



**Figura 7. (A) Representação esquemática da rede de filamentos intermediários de queratina.** Os filamentos de queratina se conectam aos hemidesmossomos para garantir a ligação à membrana basal subjacente e aos desmossomos para assegurar o contato célula-célula nos queratinócitos. Uma

representação da configuração molecular do heterodímero K5/K14, a menor subunidade que forma os filamentos intermediários, é mostrada na parte debaixo da figura A. **(B) Organização dos domínios das queratinas.** As queratinas possuem um domínio central *rod* em  $\alpha$ -hélice contendo 4 segmentos (1A, 1B, 2A, 2B), os quais são interrompidos por três domínios de ligação (L1, L12 e L2). O domínio *rod* possui em suas extremidades motivos altamente conservados (HIP e HTP), frequentemente associados aos casos mais graves de EBS-grave. Variantes nos domínios de ligação estão geralmente associadas à EBS-localizada, enquanto na forma intermediária da doença as variantes envolvidas tendem a estar distribuídas pelos segmentos do domínio *rod*.

### 2.2.2.2. Plectina

A plectina, codificada pelo gene *PLEC*, é uma proteína de ligação que desenvolve um papel essencial na estabilização e organização das redes de filamentos de queratina nas células. Embora seja capaz de interagir com filamentos de actina e microtúbulos, a principal interação da plectina é com os filamentos de intermediários de queratina. Ela atua ancorando os filamentos intermediários a sítios estratégicos, tais como as adesões focais, os desmossomos, os hemidesmossomos e outras estruturas de adesão, assim estabilizando a rede e as células (Winter e Wiche, 2013; Castanon *et al.*, 2013). Existem diversas isoformas de *PLEC*, as quais são preferencialmente expressas em tecidos específicos distintos (Natsuga, 2015).

Variantes patogênicas no gene *PLEC* podem levar a diferentes subtipos de EBS: (a) EBS-intermediária com padrão de herança autossômica dominante, (b) EBS-intermediária com padrão de herança autossômica dominante (c) EBS-intermediária com distrofia muscular e (d) EBS-grave com atresia pilórica, os dois últimos também com padrão de herança recessiva (Has *et al.*, 2020). Até o momento não está estabelecida uma clara correlação genótipo-fenótipo em relação à posição das variantes em *PLEC*. A maior parte dos casos de EBS com distrofia muscular e de EBS com atresia pilórica envolvem substituições que levam a códon de parada prematura (variantes *nonsense*) ou inserções/deleções que alteram a fase de leitura (variantes *frameshift*), em ambos os casos resultando na redução ou completa ausência da expressão da plectina (Winter e Wiche, 2013). Sugere-se que o efeito das variantes para as diferentes isoformas poderia explicar a diferença fenotípica entre esses dois subtipos (EBS com distrofia muscular e EBS com atresia pilórica) (Winter e Wiche, 2013). A única variante patogênica dominante até o momento conhecida estar associada à EBS-intermediária (antes EBS-Ogna) é a c.5998C>T (p. Arg.2000Trp), que leva à perturbação da plectina por efeito dominante negativo (Koss-Harnes *et al.*, 2002; Kiritsi *et al.*, 2013b; Winter e Wiche, 2013). Simplificadamente,

variantes de efeito dominante negativo são aquelas que levam à formação de uma proteína alterada que afeta negativamente a proteína normal tipo selvagem que é coexpressa dentro da célula, reduzindo sua função celular.

### **2.2.2.3. Outras Proteínas Associadas e a Surpresa ‘Kelch-like’**

A maior parte dos sete genes associados à EBS têm funções estruturais para a organização das camadas da pele. O gene *DST*, que codifica a distonina epidérmica, também conhecida como antígeno penfigoide bolhoso (BP230 ou BPAG1e), tem um papel na regulação da adesão dos queratinócitos e no controle dos subtipos de integrinas que estão sendo expressos (McGrath, 2015). A proteína exofilina-5, codificada por *EXPH5*, não é um componente integral dos filamentos intermediários, dos desmossomos ou hemidesmossomos. Ainda que seu papel não seja totalmente conhecido, sugere-se que contribua para a regulação do tráfego da membrana celular, incluindo o controle da formação e da movimentação de vesículas ao longo das redes de actina e tubulina (McGrath, 2015).

Desde a descoberta da associação do gene *KLHL24* ao fenótipo de EBS, pesquisadores buscam entender o mecanismo molecular envolvido na sua patogenicidade (Lin *et al.*, 2016; Has, 2017; Bolling e Jonkman, 2019). Diferentemente da maior parte das proteínas associadas à EBS, a proteína Kelch-like 24 não é uma proteína estrutural. Todas as variantes patogênicas identificadas nos pacientes envolvem o códon de iniciação da tradução (Bolling e Jonkman, 2019). Achados preliminares sugerem que essa proteína atuaria por um novo mecanismo na EB, através da desregulação de sua autoubiquitinação, o que levaria a alteração nos níveis dos filamentos intermediários, especialmente da queratina 14, nos queratinócitos (Lin *et al.*, 2016; Has, 2017; Schwieger-Briel *et al.*, 2019).

## **2.3. Epidermólise Bolhosa Juncional**

A epidermólise bolhosa juncional (EBJ) é caracterizada por clivagem e formação de bolhas dentro da lâmina lúcida da pele. A separação epiderme-derme nesse tipo de EB resulta, portanto, de alterações genéticas que afetam as funções de componentes essenciais da zona da membrana basal (Nakano *et al.*, 2002a; Nakano *et al.*, 2002b; Yuen *et al.*, 2011; Yenamandra *et al.*, 2017). A EBJ envolve um amplo espectro fenotípico, variando de um extremo caracterizado por letalidade precoce até um outro extremo com sinais clínicos tão sutis que são quase indistinguíveis dos subtipos mais leves de EB (Fine *et al.*, 2014).

Mutações em sete genes distintos levam aos diferentes subtipos de EBJ, todos associados ao padrão de herança autossômico recessivo (Fine *et al.*, 2014; Has *et al.*, 2020).

A EBJ é, comparativamente aos demais tipos principais de EB, a forma mais rara da doença, com uma incidência estimada em 2,68 por 1 milhão de nascidos vivos e uma prevalência de 0,5 por 1 milhão (Fine, 2016). Uma vez que as formas mais graves estão associadas à letalidade precoce, é provável que as estimativas de incidência e prevalência estejam subestimadas (Fine, 2016).

### 2.3.1. Subtipos Clínicos da Epidermólise Bolhosa Juncional

A EBJ é classificada em nove subtipos diferentes, de acordo com os sinais clínicos apresentados e a gravidade do fenótipo. Os subtipos mais frequentes de EBJ são causados por variantes patogênicas nos genes que codificam a proteína laminina-332 e o colágeno tipo XVII. O tipo de alteração genética e a sua consequência para a expressão da proteína estão diretamente ligadas à gravidade fenotípica, como será abordado na próxima seção. A tabela 2 apresenta os subtipos da EBJ com destaque para os genes e as respectivas proteínas associadas (Has *et al.*, 2020).

**Tabela 2. Subtipos clínicos da epidermólise bolhosa juncional (EBJ)**

Subtipos de EBJ <sup>a</sup>	Gene (proteína)
<b>EBJ, grave</b>	<i>LAMA3, LAMB3, LAMC2</i> (laminina-332)
<b>EBJ, intermediária</b>	<i>LAMA3, LAMB3, LAMC2</i> (laminina-332)
<b>EBJ, intermediária</b>	<i>COL17A1</i> (colágeno XVII)
EBJ com atresia pilórica *	<i>ITGB4, ITGA6</i> (integrina $\alpha6\beta4$ )
<b>EBJ, localizada</b>	<i>COL17A1</i> (colágeno XVII) <i>ITGB4</i> (integrina $\alpha6\beta4$ ) <i>LAMA3, LAMB3, LAMC2</i> (laminina-332) <i>ITGA3</i> (integrina subunidade $\alpha3$ )
EBJ, inversa	<i>LAMA3, LAMB3, LAMC2</i> (laminina-332)
EBJ, início tardio	<i>COL17A1</i> (colágeno XVII)
EBJ, síndrome LOC <sup>b</sup>	<i>LAMA3A</i> (laminina $\alpha3A$ )
EBJ com doença pulmonar intersticial e síndrome nefrótica *	<i>ITGA3</i> (integrina subunidade $\alpha3$ )

Tabela modificada de Has *et al.*, 2020.

Subtipos em negrito são os mais frequentes grupos de EBJ.

\* Subtipos de EBS síndromicos.

<sup>a</sup> Todos os subtipos de EBJ apresentam herança autossômica recessiva. <sup>b</sup> LOC: *laryngo-onycho-cutaneous*.

A forma mais grave desse grupo é a EBJ-grave, anteriormente designada como EBJ-generalizada grave ou EBJ-Herlitz, que se caracteriza por uma apresentação clínica de extensa fragilidade da pele e das membranas mucosas (Fine *et al.*, 2014; Has *et al.*, 2020). As bolhas e erosões mucocutâneas estão presentes desde o nascimento e se desenvolvem por toda a superfície corporal, resultando na perda de proteínas, fluidos e ferro, o que aumenta a suscetibilidade a infecções (Figura 8) (Kiritsi *et al.*, 2013a). Tecido de granulação exuberante é formado especialmente ao redor de nariz e boca, nas nádegas e nas pregas das unhas (Laimer *et al.*, 2010). Os pacientes sofrem de dor extrema e as consequências a longo prazo incluem atraso no desenvolvimento, dificuldade de cicatrização de feridas, anemia, complicações respiratórias e infecções que acabam levando à morte nos primeiros anos de vida (Yuen *et al.*, 2011; Kiritsi *et al.*, 2013a; Hammersen *et al.*, 2016). Esse subtipo de EBJ está associado à completa ausência ou à profunda redução da laminina-332, como será detalhado na seção subsequente (Kiritsi *et al.*, 2013a; Fine *et al.*, 2014).

O subtipo EBJ-intermediária, antes conhecido como EBJ-generalizada intermediária ou EBJ-generalizada não-Herlitz, compreende um grupo clinicamente heterogêneo, com distribuição generalizada de bolhas, que cicatrizam e deixam sutil atrofia e hipopigmentação nos locais de lesão (Figura 8) (Has *et al.*, 2020). A gravidade da doença é atenuada em relação ao subtipo mais grave, ainda que as membranas também possam ser afetadas (Kiritsi *et al.*, 2013a). Outras manifestações incluem alopecia, defeitos de esmalte e distrofia ou ausência de unhas, em diferentes níveis de gravidade. Tecido de granulação, formação de feridas crônicas e envolvimento extracutâneo em córnea, laringe e trato urinário também podem estar associados (Yuen *et al.*, 2011; Kiritsi *et al.*, 2013a; Fine *et al.*, 2014; Yenamandra *et al.*, 2017). Nesse subtipo de EBJ, a expressão da laminina-332 ou do colágeno tipo XVII está reduzida, mas não completamente ausente (Kiritsi *et al.*, 2011; Kiritsi *et al.*, 2013a).

A forma localizada de EBJ foi, por muito tempo, considerada uma condição rara. O aprimoramento das técnicas de análise molecular permitiu a identificação de casos com apresentação clínica atípica em relação aos subtipos de EB mais conhecidos e, a partir de então, uma série de novos casos de EBJ-localizada vêm sendo descritos (Pasmooij *et al.*, 2007; Kiritsi *et al.*, 2011; Yenamandra *et al.*, 2017; Hoffmann *et al.*, 2019). Nesse subtipo, as bolhas se distribuem de forma localizada, principalmente nas extremidades. A EBJ-localizada, assim como o subtipo intermediário, está associada à distrofia ou ausência de

unhas, à hipoplasia do esmalte dentário e à tendência para o desenvolvimento de cáries (Figura 8) (Yancey e Hintner, 2010; Fine *et al.*, 2014). Contrastando com os demais subtipos, os pacientes com essa forma de EBJ usualmente não apresentam cicatrizes atróficas extensas, alopecia e outros achados extracutâneos como anemia, atraso no desenvolvimento, alterações oculares ou no trato respiratório e geniturinário (Yancey e Hintner, 2010; Fine *et al.*, 2014). A variabilidade fenotípica é marcante na EBJ; em contraste com a forma grave da doença, a forma localizada pode apresentar um fenótipo tão leve que o único sinal clínico é a distrofia de unhas (Kiritsi *et al.*, 2011).

Entre os subtipos mais raros de EBJ, destaca-se a forma *inversa*, na qual a manifestação cutânea se dá predominantemente em áreas intertriginosas (áreas da pele que se encostam ou se atritam) e usualmente com uma extensão maior em relação à EBJ-localizada (Yancey e Hintner, 2010). O subtipo EBJ com atresia pilórica envolve alterações nos genes que codificam a integrina  $\alpha 6\beta 4$  e está associado a fenótipos graves, que envolvem além da atresia pilórica, a distribuição generalizada de bolhas, a ausência congênita de pele e a letalidade precoce (Natsuga *et al.*, 2011; Fine *et al.*, 2014). Entretanto, a EBJ com atresia pilórica apresenta uma heterogeneidade clínica, estando também associada a casos menos graves (Mencia *et al.*, 2016).



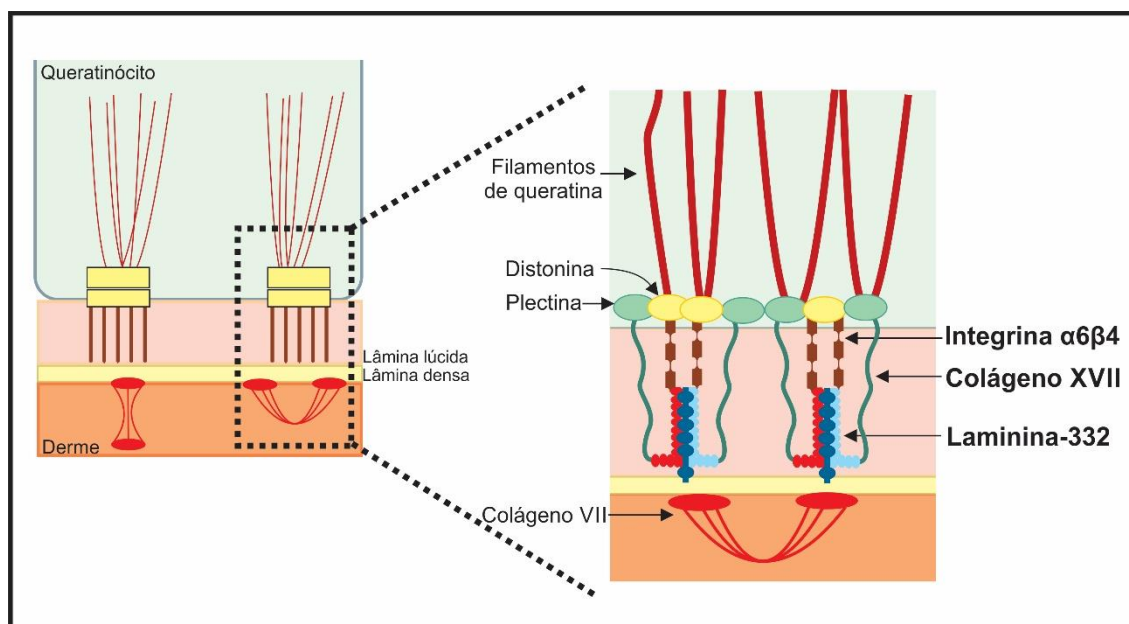
**Figura 8. Subtipos clínicos principais da epidermólise bolhosa juncional (EBJ).** (A-D) EBJ-generalizada grave; (E-F) EBJ-generalizada intermediária; (G-I) EBJ-localizada. Fontes: (A-C) Laimer *et al.* (2010); (D, F) Kiritsi *et al.* (2013b); (E, G-I) Pasmooij *et al.* (2007).

### 2.3.2. A Genética da Epidermólise Bolhosa Juncional

A zona da junção epiderme-derme compreende uma membrana basal especializada que liga a epiderme à derme e, assim, fornece à pele integridade e resistência contra forças mecânicas externas (Van Agtmael e Bruckner-Tuderman, 2010; Kiritsi *et al.*, 2013a). A membrana é formada principalmente por redes de laminina-332 e colágeno IV, que se sobrepõem e se conectam por ação de outras moléculas (McGrath e Uitto, 2010; Behrens *et al.*, 2012; Kiritsi *et al.*, 2013a). Diversas proteínas da superfície celular dos queratinócitos e da matriz extracelular se inserem nessa rede e interagem de forma específica entre si, garantindo a adesão das camadas da pele (Aumailley *et al.*, 2003; McGrath e Uitto, 2010; Kiritsi *et al.*, 2013a). Variantes patogênicas nos genes que codificam os componentes da junção epiderme-derme resultam na ausência ou perturbação de suas funções e na consequente diminuição da adesão das camadas da pele, o que leva aos fenótipos característicos da EBJ (McGrath e Uitto, 2010; Kiritsi *et al.*, 2013a).

### 2.3.2.1. Laminina-332

A laminina-332, anteriormente conhecida como laminina-5, é uma proteína heterotrímica constituída de cadeias  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  e  $\gamma 2$ , codificadas pelos genes *LAMA3*, *LAMB3* e *LAMC2*, respectivamente. Ela é uma das proteínas essenciais da junção epiderme-derme, sendo considerada uma ponte molecular entre os queratinócitos basais da epiderme e a derme subjacente (Schneider *et al.*, 2007; Kiritsi *et al.*, 2013a). Para se conectar à superfície dos queratinócitos basais, a laminina-332 interage com a integrina  $\alpha 6\beta 4$  nos hemidesmossomos e com a integrina  $\alpha 3\beta 1$  nas adesões focais. No lado da derme, a ligação à membrana basal é realizada graças a sua interação com o colágeno tipo VII nas fibrilas de ancoragem, o que garante a adesão da membrana basal à matriz extracelular da derme (Figura 9). É através dessas interações proteína-proteína que a laminina-332, portanto, atua como um suporte para a adesão epiderme-derme (McGrath e Uitto, 2010; Yuen *et al.*, 2011; Kiritsi *et al.*, 2013a).



**Figura 9. Representação das principais estruturas envolvidas na adesão das camadas da pele.** As principais proteínas associadas à epidermólise bolhosa juncional (indicadas em negrito, à direita da figura) interagem de modo a permitir a ligação dos filamentos intermediários de queratina às fibrilas de ancoragem (formadas por colágeno tipo VII) na parte superior da derme.

Variantes patogênicas nos genes *LAMA3*, *LAMB3* ou *LAMC2* levam à ausência ou redução da laminina-332, o que resulta na perda da sua função como ponte entre os hemidesmossomos e as fibrilas de ancoragem. Como consequência, epiderme e derme se separam ao nível da lâmina lúcida, resultando nos fenótipos típicos da EBJ (McGrath e Uitto,



2010). A gravidade fenotípica e, por conseguinte, o subtipo clínico de EBJ estão relacionados à expressão da laminina-332. A forma mais grave, EBJ-grave, é usualmente causada por variantes de perda de função (variantes nulas), como as substituições que geram um códon de parada prematura (variantes *nonsense*) e as que alteram a fase de leitura (variantes *frameshift*), assim resultando na completa ausência da laminina-332 (Yuen *et al.*, 2011; Kiritsi *et al.*, 2013a). Em cerca de 80% dos casos graves, o gene associado é o *LAMB3*, que codifica a cadeia  $\beta 3$  da proteína (Yuen *et al.*, 2011). Nas formas mais leves de EBJ (intermediária e localizada), ao menos uma das variantes patogênicas associadas permite a expressão, mesmo que parcial, da proteína funcional, como as substituições de aminoácidos (*missense*) ou as variantes em sítios de *splice* que não alteram a fase de leitura (*in-frame*) (Nakano *et al.*, 2002a; Nakano *et al.*, 2002b; Kiritsi *et al.*, 2013a).

### 2.3.2.2. Colágeno XVII

O colágeno tipo XVII, codificado pelo gene *COL17A1*, é uma proteína transmembrana com orientação tipo II, na qual a extremidade N-terminal é citoplasmática e a C-terminal atravessa a lâmina lúcida em direção ao lado externo da célula (Pasmooij *et al.*, 2007). Essa proteína é um trímero de três cadeias  $\alpha 1$ , cuja principal função é conectar a rede de filamentos intermediários de queratina à membrana basal, através da interação com as proteínas plectina, BP230 e integrina  $\alpha 6\beta 4$  (Figura 9) (Koster *et al.*, 2003; Pasmooij *et al.*, 2007; Kiritsi *et al.*, 2011).

Variantes patogênicas no gene *COL17A1* resultam em um espectro variável de fenótipos. Ainda que diversos estudos tenham buscado possíveis correlações genótipo-fenótipo, a única correlação clara é que os níveis de expressão do colágeno XVII influenciam diretamente a expressão clínica. Assim, pacientes com variantes genéticas que levam à completa ausência da proteína na pele, como as *nonsense* e as *frameshift*, apresentam um fenótipo grave. Enquanto isso, pacientes com sintomas mais leves da doença usualmente carregam variantes *missense* ou variantes em sítios de *splice in-frame*, que reduzem, mas não abolem a expressão do colágeno XVII, ou mesmo que alteram a proteína sem afetar sua expressão (Varki *et al.*, 2006; Pasmooij *et al.*, 2007; Kiritsi *et al.*, 2011).

### 2.3.2.3. Integrinas $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 3\beta 1$

A integrina  $\alpha 6\beta 4$  é um polipeptídeo transmembrana heterodimérico, localizado no centro dos hemidesmosomos (Figura 9) (Turcan *et al.*, 2016). Sua principal função é de

conectar a placa hemidesmosossomal dos queratinócitos basais à membrana basal subjacente e, assim, fornecer resistência mecânica à pele e às membranas mucosas (de Pereda *et al.*, 2009; Turcan *et al.*, 2016). Os fenótipos resultantes de variantes patogênicas nos genes *ITGA6* e *ITGB4*, que codificam a integrina  $\alpha6\beta4$ , também são bastante heterogêneos. As formas letais da doença usualmente resultam de mutações nulas (como substituições *nonsense*, e inserções e deleções *frameshift*) em ambos os alelos, enquanto as formas mais leves usualmente envolvem a presença de substituições de aminoácidos (variantes *missense*) em ao menos um dos alelos (Mencia *et al.*, 2016).

O gene que codifica a subunidade  $\alpha3$  da integrina  $\alpha3\beta1$  foi recentemente associado a uma forma rara de EBJ (EBJ com envolvimento respiratório e renal) (Has *et al.*, 2012). Ainda que seja conhecida a importância da integrina  $\alpha3\beta1$  para o epitélio, incluindo os queratinócitos epidérmicos, as células epiteliais alveolares e os podócitos, os mecanismos moleculares envolvidos nesse subtipo de EBJ ainda não são conhecidos (He *et al.*, 2016a).

#### **2.4. Epidermólise Bolhosa Distrófica**

A epidermólise bolhosa distrófica (EBD) é caracterizada pela clivagem da pele na região da sublâmina densa, na porção superior da derme (Fine *et al.*, 2014). A EBD pode ser herdada tanto com padrão autossômico dominante como autossômico recessivo. Ela está associada a um amplo espectro fenotípico e de gravidade, que varia desde a ocorrência isolada de leve distrofia de unhas até a formação generalizada de bolhas com cicatrização mutilante de mãos e pés, envolvimento extracutâneo grave e morte prematura (Varki *et al.*, 2007; Dang e Murrell, 2008; Fine *et al.*, 2014). Ainda que a maior parte das variantes patogênicas da EBD sejam típicas do padrão de herança dominante ou do recessivo, algumas alterações genéticas já foram descritas em ambas as formas, adicionando complexidade ao entendimento das bases moleculares desse tipo de EB (Almaani *et al.*, 2011; Fine *et al.*, 2014). O gene *COL7A1*, que codifica o principal constituinte das fibrilas de ancoragem, o colágeno tipo VII, é o único gene conhecido associado à EBD.

A EBD é classificada em dois grupos principais, de acordo com o padrão de herança associado, EBD dominante (EBDD) e EBD recessiva (EBDR), e subdividida em pelo menos 11 subtipos clínicos, que levam ainda em consideração as características fenotípicas envolvidas (Has *et al.*, 2020). A incidência e prevalência da EBD foram estimadas em 6,65

e 3,3 por 1 milhão de nascidos vivos, respectivamente, sendo a prevalência das formas dominante e recessiva bastante similar, 1,5 e 1,4, por 1 milhão, nessa ordem; os casos de EBD sem padrão de herança definido atingem uma prevalência de 0,4 por 1 milhão (Fine, 2016).

#### 2.4.1. Subtipos Clínicos da Epidermólise Bolhosa Distrófica

A classificação da EBD em seus diversos subtipos leva em consideração os sinais cutâneos e extracutâneos característicos, a distribuição das bolhas (localizada ou generalizada) e a gravidade do fenótipo (Fine *et al.*, 2014; Has *et al.*, 2020). Ainda que alguns subtipos se caracterizem por sinais clínicos específicos e de gravidade distinta, existe uma sobreposição de certos fenótipos entre alguns grupos, o que dificulta o diagnóstico e exige a realização de testes moleculares adicionais (Fine *et al.*, 2008; Fine *et al.*, 2014). Levando em consideração que a EBD é herdada tanto de maneira dominante como recessiva, a classificação do tipo de EBD é especialmente importante para fins de aconselhamento genético (Has *et al.*, 2019). A tabela 3 apresenta os subtipos de EBD.

**Tabela 3. Subtipos clínicos da epidermólise bolhosa distrófica (EBD)**

Tipo Principal	Subtipos de EBD	Gene (proteína)
EBD dominante (EBDD)	<b>EBDD, intermediária</b>	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
	<b>EBDD, localizada<sup>a</sup></b>	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
	EBDD, pruriginosa	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
	EBDD, auto-reparável <sup>b</sup>	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
EBD recessiva (EBDR)	<b>EBDR, grave</b>	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
	<b>EBDR, intermediária</b>	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
	EBDR, inversa	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
	EBDR, localizada <sup>c</sup>	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
	EBDR, pruriginosa	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
	EBDR, auto-reparável <sup>b</sup>	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)
EBD dominante e recessiva (heterozigose composta)	EBD, grave	<i>COL7A1</i> (colágeno tipo VII)

Em negrito estão os subtipos mais frequentes de EBD.

<sup>a</sup> O subtipo EBDD-localizada engloba os subtipos antes conhecidos como EBDD-pré-tibial, EBDD-unhas apenas e EBDD-acral.

<sup>b</sup> ‘Auto-reparável’ em tradução livre de ‘self-improving’; anteriormente esse subtipo era conhecido como EBD-dermólise bolhosa do recém-nascido.

<sup>c</sup> O subtipo EBDR-localizada engloba o subtipo antes conhecido como EBDR-pré-tibial.

Tabela modificada de Has *et al.*, 2020.

Nos subtipos de EBD, a gravidade dos fenótipos está relacionada, em certo nível, à consequência das mutações de *COL7A1* para a formação das fibrilas de ancoragem, as quais

podem apresentar alterações morfológicas, ter sua expressão reduzida, ou mesmo estar completamente ausentes, como será detalhado na próxima seção (Vahidnezhad *et al.*, 2017b). Ainda que as formas graves de EBD sejam descritas como as mais frequentes, é possível que haja um subdiagnóstico das formas localizadas, dado o envolvimento de sinais clínicos mais sutis. A partir do desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração, novos estudos, incluindo grandes números amostrais, vêm permitindo estabelecer correlações genótipo-fenótipo para a doença (Vahidnezhad *et al.*, 2017a; Vahidnezhad *et al.*, 2017b; Saeidian *et al.*, 2018; Yenamandra *et al.*, 2018b). Os principais subtipos de EBD são detalhados a seguir.

A EBDR-grave, antes denominada EBDR-generalizada grave ou EBDR-Hallopeau-Siemens, constitui a forma mais grave de EBD, usualmente associada à ausência completa da expressão do colágeno VII (Intong e Murrell, 2012). Os sinais clínicos clássicos envolvem a formação de bolhas generalizadas pelo corpo desde o nascimento e cicatrizes mutilantes que levam à pseudosindactilia (fusão dos dedos) em mãos e pés e que resultam em contraturas das articulações. Além disso, úlceras crônicas de difícil cicatrização, mília e distrofia de unhas são outros sinais típicos (Figura 10A). As bolhas podem ocorrer na mucosa oral, na região da córnea e no epitélio gastrointestinal; estenose esofágica é descrita em muitos casos. Anemia, atraso no desenvolvimento e carcinoma de células escamosas associado à morte precoce ainda compõem o padrão fenotípico desse subtipo de EBDR (Varki *et al.*, 2007; Fine *et al.*, 2014; Vahidnezhad *et al.*, 2017b).



**Figura 10. Subtipos clínicos principais da epidermólise bolhosa distrófica (EBD).** (A) EBD recessiva generalizada grave. (B) EBD recessiva generalizada intermediária. (C,D) EBD recessiva localizada. (E) EBD dominante generalizada (F,G) EBD dominante localizada. Fontes: (A) Fine (2010a). (B, C, D) Pacientes incluídos no presente estudo (consentimento por escrito concedido). (E) Intong e Murrell (2012). (F, G) Nagai *et al.* (2015).

A EBDR-intermediária, anteriormente conhecida como EBDR-generalizada intermediária ou EBDR non-Hallopeau-Siemens, também se caracteriza pela formação de bolhas de distribuição generalizada, entretanto, envolvendo menor gravidade (Figura 10B) (Fine, 2010a). Sinais clínicos muito frequentes na forma grave, como a constrição esofágica, as lesões na córnea e a pseudosindactilia de mãos e pés ainda ocorrem, mas são menos usuais na forma intermediária da doença. Atraso no desenvolvimento e anemia são condições ainda mais raras nesse subtipo de EBDR (Fine *et al.*, 2014; Fine, 2010a).

Entre os subtipos dominantes, a forma intermediária, EBDD-intermediária (antes EBDD-generalizada), se caracteriza pela formação de bolhas com distribuição generalizada ao nascimento, lesões albopapuloides, mília, cicatrização atrófica e distrofia de unhas (Figura 10E). Em contraste com a forma EBDR-grave, atraso no desenvolvimento, anemia grave, e risco de carcinoma de células escamosas não são características dos subtipos de EBDD (Fine, 2010a; Fine *et al.*, 2014).

Em meio à complexidade que é a classificação da EBD em seus diversos subtipos, as formas localizadas de ambos os padrões de herança dificultam ainda mais: a EBDD-

localizada e a EBDR-localizada são clinicamente indistinguíveis (Fine *et al.*, 2014). Ou seja, para fenótipos típicos de EB distrófica localizada, o resultado genético é imprescindível para a definição do padrão de herança associado e, em última análise, para o correto aconselhamento genético. Trata-se de subtipos com fenótipos muito atenuados de EB, cujo principal sinal clínico envolve a distribuição de bolhas de forma localizada nas regiões de mãos e pés e distrofia de unhas (Figura 10C-D, F-G). Mília e cicatrizes atróficas também podem ocorrer. Não há envolvimento extracutâneo e nem pseudosindactilia nessas formas da doença (Fine, 2010a; Fine *et al.*, 2014).

A subdivisão da EBD ainda abrange uma série de outros subtipos mais raros, que geralmente envolvem sinais clínicos específicos. A EBDR-inversa se caracteriza por uma sucessão peculiar de achados clínicos, que se inicia com a formação de bolhas generalizadas no período neonatal que, no início da infância, curam deixando cicatrizes atróficas. Os sinais cutâneos tendem a melhorar com o passar dos anos, enquanto lesões graves se desenvolvem nas mucosas oral, esofágica, anal e genital (Fine *et al.*, 2008; Chiaverini *et al.*, 2010). A EBD-pruriginosa compreende um subtipo generalizado que inclui a formação de prurido grave (McGrath *et al.*, 1994; Fine, 2010a). A EBD-auto-reparável, antes conhecida como ‘EBD-dermólise bolhosa do recém-nascido’, é um subtipo de EBD que se apresenta ao nascimento, ou logo após, com a formação de bolhas generalizadas. Contrastando com os demais subtipos, os sinais clínicos dessa forma da doença deixam de aparecer dentro de 6 a 24 meses de vida (Fine, 2010a).

O termo síndrome de Bart foi inicialmente utilizado para designar um fenótipo que até então imaginava-se tratar-se de uma condição distinta de outras genodermatoses (Bart, 1970; Fine *et al.*, 2000). O sinal clínico característico era ausência congênita de pele, ou aplasia cútis congênita, originalmente observada em uma família com múltiplos casos (Bart, 1970). À medida que diversos relatos descreveram a ocorrência de ausência congênita de pele em pacientes com as diferentes formas de EB, ficou definido que essa condição é um sinal clínico adicional associado à EB (Charlesworth *et al.*, 2003; Fine, 2010a; Hassan *et al.*, 2013; Chiaverini *et al.*, 2014; Fine *et al.*, 2014; Diociaiuti *et al.*, 2016). Estudos posteriores demonstraram que a família descrita com síndrome de Bart apresentava, na verdade, EB distrófica dominante (Christiano *et al.*, 1996; Fine *et al.*, 2014). Uma causa conhecida da ausência congênita de pele é o trauma mecânico intrauterino causado pela fricção dos membros (Smith e Cram, 1978). Entretanto, isso não explica a recorrência dessa condição

dentro de famílias com EB. Assim, é provável que fatores genéticos e epigenéticos possam influenciar a ocorrência de ausência congênita de pele na EB (Chiaverini *et al.*, 2014).

#### **2.4.2. A Genética da Epidermólise Bolhosa Distrófica**

A forma distrófica da EB se caracteriza pela separação do tecido logo abaixo da lâmina densa, ao nível das fibrilas de ancoragem. Como será detalhado a seguir, o principal constituinte das fibrilas de ancoragem é o colágeno VII, codificado a partir do gene *COL7A1*. Alterações nesse gene resultam em modificações morfológicas ou redução/ausência das fibrilas de ancoragem, levando aos diferentes fenótipos de EBD (Chung e Uitto, 2010). O nível de expressão do *COL7A1* nos pacientes com EBD está inversamente correlacionado com a gravidade fenotípica (McGrath *et al.*, 1993; Dang e Murrell, 2008).

##### **2.4.2.1. Colágeno tipo VII**

O colágeno tipo VII é o principal, se não o único, componente das fibrilas de ancoragem. Estas, por sua vez, são grandes estruturas em forma de U que se estendem da parte de baixo da membrana basal derme-epiderme até a camada superior da derme (derme papilar) (McGrath e Uitto, 2010). Dessa forma, as fibrilas de ancoragem fornecem integridade para a associação da epiderme à derme subjacente (Varki *et al.*, 2007).

O *COL7A1* é um gene que apresenta um arranjo complexo, consistindo em 118 éxons e um tamanho de aproximadamente 32 kb. Esse gene codifica polipeptídeos de colágeno pro- $\alpha 1$ (VII), que irão se organizar em fibrilas de ancoragem (Christiano *et al.*, 1994b; Varki *et al.*, 2007). A estrutura desses polipeptídeos inclui um domínio colagenoso na sua porção central, formado por repetições Gly-X-Y que se dobram para atingir a conformação de tripla hélice característica das moléculas de colágeno (Varki *et al.*, 2007). O domínio de tripla hélice do colágeno VII contém um total de 19 interrupções ou imperfeições, incluindo um segmento central não colagenoso de 39 aminoácidos (Christiano *et al.*, 1994b). Tais interrupções na sequência Gly-X-Y fornecem flexibilidade às moléculas de colágeno VII (McGrath e Uitto, 2010). O domínio central colagenoso é flanqueado por domínios globulares não helicoidais, o domínio NC1 na extremidade amino-terminal e o domínio NC2 na extremidade carboxi-terminal (Figura 11) (Christiano *et al.*, 1994b; Varki *et al.*, 2007; McGrath e Uitto, 2010).

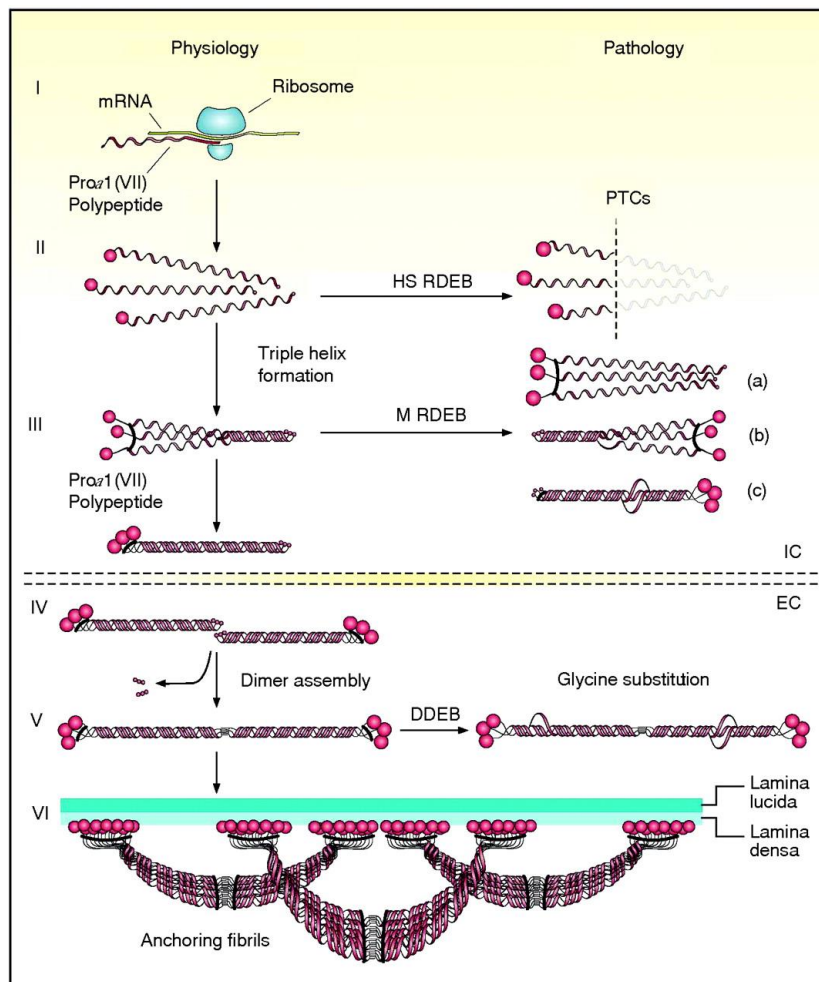


**Figura 11. Estrutura do colágeno tipo VII.** Domínios: CMP: *cartilage matrix protein* (proteína da matriz da cartilagem); Fn3: *fibronectin III-like domains* (domínios de fibronectina III-like); VWA: *von Willebrand factor A domain* (domínio do fator A de von Willebrand). THD: *triple-helical collagenous domain* (domínio colagenoso de tripla hélice). Peptídeo sinal representado em cinza. Interrupção de 39 aminoácidos do domínio colagenoso em azul claro.

Os polipeptídeos de colágeno pro- $\alpha 1$ (VII) são sintetizados principalmente pelos queratinócitos da epiderme, mas também pelos fibroblastos da derme (McGrath e Uitto, 2010). Três polipeptídeos formados se associam através de suas extremidades carboxi-terminais (domínios NC2), enquanto seus domínios colagenosos se enovelam em uma conformação de tripla hélice, sendo, a partir de então, secretados para o meio extracelular (Figura 12). Duas moléculas de colágeno tipo VII em tripla hélice formam dímeros antiparalelos e, após a remoção de parte da extremidade carboxi-terminal (NC2), o dímero formado é estabilizado por ligações dissulfeto intermoleculares. Subsequentemente, diversos dímeros de colágeno tipo VII se organizam lateralmente nas fibrilas de ancoragem. A ligação das fibrilas à lâmina densa ocorre graças ao domínio amino-terminal não colagenoso NC1, que por homologia se liga a proteínas da lâmina densa, estabilizando a associação dessa camada com a derme subjacente (Burgeson, 1993; McMillan *et al.*, 2003; Varki *et al.*, 2007; Villone *et al.*, 2008; Chung e Uitto, 2010).

A importância de se conhecer as etapas da formação das fibrilas de ancoragem reside no fato de que perturbações em quaisquer dessas etapas resultam em consequências específicas para a estrutura e expressão das fibrilas, o que leva, em última análise, aos diferentes fenótipos da EBD. A Figura 12 apresenta um esquema da formação das fibrilas de ancoragem no estado fisiológico e as perturbações desse processo por mutações em *COL7A1*, que resultam nos diferentes subtipos de EBD (Varki *et al.*, 2007; Chung e Uitto, 2010). Como será apresentado a seguir, pode-se dizer que o fenótipo da EBD é, via de regra, determinado pela expressão e função residual de *COL7A1*, ainda que exceções a esse padrão já tenham sido relatadas (Christiano *et al.*, 1996; van den Akker *et al.*, 2009).





**Figura 12. Representação da síntese dos polipeptídeos de colágeno pro- $\alpha$ 1(VII) e sua montagem em fibrilas de ancoragem sob condições fisiológicas (lado esquerdo da figura) e alterações nesses processos que levam às formas distróficas de epidermólise bolhosa (lado direito). Três polipeptídeos se associam pelas suas extremidades C-terminais enquanto seus domínios colagenosos se dobram em formação de tripla hélice (etapas II e III). No meio extracelular, as moléculas de colágeno tipo VII em tripla hélice formam dímeros antiparalelos (IV) que, após a remoção de parte da extremidade C-terminal, são ligadas (V). As diversas moléculas de dímeros se juntam lateralmente formando fibrilas de ancoragem (VI). Os domínios N-terminais não colagenosos, com homologia às proteínas adesivas, se ligam às macromoléculas na lâmina densa, estabilizando a adesão desta com a derme subjacente. Variantes patogênicas no gene *COL7A1* podem resultar em códon de parada prematura (PTC) e ausência da proteína formada, usualmente associada a casos graves de EBD. Nos casos menos graves de EB, as variantes podem interferir na associação das cadeias (representado em 'a'), na formação da tripla hélice ('b') ou na estabilidade desta ('c'). As substituições de glicina usualmente estão associadas à forma dominante de EBD por desestabilizarem a tripla hélice, resultando em efeito dominante-negativo. Fonte: Varki *et al.* (2007).**

A EBDR-generalizada grave é frequentemente causada por variantes de códon de parada prematura (variantes nulas) em ambos os alelos do gene *COL7A1*, resultando de substituições *nonsense*, de inserções ou deleções *frameshift* ou, ainda, de variantes em sítios de *splice* que resultam em alteração da fase de leitura (Christiano *et al.*, 1994a; Dang e

Murrell, 2008). Tais alterações causam graves consequências para a proteína formada, resultando em decaimento de mRNA mediado por mutações *nonsense* (mecanismo de degradação de transcritos com códon de parada prematura) ou na formação de polipeptídeos truncados que não são capazes de se associar para a montagem das fibrilas de ancoragem (Figura 12) (Christiano *et al.*, 1994a; Varki *et al.*, 2007; Dang e Murrell, 2008).

A forma EBDR-generalizada intermediária, por sua vez, frequentemente é causada por variantes em heterozigose composta: uma variante de códon de parada prematura e uma substituição de aminoácidos (Dang e Murrell, 2008). Cabe ressaltar, entretanto, que diversos outros tipos de variantes, em diferentes combinações, também já foram associadas a esse subtipo (Gardella *et al.*, 2002; Kern *et al.*, 2006; van den Akker *et al.*, 2009; Dănescu *et al.*, 2015; Yenamandra *et al.*, 2018b). O que caracteriza a forma intermediária é a presença de pelo menos uma variante que permite alguma produção de colágeno tipo VII, assim possibilitando a montagem, ainda que parcial, das fibrilas de ancoragem. Dessa forma, as alterações genéticas associadas a esse subtipo podem afetar a associação dos polipeptídeos, a formação e a estabilidade da tripla hélice ou, ainda, causar alguma modificação conformacional na proteína (Figura 12) (Varki *et al.*, 2007; Dang e Murrell, 2008). Os polipeptídeos formados nesses casos ainda são capazes de formar um pequeno número de fibrilas de ancoragem, mesmo que instáveis, o que explica o fenótipo mais atenuado em relação ao subtipo grave da doença (Jarvikallio *et al.*, 1997; Dang e Murrell, 2008).

Nesse mesmo sentido, a forma localizada da EBDR está correlacionada a variantes que afetam minimamente a formação das fibrilas de ancoragem, seja reduzindo sua expressão ou através de leve alteração conformacional ou de estabilidade (Gardella *et al.*, 1996; Hovnanian *et al.*, 1997; Terracina *et al.*, 1998). Curiosamente, as variantes mais descritas em casos de EBDR-localizada são as que ocorrem em sítios de *splice* (Gardella *et al.*, 1996; Terracina *et al.*, 1998; Toyonaga *et al.*, 2015). Variantes de *splice* estão associadas a uma diversidade de fenótipos, dependendo da sua influência para a sequência da proteína formada. Na forma localizada, elas usualmente resultam na excisão de éxons inteiros (“*exon skipping*”), entretanto, sem alterar o restante da sequência da proteína. Estudos vêm demonstrando que essas variantes não alteram a totalidade dos transcritos formados, mas apenas uma parcela deles, possibilitando a formação de transcritos normais em quantidade considerável. Isso permite a montagem das fibrilas de ancoragem com apenas pequenos

defeitos funcionais, o que justifica o fenótipo tão leve dos pacientes (Gardella *et al.*, 1996; Terracina *et al.*, 1998; Schwieger-Briel *et al.*, 2015; Toyonaga *et al.*, 2015).

A forma dominante de EBD usualmente envolve substituições de glicina no domínio colagenoso de tripla hélice, embora outras substituições, inserções, deleções e variantes em sítio de *splice* também tenham sido descritas (Sakuntabhai *et al.*, 1998; Whittock *et al.*, 1999; Varki *et al.*, 2007; Dang e Murrell, 2008). Essas variantes afetam aminoácidos essenciais para a estrutura da tripla hélice e, por isso, estão associadas à diminuição da estabilidade das fibrilas de ancoragem (Figura 12) (Varki *et al.*, 2007; Dang e Murrell, 2008; Chung e Uitto, 2010). Alguns aminoácidos estão posicionados em segmentos mais importantes para a estrutura do colágeno VII e algumas substituições afetam a formação da molécula de forma mais significativa que outras. Assim, a natureza e a posição da variação genética estão intimamente correlacionadas ao fenótipo resultante (Hammami-Hauasli *et al.*, 1998; Dang e Murrell, 2008).

## **2.5. Epidermólise Bolhosa Kindler**

A EB Kindler (EBK), antes conhecida como Síndrome de Kindler, foi apenas recentemente classificada como um dos tipos principais de epidermólise bolhosa, a partir da constatação de que as bases clínicas e biológicas envolvidas são compatíveis com EB (Fine *et al.*, 2008; Fine *et al.*, 2014; Has *et al.*, 2020). Trata-se de um subtipo raro de EB, relatado em aproximadamente 250 indivíduos em todo o mundo, desde sua primeira descrição (Has *et al.*, 2020). A apresentação clínica da EBK pode mimetizar diversos subtipos de EB, dificultando o diagnóstico em muitos casos (Fine *et al.*, 2008; Chmel *et al.*, 2015; Youssefian *et al.*, 2015). A EBK foi diferenciada dos demais três tipos de EB por apresentar características peculiares. Em primeiro lugar, diferentemente dos outros tipos, na EBK a clivagem da pele pode ocorrer em múltiplas camadas (intraepidérmica, juncional ou sublâmina densa), impedindo sua inclusão dentro de um dos outros grupos da doença. Além disso, características clínicas distintas são muito comuns na EBK, especialmente a poiquilodermia, que combina a hiper ou hipopigmentação da pele e a ocorrência de aglomerados de vasos sanguíneos logo abaixo da pele (telangiectasias), e fotossensibilidade, que se manifesta como eritema e queimadura na pele após exposição ao sol (Fine *et al.*, 2008; Fine *et al.*, 2014; Youssefian *et al.*, 2016). O fenótipo característico da EBK é usualmente

progressivo e inclui, além da poiquilodermia e da fotossensibilidade, a formação de bolhas e a extensa atrofia da pele. Achados extracutâneos da EBK incluem erosões na gengiva e envolvimento ocular, esofágico, gastrointestinal e geniturinário (Has *et al.*, 2011; Fine *et al.*, 2014).

A EBK apresenta herança autossômica recessiva e é causada por alterações no gene *FERMT1*, que codifica a kindlina-1, uma proteína associada às integrinas e às adesões focais (Jobard *et al.*, 2003; Guerrero-Aspizua *et al.*, 2019). Na pele, a kindlina-1 se localiza junto aos queratinócitos basais e atua como uma proteína adaptadora das adesões focais, ligando os filamentos de actina às proteínas da membrana (Goult *et al.*, 2009; Has *et al.*, 2011). Em pacientes com EBK, os queratinócitos se tornam desorganizados, perdendo sua estrutura característica e sua polarização, além de ter sua proliferação reduzida. Estudos *in vitro* demonstraram que a perda da função da kindlina-1 está associada à anormalidade no formato celular e à alteração nos processos de adesão, proliferação e motilidade das células (Herz *et al.*, 2006; Has *et al.*, 2011). Essas alterações resultam de perturbações nas adesões focais que, em situações normais, garantem a ancoragem do citoesqueleto às plataformas de sinalização das integrinas (Harburger e Calderwood, 2009; Moser *et al.*, 2009). A kindlina-1 compõe o complexo de adesão da integrina  $\beta 1$  e participa da formação das adesões focais, o que explica as consequências da perda de sua função para a estrutura e adesão das células da pele e justifica o fenótipo de fragilidade cutânea associado (Has *et al.*, 2011; Chmel *et al.*, 2015; Guerrero-Aspizua *et al.*, 2019).

Um total de 84 diferentes variantes patogênicas já foram descritas em *FERMT1* (HGMD *database* - [www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk)), a maior parte delas associadas à formação de códon de parada prematura e consequente perda de função da kindlina-1. Outras variantes, entretanto, também foram identificadas, incluindo substituições de aminoácidos, variantes em sítios de *splice* e variantes intrônicas (Has *et al.*, 2011; Chmel *et al.*, 2015; Youssefian *et al.*, 2015; Guerrero-Aspizua *et al.*, 2019). Uma vez que a maior parte das variantes são nulas, resultando na ausência da kindlina-1, correlações genótipo-fenótipo não são bem estabelecidas para a EBK, visto que a natureza ou a posição da variante não parecem influenciar significativamente a apresentação clínica. Embora os sinais clínicos da EBK sejam comuns aos pacientes com variantes nulas, existe uma evidente variabilidade clínica, sugerindo uma influência de fatores ambientais e/ou epigenéticos (Has *et al.*, 2011).

## 2.6. Outras Desordens de Fragilidade da Pele

A fragilidade da pele, além de ser característica dos subtipos clássicos de EB, também está presente em outros grupos de doenças hereditárias, tais como as desordens de descamação da pele, as erosivas, as hiperkeratóticas e as do tecido conectivo, apresentadas na Tabela 4 (Has *et al.*, 2020). Essas doenças se assemelham à EB no que diz respeito às alterações nas camadas da pele e/ou nos mecanismos patogênicos envolvidos e, portanto, devem ser consideradas para o diagnóstico diferencial, especialmente em casos de recém-nascidos (Has *et al.*, 2020).

Embora não estejam incluídos como EB ‘clássica’, essas desordens apresentam como marcantes características fenotípicas a fragilidade da pele e, frequentemente, das mucosas, envolvendo os mesmos sinais clínicos e necessidades de saúde. Dessa forma, para fins de prestação de assistência médica e socioeconômica, recomenda-se considerar tais desordens juntamente com as formas clássicas de EB (Has *et al.*, 2020).

**Tabela 4. Outras desordens de fragilidade da pele.**

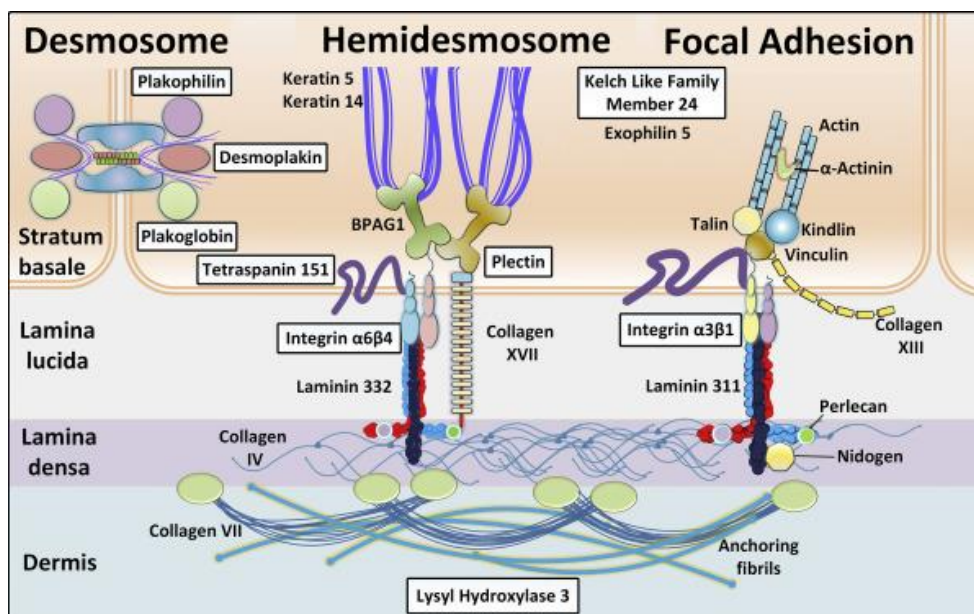
Nível de Clivagem na Pele	Nome da Desordem		Padrão de Herança	Gene (Proteína) Alterados
Intraepiderme	Desordens de descamação da pele		AR	<i>TGM5</i> (Transglutaminase 5) <i>CSTA</i> (Cistatina A) <i>CTSB</i> (Catepsina B) <i>SERPINB8</i> (Serpina B8) <i>FLG2</i> (Filagrina 2) <i>CDSN</i> (Corneodesmosina) <i>CAST</i> (Calpastatina) <i>DSG1</i> (Desmogleína 1) <i>SPINK5</i> (LEKTI)
Intraepiderme	Desordens de fragilidade de pele erosivas		AR	<i>DSP</i> (Desmoplaquina) <i>JUP</i> (Placoglobina) <i>PKP1</i> (Placofilina 1) <i>DSC3</i> (Desmocolina 3) <i>DSG3</i> (Desmogleína 3)
Intraepiderme	Desordens hiperkeratóticas com fragilidade da pele	Ictioses queratinopáticas	AD	<i>KRT1</i> (Queratina 1) <i>KRT10</i> (Queratina 10) <i>KRT2</i> (Queratina 2)
			AR	<i>KRT10</i> (Queratina 10)
		Paquioníquia congênita	AD	<i>KRT6A</i> (Queratina 6A) <i>KRT6B</i> (Queratina 6B) <i>KRT6C</i> (Queratina 6C) <i>KRT16</i> (Queratina 16) <i>KRT17</i> (Queratina 17)
Derme	Desordem sindrômica do tecido conectivo com fragilidade da pele		AR	<i>PLOD3</i> (Lisil hidroxilase 3)

AD: Autossômica Dominante; AR: Autossômica Recessiva. Tabela modificada de Has *et al.* (2020).

## 2.7. Diagnóstico de Epidermólise Bolhosa

Como aqui apresentado, a EB compreende quatro formas principais e mais de 30 subtipos diferentes, que se caracterizam por uma ampla variedade de sinais clínicos. Periodicamente, pesquisadores de todo o mundo se reúnem para atualizar os critérios de diagnóstico e a classificação dos subtipos de EB (Fine *et al.*, 1991; Fine *et al.*, 2000; Fine *et al.*, 2008; Fine *et al.*, 2014). O objetivo da classificação é conseguir particularizar em diferentes grupos toda a heterogeneidade genética e clínica da doença, a fim de auxiliar o preciso diagnóstico e subclassificação. Entretanto, muitos dos sinais clínicos se sobrepõem entre os subtipos, evidenciando que a classificação da EB, em grande parte dos casos, não é tão óbvia (van den Akker *et al.*, 2009; Fine *et al.*, 2014). Na realidade, o que se nota dentro das diferentes formas de EB é um espectro contínuo de gravidade fenotípica. Casos mais graves são, em geral, mais fáceis de se classificar, enquanto os casos que se enquadram ao longo desse contínuo exigem análises adicionais além da observação clínica apenas.

Levando em consideração os inúmeros complexos proteicos que estreitamente interagem a fim de fornecer integridade e adesão às camadas da pele (Figura 13), é de se esperar que diferentes alterações genéticas afetem de forma distinta cada um desses componentes, acarretando em consequências diversas para a estruturação da pele e, em última análise, resultando nos diversos fenótipos conhecidos da EB (Has e Bruckner-Tuderman, 2014; Has *et al.*, 2019; Vahidnezhad *et al.*, 2019a). O preciso diagnóstico e a subclassificação correta da EB possibilitam a indicação prognóstica da gravidade da doença, o aconselhamento genético para o paciente e familiares, o diagnóstico genético pré-natal ou pré-implantacional, a inclusão em ensaios clínicos e a medicina de precisão (Has *et al.*, 2019). A confirmação do diagnóstico de EB pode ser realizada através de: (a) mapeamento por imunofluorescência, a partir da análise de biópsia de pele; (b) microscopia eletrônica de transmissão, através da análise da ultraestrutura da pele; ou (c) análise genética direta dos genes associados à EB (Has e Fischer, 2019; Has *et al.*, 2019).



**Figura 13. Representação esquemática dos componentes e complexos responsáveis pela integridade da adesão célula-célula dos queratinócitos e pela associação da epiderme à derme através da zona da membrana basal.** As proteínas indicadas fazem parte desses complexos de adesão, a maior parte delas estando associadas aos fenótipos de EB. Fonte: Vahidnezhad *et al.* (2019c).

O mapeamento por imunofluorescência (MIF), ou imunomapeamento, é um dos métodos empregados para a determinação do tipo principal de EB e, muitas vezes, da provável proteína que está alterada (Fine *et al.*, 2008). O método se baseia na utilização de anticorpos monoclonais contra proteínas da junção derme-epiderme, o que possibilita que se identifique a camada da pele onde a clivagem ocorre e a abundância relativa das proteínas (Has e He, 2016). Trata-se de uma ferramenta importante para o diagnóstico, especialmente dos casos de maior gravidade da doença, quando a expressão da proteína alterada é ausente ou muito reduzida (Yiasemides *et al.*, 2006; Has e He, 2016). Para os casos de menor gravidade, a clivagem da pele pode não ser identificada na amostra e, da mesma forma, podem não ser observadas alterações na imunorreatividade dos marcadores utilizados, levando a frequentes resultados inconclusivos (Has e He, 2016).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) possibilita a visualização e a avaliação semiquantitativa de estruturas presentes nas camadas da pele, como os filamentos de queratina, os desmosossomos, os hemidesmosossomos, os filamentos de ancoragem e as fibrilas de ancoragem. Assim, a MET proporciona a identificação de alterações dessas estruturas em relação à sua quantidade e aparência, que se correlacionam aos distintos subtipos de EB (Yiasemides *et al.*, 2006; Fine *et al.*, 2008). A interpretação dos resultados, entretanto, requer um significativo conhecimento acerca das estruturas de adesão célula-

célula e célula-matriz e sua aparência na pele normal e na pele com EB (Has *et al.*, 2019). Além disso, existem poucos laboratórios no mundo que realizam a MET para análise de EB, sendo, por isso, uma técnica pouco empregada para o diagnóstico da doença (Fine *et al.*, 2008).

O teste genético fornece o diagnóstico definitivo do subtipo de EB, o padrão de herança associado e a variante patogênica causal (Fine *et al.*, 2008). Três métodos principais são utilizados para a análise genética: (a) sequenciamento de Sanger; (b) sequenciamento de um painel de genes através de sequenciamento de nova geração (do inglês *next-generation sequencing*, NGS); (c) sequenciamento do exoma inteiro por NGS (Has *et al.*, 2019). O sequenciamento de Sanger é uma excelente abordagem quando se conhece o gene candidato, que pode ser inferido a partir de exames prévios (como MIF e MET), ou que pode ser sugerido quando o fenótipo é claramente típico de um subtipo específico. Quando não se tem a definição do gene candidato, o sequenciamento de Sanger se torna um método muito trabalhoso e de alto custo, já que envolve a análise de todos os éxons dos genes em análise (Has e Fischer, 2019; Has *et al.*, 2019). O painel de genes por NGS possibilita a análise rápida de múltiplos genes simultaneamente, sendo uma efetiva abordagem quando não se conhece o gene candidato (Has e Fischer, 2019; Has *et al.*, 2019). O sequenciamento do exoma completo permite a análise da maior parte das regiões codificadoras de proteínas, sendo também uma útil ferramenta quando não se conhece o gene candidato. A vantagem deste método em relação ao painel de genes é a possibilidade de descoberta de novos genes associados à doença. A desvantagem se refere à maior complexidade para análise e interpretação dos dados, exigindo expertise e recursos computacionais adicionais, o que consome mais tempo até o diagnóstico final (Has *et al.*, 2019).



## **CAPÍTULO II – JUSTIFICATIVA**

---

A epidermólise bolhosa (EB) hereditária compreende um grupo de doenças de amplo espectro de gravidade. No extremo mais grave, os sinais clínicos são profundamente debilitantes, envolvendo mutilação de membros, quadros de inflamações e infecções recorrentes, dor crônica e letalidade precoce. Não há, até o momento, cura para EB e os tratamentos propostos são apenas sintomáticos. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado potenciais abordagens terapêuticas para pacientes com EB que carregam mutações específicas, compreendendo o que chamamos de medicina personalizada (Bornert *et al.*, 2016; Atanasova *et al.*, 2017; Woodley *et al.*, 2017; Izmiryán *et al.*, 2018). A identificação das variantes causais da EB é essencial para o desenvolvimento de novas terapias e permitirá, em um futuro próximo, a indicação da abordagem terapêutica mais adequada para cada paciente.

Existem poucos estudos relacionados à EB no Brasil e a maior parte deles descreve relatos de casos únicos com foco nos achados clínicos. Estudos genéticos são necessários para se estabelecer as bases genéticas da EB no Brasil, uma vez que o *background* genético único da população brasileira pressupõe que um espectro distinto de variantes raras e recorrentes pode estar envolvido. Estabelecer a prevalência de variantes, identificando as mais recorrentes em uma população, tem importante implicação para a definição de prioridades em testes genéticos futuros, bem como pode oferecer alternativas custo-eficazes para os métodos tradicionais de diagnóstico laboratorial. Mais ainda, o diagnóstico genético dos pacientes possibilita o aconselhamento genético da família, o diagnóstico genético pré-natal e pré-implantacional e, muitas vezes, o prognóstico da doença para cada paciente.

Por fim, a EB é uma doença complexa que inclui uma notável heterogeneidade genética. Ainda que muitos dos componentes moleculares envolvidos na EB sejam conhecidos, existe um vasto campo a explorar acerca dos mecanismos de patogenicidade envolvidos. As correlações genótipo-fenótipo não são completamente entendidas e a maior suscetibilidade de alguns pacientes a sinais clínicos específicos também não é explicada. Os estudos genéticos permitirão preencher algumas lacunas do complexo quebra-cabeças que são as bases moleculares da EB.

## **CAPÍTULO III – OBJETIVOS**

---

**OBJETIVO GERAL:**

Investigar as bases genéticas e as características clínicas de pacientes com epidermólise bolhosa do Brasil.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Estimar a prevalência de variantes patogênicas em pacientes com epidermólise bolhosa do Brasil e descrever variantes novas e recorrentes na população estudada;
- Realizar a caracterização clínica dos pacientes com epidermólise bolhosa e investigar potenciais correlações genótipo-fenótipo;
- Avaliar a concordância entre a hipótese clínica inicial e o resultado genético definitivo e investigar o efeito das variantes associadas aos fenótipos atípicos;
- Estabelecer um método viável e eficiente para análise genética de pacientes com epidermólise bolhosa a partir de um painel de genes baseado em sequenciamento de nova geração.

## CAPÍTULO IV

---


### ARTIGO 1

**An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil:  
discovery of novel and recurrent disease-causing variants**

Artigo publicado na revista *Clinical Genetics*

## ORIGINAL ARTICLE

# An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants

Luiza M. Mariath<sup>1</sup> | Juliana T. Santin<sup>2</sup> | Jeanine A. Frantz<sup>3,4</sup> | Maria J.R. Doriqui<sup>5</sup> | Ana E. Kiszewski<sup>6,7</sup> | Lavínia Schuler-Faccini<sup>1,8</sup> 

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Brazil

<sup>4</sup>Board of Directors, DEBRA Brasil (Epidermolysis Bullosa Research Association of Brazil), Blumenau, Brazil

<sup>5</sup>Section of Medical Genetics, Hospital Infantil Dr. Juvêncio Mattos, São Luís, Brazil

<sup>6</sup>Section of Dermatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>7</sup>Section of Pediatric Dermatology, Hospital da Criança Santo Antônio, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>8</sup>Department of Genetics, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INaGeMP), Porto Alegre, Brazil

## Correspondence

Luiza M. Mariath and Lavínia Schuler-Faccini, Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Email: luiza\_mariath@hotmail.com and lavinia.faccini@ufrgs.br

## Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul; Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Grant/Award Number: 465549/2014-4

## Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/cge.13555/>

## Abstract

Epidermolysis bullosa (EB) is a genodermatosis that encompasses a group of clinically and genetically heterogeneous disorders classified in four major types: EB simplex (EBS), junctional EB (JEB), dystrophic EB (DEB) and Kindler syndrome. Our aim was to characterize recurrent and novel mutations associated to EB in a sample of Brazilian patients. Eighty-seven patients (25 EBS, 4 JEB and 58 DEB) were studied. We performed a next-generation sequencing-based multigene panel through ion torrent technology including 11 genes: *KRT5*, *KRT14*, *PLEC*, *TGM5*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *COL7A1*, and *FERMT1*. A total of 72 different pathogenic or likely pathogenic variants were identified, 32 of them are novel. The causal variant was detected in 82 patients (efficiency of 94.3%). Pathogenic variants in the residue 125 of *KRT14* were identified in 32% of all EBS patients. In DEB patients, four *COL7A1* variants were quite frequent, some of them clustered in specific Brazilian regions. Our study extends the spectrum of known mutations in EB and describes, for the first time, the genetic profile of EB patients from Brazil.

## KEYWORDS

epidermolysis bullosa, gene panel, genetic disease, genodermatosis, next-generation sequencing, pathogenic variant

## 1 | INTRODUCTION

Epidermolysis bullosa (EB) is a clinically and genetically heterogeneous group of genetic skin disorders classified in four major types: EB simplex (EBS), junctional EB (JEB), dystrophic EB (DEB), and Kindler syndrome (KS), based on the level of skin within which blisters develop.<sup>1</sup> The common characteristic is the fragility of the skin, which readily blister following a minimal friction or mechanical trauma.<sup>2,3</sup>

EBS is characterized by intraepidermal blistering. About 75% of EBS cases are due to *KRT5* or *KRT14* mutations,<sup>4</sup> encoding the basal keratins 5 (K5) and 14 (K14), although at least other nine genes have also been implicated.<sup>1</sup> The K5 and K14 interaction provides strength and flexibility to basal keratinocytes.<sup>4,5</sup> Mutations in *PLEC* gene, encoding plectin, an important protein that connects keratins to the hemidesmosomal plaque, underlie EBS in 8% of patients.<sup>6</sup> Most EBS cases are inherited in a dominant manner, resulting preferentially from missense mutations, although several rare cases of autosomal recessive inheritance have been reported.<sup>7,8</sup> Recently, acral peeling skin syndrome, caused by mutations in *TGM5*, has been classified as a subtype of EBS.<sup>1</sup>

In JEB, the blisters develop within the lamina lucida, that is, the junction of the skin basement membrane zone.<sup>1</sup> Mutations in nearly 8 genes have been implicated in JEB, with autosomal recessive mode of inheritance.<sup>1,9</sup> Loss-of-function mutations in *LAMA3*, *LAMB3* and *LAMC2*, leading to complete loss of laminin 332, as well as mutations in *COL17A1*, encoding type XVII collagen, encompass the main genetic basis underlying JEB.<sup>1,10</sup> Rare cases of JEB are associated with integrin  $\alpha 6\beta 4$  deficiency (encoded by *ITGB4* and *ITGA6*).<sup>1,10</sup>

DEB is characterized by blistering within the uppermost dermis and results from mutations in *COL7A1* gene, encoding type VII collagen, a major component of the anchoring fibrils providing stable dermal-epidermal adhesion.<sup>1,11,12</sup> DEB is inherited either by autosomal dominant (DDEB) or recessive (RDEB) manner. DDEB is usually associated to glycine substitutions within the triple helix of *COL7A1*, although other missense mutations, deletions and splice-site mutations have been reported in several rare cases.<sup>12</sup> In RDEB, mutations include nonsense, splice site, deletions or insertions, and missense variants.<sup>12,13</sup> Although glycine substitutions are primarily associated to DDEB, some of them act recessively, and, to add more complexity, some specific glycine substitutions were reported in both DDEB and RDEB.<sup>14</sup>

In KS, there is a mixed pattern of blistering, as cleavage can occur within the basal keratinocytes, within the lamina lucida or below the lamina densa.<sup>1</sup> Pathogenic variants in *FERMT1* are implicated in this disease, classified as EB type in 2008.<sup>1,2</sup>

Although EB is one of the most common inherited skin disorders,<sup>15,16</sup> with a birth prevalence of 1.9/100000 in Europe,<sup>17</sup> epidemiological and genetic data in Brazil are scarce. The few published studies from Brazilian EB patients usually consist of small samples or case reports, addressing mainly clinical data and rarely include genetic analysis.<sup>18-21</sup> Our aim was to characterize the genetic basis of EB in Brazil, estimating the prevalence of recurrent and novel EB variants, using a next-generation sequencing (NGS)-based multigene panel.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Subjects and ethical aspects

Eighty-seven patients were enrolled in the study. Diagnostic criteria for the classification of the EB types and subtypes were based on clinical features and family history, according to the consensus from Fine et al.<sup>1</sup> In some doubtful cases, skin biopsy, immunofluorescence, and/or electron microscopy were performed to support diagnosis. The patients were recruited in the following medical centers: Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Hospital Infantil Dr. Juvêncio Mattos, and collaborating institutions, and also through the Epidermolysis Bullosa Research Association of Brazil (DEBRA-Brasil) and the society of EB patients and families from Distrito Federal (APPEB-DF), Santa Catarina (AAPAPEB), Paraná (Appapeb), and São Paulo (AAPEB-SP). Most patients (50.6%) were from southern Brazil, as a result of the proximity to the clinical centers participating in the study; however, at least one patient from each Brazilian region was included in this study. All patients assigned a written informed consent to participate in the research and were subjected to clinical examination. This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (project number 31608) and Plataforma Brasil (protocol number 2.481.885).

### 2.2 | Molecular analysis

DNA was extracted from saliva and/or whole blood samples using the Oragene-DNA OG-500 (DNA Genotek, Kanata, Canada) kit and the Pure Link Genomic DNA (Invitrogen) kit, respectively, according to manufacturer's instructions.

An NGS-based multigene panel specific for EB was designed, including the 11 genes which, to our knowledge, are associated to most cases of EB and reaching all the main EB types: *KRT5* (NM\_000424.3), *KRT14* (NM\_000526.4), *PLEC* (NM\_000445.4), *TGM5* (NM\_201631.3), *LAMA3* (NM\_000227.4), *LAMB3* (NM\_000228.2), *LAMC2* (NM\_005562.2), *COL17A1* (NM\_000494.4), *ITGB4* (NM\_000213.4), *COL7A1* (NM\_000094.3), and *FERMT1* (NM\_017671.4). The panel was designed using AmpliSeq Designer software (Thermo Fisher Scientific), and included 574 amplicons and a total size of 62.72 kb.

Amplicon library was prepared using the Ion AmpliSeq Library kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). NGS was performed through Ion Torrent technology using an Ion 318 sequencing chip on an Ion Personal Genome Machine and the Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). Data from Ion Torrent runs were analyzed using the platform-specific pipeline software Torrent Suite 5.0.5; poor quality reads were filtered out. The sequences were aligned to hg19 human reference genome. The Ion Reporter software (v 5.10) was used for variant calling and annotation. The average base coverage depth was 399.9, and the uniformity of base coverage was 94.2%. The variants were reviewed and checked in the Ensembl Variant Effect Predictor software, and the mapped reads were visualized in the Integrative Genomics Viewer software.

## 2.3 | In silico analysis

The identified variants were investigated in the following databases: human gene mutation database (HGMD),<sup>22</sup> ClinVar,<sup>23</sup> Leiden Open Variation Database,<sup>24</sup> Genome Aggregation Database and Exome aggregation consortium,<sup>25</sup> and Online Archive of Brazilian Mutations.<sup>26</sup> Variants in *COL7A1* gene were additionally sought in COL7A1 Gene Variants Database.<sup>27,28</sup> The following prediction tools were used to estimate the impact of variants: sorting intolerant from tolerant (SIFT),<sup>29</sup> Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN),<sup>30</sup> Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2),<sup>31</sup> Mutation Taster,<sup>32</sup> and Human Splicing Finder.<sup>33</sup> Bioinformatic tools were used to classify all variants according to the American College of Medical Genetics guidelines.<sup>34</sup> All likely pathogenic variants were considered with pathogenic variants, and collectively named pathogenic variants hereafter.

## 3 | RESULTS

Table 1 presents the EB subtypes of the 87 patients studied (25 EBS, 4 JEB and 58 DEB). Seventy-two different pathogenic variants in eight distinct genes were identified (Tables 2 and 3). To our knowledge, 32 (44.4%) of them have not been described to date in EB literature and

**TABLE 1** Distribution of EB subtypes in patients included in this study

EB type	N (%)	EB subtype <sup>a</sup>	N
EBS	25 (28.7)	EBS, localized	8
		EBS, generalized	9
		EBS with mottled pigmentation	1
		EBS, recessive localized	1
		EBS, recessive generalized	2
		EBS (only clinical diagnosis)	4
		JEB	4 (4.6)
		JEB, generalized severe	1
		JEB (only clinical diagnosis)	1
Dystrophic EB	58 (66.7)	DDEB, localized	5
		DDEB, generalized	3
		DDEB, pretibial	1
		DDEB, no clinical data	1
		RDEB, localized	16
		RDEB, generalized intermediate	12
		RDEB, generalized severe	15
		RDEB inversa	1
		RDEB, pretibial	1
		RDEB, not defined	2
		RDEB, no clinical data	1
Total	87		

Abbreviations: DDEB, dominant dystrophic EB; EB, epidermolysis bullosa; EBS, EB simplex; JEB, junctional EB; RDEB, recessive dystrophic EB.

<sup>a</sup>The classification was performed through the analysis of clinical and genetic data.

in the HGMD. The identification of the causal mutation(s) and the consequent determination of the type of EB were achieved in 94.3% (82/87) of the studied patients. No pathogenic variants were identified in *LAMA3*, *ITGB4* and *FERMT1* genes. In order to estimate the prevalence of EB pathogenic variants in the Brazilian population, Table 2 (EBS and JEB) and Table 3 (DEB) show the number of identified alleles carrying each pathogenic variant and its respective frequency.

In the 25 EBS patients, 15 distinct pathogenic variants were identified; seven of them (46.7%) unreported to date (Table 2). We failed to identify the causative mutation in four EBS patients. Variants affecting the highly conserved arginine in residue 125 of *KRT14* were the most frequent in EBS patients, either replacing arginine with cysteine or histidine, being present in 8 of the 25 EBS patients (32%). One variant in *KRT14* and one in *PLEC* were identified in homozygosis in two autosomal recessive EBS cases. In one case, the common *TGM5* variant p.Gly113Cys, associated to acral peeling skin syndrome, was identified in homozygosis.

Five JEB pathogenic variants (four novel) were identified in three patients: one homozygous for a mutation in *LAMC2*, while the other two were compound heterozygotes for *LAMB3* and *COL17A1* variants (Table 2). We failed to find the disease-causing variant in one of the four JEB patients here studied.

In patients with DEB, 52 distinct pathogenic variants were identified in *COL7A1*, 21 of them (40.4%) had not been previously reported. Forty-four were found exclusively associated to RDEB cases, while six were identified only in DDEB and two were present in both RDEB and DDEB patients. Table 3 presents all pathogenic variants found in the studied DEB patients. The most frequent *COL7A1* variants were: c.5047C>T (p.Arg1683Ter) presented in 12 alleles; c.325\_326insCG (p.Glu109fs) and c.7380+2T>C carried in nine alleles each one; and the novel variant c.1758delC (p.Ser587Valfs) presented in seven alleles.

Figure 1 illustrates the distribution of the identified 21 novel *COL7A1* pathogenic variants along the protein domains. Figure 2 discloses the spatial distribution in the Brazilian regions of the four most frequent *COL7A1* variants identified in patients with DEB. Table S1 presents the variants of uncertain significance found in the studied EB patients.

## 4 | DISCUSSION

We have developed an NGS-based multigene panel specific for EB including the 11 genes implicated in the majority of cases. The panel was designed to be cost-effective, providing a possible way to solve a greater number of genetic diagnosis for a reasonable cost. Therefore, some genes with known association to rare EB cases were not included in the panel. We identified the disease-causing variants and consequently predicted the EB type of 82 from the 87 patients, resulting in an efficiency of 94.3%. Vahidnezhad et al developed a multigene panel including 21 genes and found an efficiency of 83.5% predicting the subtype of EB in 76 out of 91 families.<sup>39</sup> Has et al elucidated 90% (36 of 40) of the studied cases by a NGS-panel that included 49 genes.<sup>40</sup> Finally, Lucky et al found an efficiency of 97.7%



**TABLE 2** Frequency of the identified pathogenic/likely pathogenic variants in Brazilian EBS and JEB patients

EB type	Pathogenic/likely pathogenic variants	N (alleles)	Frequency	Variant first reported in reference
EBS	<i>KRT14</i> , c.373C>T, p.Arg125Cys	5	0.2	Coulombe et al <sup>56</sup>
	<i>KRT14</i> , c.374G>A, p.Arg125His	3	0.12	Coulombe et al <sup>56</sup>
	<b><i>KRT14</i>, c.606delC, p.Lys203fs<sup>a</sup></b>	2	<b>0.08</b>	<b>This study</b>
	<b><i>PLEC</i>, c.6697dupG, p.Asp2233fs<sup>a</sup></b>	2	<b>0.08</b>	<b>This study</b>
	<i>TGM5</i> , c.337G>T, p.Gly113Cys <sup>a</sup>	2	0.08	Cassidy et al <sup>35</sup>
	<b><i>KRT5</i>, c.598T&gt;C, p.Trp200Arg<sup>a</sup></b>	2	<b>0.08</b>	<b>This study</b>
	<i>KRT5</i> , c.74C>T, p.Pro25Leu	1	0.04	Uttam et al <sup>57</sup>
	<i>KRT5</i> , c.427G>T, p.Val143Phe	1	0.04	Kang et al <sup>58</sup>
	<b><i>KRT5</i>, c.528C&gt;G, p.Asn176Lys</b>	1	<b>0.04</b>	<b>This study</b>
	<b><i>KRT5</i>, c.545T&gt;C, p.Phe182Ser</b>	1	<b>0.04</b>	<b>This study</b>
	<i>KRT5</i> , c.555+1G>A, p.?	1	0.04	Rugg et al <sup>59</sup>
	<b><i>KRT5</i>, c.1396G&gt;C, p.Glu466Gln</b>	1	<b>0.04</b>	<b>This study</b>
	<b><i>KRT5</i>, c.1406C&gt;G, p.Thr469Ser</b>	1	<b>0.04</b>	<b>This study</b>
	<i>KRT5</i> , c.1411C>T, p.Arg471Cys	1	0.04	Arin et al <sup>8</sup>
	<i>PLEC</i> , c.5998C>T, p.Arg2000Trp	1	0.04	Koss-Harnes et al <sup>60</sup>
Total alleles:	25			
JEB	<b><i>LAMC2</i>, c.1066+1delG, p.?</b>	2	<b>0.333</b>	<b>This study</b>
	<i>LAMB3</i> , c.1132+5G>A, p.?	1	0.167	Nakano et al <sup>61</sup>
	<b><i>LAMB3</i>, c.2106delG, p.Gln702fs</b>	1	<b>0.167</b>	<b>This study</b>
	<b><i>COL17A1</i>, c.3171_3173delCTC, p.Tyr1057Ter</b>	1	<b>0.167</b>	<b>This study</b>
	<b><i>COL17A1</i>, c.2002+2T&gt;G, p.?</b>	1	<b>0.167</b>	<b>This study</b>
	Total alleles:	6		

Novel variants are highlighted in bold.

Abbreviations: EB, epidermolysis bullosa; EBS, EB simplex; JEB, junctional EB.

<sup>a</sup>EBS variants inherited in homozygosis.

(42/43 patients) in an NGS assay that included 21 genes, in which all the identified mutations were present in only five genes (*KRT5*, *KRT14*, *LAMB3*, *COL17A1*, *COL7A1*).<sup>41</sup> Therefore, our efficiency to detect the causative mutations was quite similar to that of other studies with larger panels. Taking into account the number of EB patients in Brazil and that the vast majority of them do not have access to genetic testing, we consider to have achieved quite satisfactory results, including a great number of patients from the whole country.

In total 72 pathogenic variants were identified, 15 of them associated to EBS, five to JEB and 52 to DEB. Although the majority of identified EB variants (52) were family specific, a few of them (20) were quite recurrent in Brazilian EB patients.

EBS was associated with *KRT5* and *KRT14* pathogenic variants in nine patients. These results are in accordance with previous reports indicating a similar ratio of *KRT5* and *KRT14* mutations in EBS.<sup>8,42</sup> Eight of the 25 (32%) EBS patients carried well-documented pathogenic variants affecting the residue Arg125 of *KRT14*. Although an approximate prevalence of 15% of these variants (p.Arg125Cys and p.Arg125His) has been estimated to all EBS cases,<sup>8</sup> values differ among studies. Bolling et al, for example, found

these variants in only five of a total of 76 EBS families (6.6%) from Netherlands.<sup>4</sup> The higher prevalence of variants in Arg125 residue of *KRT14*, suggests it may be the main genetic alteration of Brazilian EBS patients, which could guide the management of priorities on genetic testing.

In contrast to p.Arg125Cys and p.Arg125His in *KRT14*, the other identified EBS variants were all family specific. We identified two cases of recessive EBS caused by homozygous frameshift mutations in *KRT14* and *PLEC*. The few previous reports of recessive EBS are usually caused by null alleles rather than missense variants.<sup>43</sup> The well-documented variant p.Gly113Cys in *TGM5*, identified in a homozygous patient, is the most frequent mutation in patients with acral peeling skin syndrome,<sup>35,44</sup> recently recognized as an EBS subtype. Except for two frameshift (present in a total of four alleles) and one splice-site variants, the pathogenic EBS variants were predominantly missense (79.2% from all alleles). Indeed, missense variants are the main cause of EBS.<sup>4,7</sup> In total, seven novel EBS pathogenic variants were revealed—five missenses in *KRT5*, one frameshift in *KRT14*, and one frameshift in *PLEC*, expanding the range of known mutations in this EB type (Table 2).

**TABLE 3** Frequency of the identified pathogenic/likely pathogenic variants in Brazilian dystrophic EB patients

Pathogenic/likely pathogenic variants	N (alleles)	Frequency	Variant first reported in reference
COL7A1, c.5047C>T, p.Arg1683Ter	12	0.113	Sawamura et al <sup>36</sup>
COL7A1, c.325_326insCG, p.Glu109fs	9	0.085	Hovnanian et al <sup>37</sup>
COL7A1, c.7380+2 T>C, p.?	9	0.085	Cuadrado-Corrales et al <sup>38</sup>
<b>COL7A1, c.1758delC, p.Ser587fs<sup>a</sup></b>	<b>7</b>	<b>0.066</b>	<b>This study</b>
COL7A1, c.7957G>A, p.Gly2653Arg	4	0.038	Christiano et al <sup>62</sup>
COL7A1, c.887delG, p.Gly296fs	3	0.028	Christiano et al <sup>63</sup>
COL7A1, c.4011G>A, p.(Pro1337=)	3	0.028	van den Akker et al <sup>64</sup>
COL7A1, c.7078G>A, p.Gly2360Arg <sup>a</sup>	3	0.028	Almaani et al <sup>14</sup>
COL7A1, c.2005C>T, p.Arg669Ter	2	0.019	Cserhalmi-Friedman et al <sup>65</sup>
<b>COL7A1, c.2783_2784insGACAC, p.Gln929fs</b>	<b>2</b>	<b>0.019</b>	<b>This study</b>
COL7A1, c.4018C>T, p.Arg1340Ter	2	0.019	Hovnanian et al <sup>66</sup>
COL7A1, c.5819C>T, p.Pro1940Leu	2	0.019	Varki et al <sup>67</sup>
COL7A1, c.6022C>T, p.Arg2008Cys	2	0.019	Kon et al <sup>68</sup>
COL7A1, c.6082G>A, p.Gly2028Arg <sup>b</sup>	2	0.019	Lee et al <sup>69</sup>
COL7A1, c.6501G>A, p.(Pro2167=)	2	0.019	Christiano et al <sup>62</sup>
COL7A1, c.6527dupC, p.Gly2177fs	2	0.019	Hovnanian et al <sup>37</sup>
COL7A1, c.7249C>T, p.Gln2417Ter	2	0.019	Whitlock et al <sup>70</sup>
COL7A1, c.7864C>T, p.Arg2622Trp	2	0.019	Gardella et al <sup>71</sup>
<b>COL7A1, c.8109+1G&gt;T, p.?</b>	<b>2</b>	<b>0.019</b>	<b>This study</b>
<b>COL7A1, c.8191G&gt;T, p.Gly2731Cys</b>	<b>2</b>	<b>0.019</b>	<b>This study</b>
COL7A1, c.58_70delCGAGTGCGAGCCC, p.Arg20fs	1	0.009	Cuadrado-Corrales <sup>72</sup>
COL7A1, c.189delG, p.Leu64fs	1	0.009	Christiano et al <sup>73</sup>
COL7A1, c.553C>T, p.Arg185Ter	1	0.009	Hovnanian et al <sup>37</sup>
COL7A1, c.676C>T, p.Arg226Ter	1	0.009	Christiano et al <sup>74</sup>
COL7A1, c.2767G>A, p.Gly923Arg	1	0.009	Abu Sa'd et al <sup>15</sup>
COL7A1, c.4027C>T, p.Arg1343Ter	1	0.009	Hovnanian et al <sup>66</sup>
COL7A1, c.4288G>T, p.Gly1430Ter	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.4378C>T, p.Gln1460Ter	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5097+1G>A, p. <sup>b</sup>	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5124+1G>A, p.?	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5132_5133insTCACC, p.Gly1712fs	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5282G>A, p.Gly1761Asp	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5308G>C, p.Gly1770Arg <sup>b</sup>	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5321C>A, p.Pro1774His <sup>b</sup>	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5449C>T, p.Gln1817Ter	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5576_5577delAA, p.Lys1859fs	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5737G>T, p.Gly1913Cys	1	0.009	<b>This study</b>
COL7A1, c.5820G>A, p.(Pro1940=)	1	0.009	Terracina et al <sup>75</sup>
COL7A1, c.6016G>A, p.Gly2006Ser	1	0.009	Mallipedi et al <sup>76</sup>
COL7A1, c.6044G>A, p.Gly2015Glu <sup>b</sup>	1	0.009	Hammami-Hausli et al <sup>77</sup>
COL7A1, c.6100G>A, p.Gly2034Arg	1	0.009	Kon et al <sup>78</sup>
<b>COL7A1, c.6100_6120delGGGGAGCCTGGAAAGCCTGGT, p.Gly2034_Gly2040del<sup>b</sup></b>	<b>1</b>	<b>0.009</b>	<b>This study</b>
COL7A1, c.6205C>T, p.Arg2069Cys	1	0.009	Kahofe et al <sup>79</sup>
COL7A1, c.6698G>A, p.Gly2233Asp	1	0.009	Almaani et al <sup>80</sup>

**TABLE 3** (Continued)

Pathogenic/likely pathogenic variants	N (alleles)	Frequency	Variant first reported in reference
<b>COL7A1, c.6937G&gt;A, p.Gly2313Arg</b>	<b>1</b>	<b>0.009</b>	<b>This study</b>
<b>COL7A1, c.7246G&gt;A, p.Gly2416Ser</b>	<b>1</b>	<b>0.009</b>	<b>This study</b>
COL7A1, c.7344G>A, p.(Val2448=)	1	0.009	Gardella et al <sup>81</sup>
COL7A1, c.7411C>T, p.Arg2471Ter	1	0.009	Christiano et al <sup>62</sup>
<b>COL7A1, c.7420C&gt;T, p.Arg2474Cys</b>	<b>1</b>	<b>0.009</b>	<b>This study</b>
COL7A1, c.7738C>T, p.Arg2580Cys	1	0.009	<sup>c</sup>
<b>COL7A1, c.7756C&gt;T, p.Gln2586Ter</b>	<b>1</b>	<b>0.009</b>	<b>This study</b>
<b>COL7A1, c.7814G&gt;T, p.Gly2605Val</b>	<b>1</b>	<b>0.009</b>	<b>This study</b>
Total alleles:	<b>106</b>		

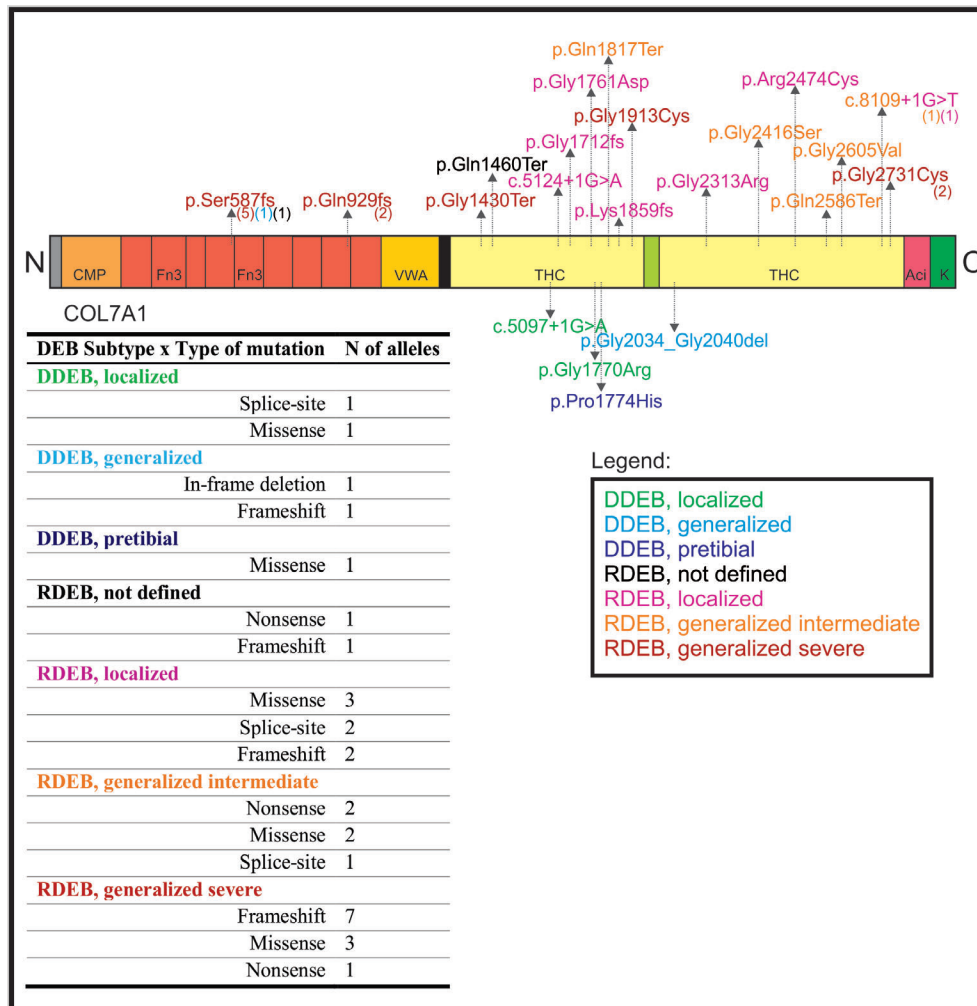
Novel variants are highlighted in bold.

Abbreviations: DDEB, dominant dystrophic EB; RDEB, recessive dystrophic EB.

<sup>a</sup>Variants found in both RDEB and DDEB patients.

<sup>b</sup>Variants found exclusively in DDEB alleles; all other variants (the ones not found in both RDEB and DDEB or exclusively in DDEB) were present only in RDEB patients.

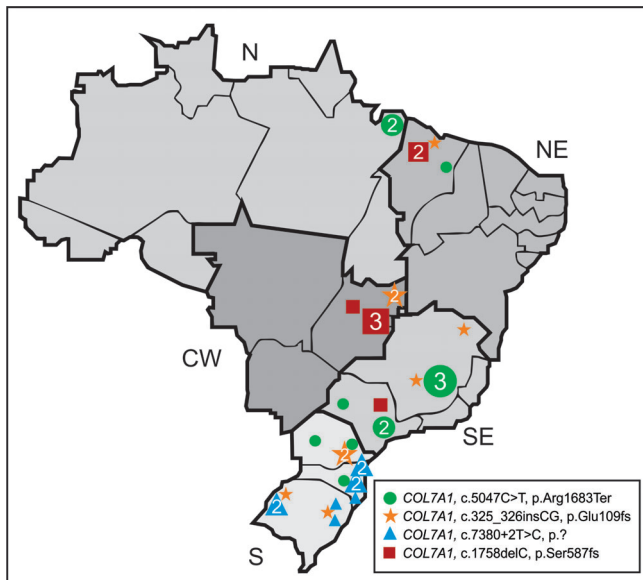
<sup>c</sup>Unpublished. Submitted by Laboratory of Molecular and Cell Biology, Istituto Dermatologico dell'Immacolata, Rome (Italy) at COL7A1 Gene Variants Database.<sup>27,28</sup>



**FIGURE 1** The identified 21 novel COL7A1 pathogenic/likely pathogenic variants. Upper variants were found in RDEB patients while the ones below were identified in DDEB; the exception is the variant p.Ser587fs, identified in both RDEB and DDEB. The variants are colored according to the associated EB subtype. Variants identified in more than one allele show the number of alleles associated to each EB subtype. The box shows the types of variants, as well as the number of alleles carrying these variants, identified in each DEB phenotype. Aci, acidic; CMP, cartilage matrix protein; Fn3, fibronectin III-like domains; K, kunitz module; THC, triple helical collagenous domain; VWA, von Willebrand factor A domain. Signal peptide in gray; cysteine & proline rich region in black. 39 amino acid “hinge” region in light green [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Genotype-phenotype correlations have been established in EBS.<sup>4,8,45</sup> Pathogenic variants in the highly conserved helix boundary motifs (HBMs) of the rod domains of K5 and K14 are commonly associated to EBS-generalized severe.<sup>4</sup> Variants causing the milder EBS-

localized occur sporadically across K5 and K14 sequences.<sup>46</sup> The novel pathogenic variants identified in this study reasonably fit with the previously established correlations. The variants p.Asn176Lys and p.Phe182Ser of KRT5, localized in the initiation HBM of K5 were



**FIGURE 2** Spatial distribution of the four most frequent *COL7A1* variants in the Brazilian territory. While the variant p.Arg1683Ter was present in different regions, c.7380+2T>C was only identified in southern Brazil [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

identified in two EBS-generalized patients (Figure S1). Homozygous pathogenic variants in *KRT5* and *KRT14* were also associated with EBS-generalized in two patients. Despite the knowledge about genotype and phenotype involved in EBS, divergences may occur, as that not only the nature and position of mutation, but also other genetic, epigenetic and environmental factors may influence the clinical outcome.<sup>4,8</sup>

As expected, JEB was the EB type with the lowest prevalence and associated to the most severe clinical symptoms and to the highest risk of infant mortality.<sup>47-49</sup> In developing countries such as Brazil, infant mortality may be even higher. Despite the limitation of the small number of JEB patients analyzed, we could disclose four novel pathogenic variants, all private to families (Table 2). The only one carried in homozygosis (c.1066+1delG in *LAMC2*) was identified in a patient from a consanguineous family.

Attempts to correlate genotype and phenotype in JEB have been addressed by several studies.<sup>10,50-52</sup> JEB-generalized severe is commonly associated to variants leading to premature termination codons (PTC), such as nonsense, insertions/deletions, and specific splice-site mutations, in both alleles of *LAMB3*, *LAMA3* or *LAMC2*, which lead to a truncated and non-functional laminin 332.<sup>10</sup> On the other hand, the milder subtype JEB-generalized intermediate involves, in general, one PTC variant and a second missense or splice-site variant that enable some laminin 332 expression.<sup>10</sup> Pathogenic variants in *COL17A1* are associate to a wide range of phenotypic variability, wherein milder manifestations are in general related to missense or splice site variants and some collagen XVII expression in the skin.<sup>51</sup> The JEB patients included in this study were, in general, in accordance to the established genotype-phenotype correlation (Figure S2). JEB-generalized severe was associated to compound heterozygosity of

one PTC causing variant and one splice-site variant in *LAMB3*. JEB-generalized intermediate, in turn, was described in a homozygous patient for a splice-site variant in *LAMC2* and in a milder case caused by compound heterozygosity of one PTC variant and one splice-site variant in *COL17A1* (Figure S2).

In five patients (four EBS and one JEB), the disease-causing variant was not identified suggesting the existence of large rearrangements not identified by NGS or, more likely, mutations in genes not included in our multigene panel. Mutations in at least additional six genes, such as *DSP*, *JUP*, *PKP1*, *EXPH5*, *DST*, and *KLHL24*, have been associated to EBS,<sup>1,45</sup> while rare mutations in *ITGA6* and *ITGA3* have been shown to cause JEB.<sup>1</sup> Table S2 presents the rare variants found in the five patients with unsolved genetic testing.

The dystrophic type of EB was the most represented in our sample, with 58 patients. In total, 52 different variants were disclosed, 21 of them representing pathogenic variants unreported to date, located in distinct protein domains (Table 3; Figure 1). A reasonable genotype-phenotype correlation has been shown in DEB, which points out the importance of the nature and the position of pathogenic variants in *COL7A1*, as well the consequences at mRNA and protein level, to the clinical manifestations.<sup>12</sup> RDEB-generalized severe usually is caused by bi-allelic PTC variants, while in RDEB-generalized other at least one allele carries a non-PTC variant.<sup>27</sup> The novel pathogenic variants identified in this study in general were in accordance to these assumptions. Novel PTC variants (including the frameshift and nonsense) were the main cause of RDEB-generalized severe (Figure 1), being, in most patients, carried in both alleles (Table S3). Nevertheless, it is important to note that the established genotype-phenotype correlations do not hold true for all DEB patients and modifier genes and environmental factors might influence the phenotypic manifestation.<sup>53</sup>

Few *COL7A1* variants were more prevalent in our sample. The c.5047C>T (p.Arg1683Ter) variant was identified in 12 alleles, representing 11.3% of all *COL7A1* alleles. This variant was first described in a compound heterozygous Japanese patient,<sup>36</sup> being subsequently identified in two Europeans subjects, also compound heterozygous.<sup>54,55</sup> Our finding, therefore, suggests that in Brazil this might be a frequent variant. As it was identified in patients from different Brazilian regions (Figure 2), additional studies will be important to investigate a possible common origin.

The pathogenic variant c.325\_326insCG (p.Glu109fs) was identified in nine alleles (8.5% of all *COL7A1* alleles). To the best of our knowledge, this variant has been previously reported in only two families from northern part of Portugal by Hovnanian et al<sup>37</sup> It is very intriguing the higher incidence of this variant in Brazil, which could be related to the Portuguese colonization of Brazil.

The splice site variant c.7380+2T>C was identified in other nine alleles (8.5% of all *COL7A1* alleles). It was previously described by Cuadrado-Corrales et al in a year-old patient with RDEB from Spain.<sup>38</sup> In a subsequent study, the authors have shown this variant results in the usage of a cryptic splice site in intron 96, leading to out-of-frame transcript.<sup>55</sup> Interestingly, in our study all patients carrying c.7380+2T>C variant were from southern Brazil (Figure 2), including three

homozygous patients. We suggested that a founder effect could explain the high frequency and the geographic clustering of c.7380+2T>C variant; however, additional haplotypes analyses are needed to verify this hypothesis.

Among the 21 novel variants, frameshift c.1758delC (p.Ser587fs) was the most frequent, being present in seven alleles. The majority of patients carrying this novel variant are from Central-West and North-east regions (Figure 2). Taking into account the important migratory process of Brazilian northeasterners toward the central-western region, we can also hypothesize a common origin of this variant in Brazil.

Taking into account the continental dimensions and the much admixed population origin of Brazil, a diversity of disease-causing variants was expected. At the same time, it is noteworthy the higher prevalence of some variants, including those reported in only one case or even the ones unreported to date. Future studies regarding the origin of the recurrent pathogenic variants will be important to understand their origin and their possible correlation to the peopling pattern of Brazil.

In spite of the much diverse and heterogeneous population in Brazil, our study including patients from different regions showed high efficiency of the proposed gene panel. Besides, we described novel and recurrent pathogenic variants, extending the spectrum of known mutations in EB.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the patients and their family members for their participation in this study. Also, we thank the collaborating institutions and physicians for the contribution in patients' recruitment. Finally, our acknowledgment to the DEBRA-Brasil and to the society of EB patients and families from Distrito Federal, Associação de Parentes, Amigos e Portadores de Epidermólise Bolhosa Congênita (APPEB-DF), in special to Anna Carolina Ferreira da Rocha, for the cooperation. This study was supported by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INaGeMP/CNPq/FAPERGS), grant number 465549/2014-4, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Lavinia Schuler-Faccini  <https://orcid.org/0000-0002-2428-0460>

## REFERENCES

1. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, et al. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(6):1103-1126.
2. Fine JD, Eady RA, Bauer EA, 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;58(6):931-950.
3. Fine JD. Inherited epidermolysis bullosa: recent basic and clinical advances. *Curr Opin Pediatr*. 2010;22(4):453-458.
4. Bolling MC, Lemmink HH, Jansen GH, Jonkman MF. Mutations in *KRT5* and *KRT14* cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients. *Br J Dermatol*. 2011;164(3):637-644.
5. Arin MJ. The molecular basis of human keratin disorders. *Hum Genet*. 2009;125:355-373.
6. Bolling MC, Jongbloed JDH, Boven LG, et al. Plectin mutations underlie epidermolysis bullosa simplex in 8% of patients. *J Invest Dermatol*. 2014;134(1):273-276.
7. Khani P, Ghazi F, Zekri A, et al. Keratins and epidermolysis bullosa simplex. *J Cell Physiol*. 2018;234(1):289-297.
8. Arin MJ, Grimberg G, Schumann H, et al. Identification of novel and known *KRT5* and *KRT14* mutations in 53 patients with epidermolysis bullosa simplex: correlation between genotype and phenotype. *Br J Dermatol*. 2010;162(6):1365-1369.
9. Yenamandra VK, Vellarikkal SK, Kumar M, et al. Application of whole exome sequencing in elucidating the phenotype and genotype spectrum of junctional epidermolysis bullosa: a preliminary experience of a tertiary care Centre in India. *J Dermatol Sci*. 2017;86(1):30-36.
10. Kiriti D, Has C, Bruckner-Tuderman L. Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adh Migr*. 2013;7(1):135-141.
11. Shinkuma S. Dystrophic epidermolysis bullosa: a review. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2015;8:275-284.
12. Dang N, Murrell DF. Mutation analysis and characterization of *COL7A1* mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*. 2008;17(7):553-568.
13. Jerábková B, Kopecková L, Bucková H, et al. Analysis of the *COL7A1* gene in Czech patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals novel and recurrent mutations. *J Dermatol Sci*. 2010;59(2):136-140.
14. Almaani N, Liu L, Dopping-Hepenstal PJC, et al. Identical glycine substitution mutations in type VII collagen may underlie both dominant and recessive forms of dystrophic epidermolysis bullosa. *Acta Derm Venereol*. 2011;91:262-266.
15. Abu Sa'd J, Indelman M, Pfendner E, et al. Molecular epidemiology of hereditary epidermolysis bullosa in a middle eastern population. *J Invest Dermatol*. 2006;126(4):777-781.
16. Babu NA, Rajesh E, Krupaa J, Gnananandar G. Genodermatoses. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7:S203-S206.
17. Orphanet Report Series. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data. Rare Diseases collection Number 1: Diseases listed in alphabetical order. [https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence\\_of\\_rare\\_diseases\\_by\\_diseases.pdf](https://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_diseases.pdf). 2019. Accessed February 20, 2019.
18. Sousa MC, Paula CD, Tauil PL, Costa IM. Correlation between nutritional, hematological and infectious characteristics and classification of the type of epidermolysis bullosa of patients assisted at the dermatology Clinic of the Hospital Universitário de Brasília. *An Bras Dermatol*. 2015;90(6):922-924.
19. Fernandes JD, Rivitti-Machado MC, Nakano J, et al. Clinical, dermoscopic and histopathological features of melanocytic nevi in dystrophic epidermolysis bullosa. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014;12(3):237-242.
20. Callegaro EAC, Nappi F, Lazzarini R, Lellis RF. Pretibial dystrophic epidermolysis bullosa. *An Bras Dermatol*. 2017;92:126-128.
21. Almeida HL Jr, Heckler GT, Fong K, et al. Sporadic Kindler syndrome with a novel mutation. *An Bras Dermatol*. 2013;88:212-215.



22. Stenson PD, Ball EV, Mort M, et al. The human gene mutation database (HGMD®): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003;21:577-581.
23. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-D1067.
24. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, et al. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat.* 2011;32(5):557-563.
25. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-291.
26. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat.* 2017;38(7):751-763.
27. Van den Akker PC, Jonkman MF, Rengaw T, et al. The international dystrophic epidermolysis bullosa patient registry: an online database of dystrophic epidermolysis bullosa patients and their COL7A1 mutations. *Hum Mutat.* 2011;32(10):1100-1107.
28. Wertheim-Tysarowska K, Sobczynska-Tomaszewska A, Kowalewski C, et al. The COL7A1 mutation database. *Hum Mutat.* 2012;33(2):327-331.
29. Sim NL, Kumar P, Hu J, et al. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:452-457.
30. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics.* 2015;31(16):2745-2747.
31. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-249.
32. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-362.
33. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, et al. Human splicing finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):e67.
34. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424.
35. Cassidy AJ, van Steensel MAM, Steijlen PM, et al. A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet.* 2005;77:909-917.
36. Sawamura D, Goto M, Yasukawa K, et al. Genetic studies of 20 Japanese families of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Hum Genet.* 2005;50:543-546.
37. Hovnanian A, Rochat A, Bodemer C, et al. Characterization of 18 new mutations in COL7A1 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa provides evidence for distinct molecular mechanisms underlying defective anchoring fibril formation. *Am J Hum Genet.* 1997;61:599-610.
38. Cuadrado-Corrales N, Garcia M, Escamez MJ, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol: COL7A1. Disease: Epidermolysis bullosa dystrophica. *Hum Genet.* 2009;126:329-352.
39. Vahidnezhad H, Youssefian L, Saeidian AH, et al. Multigene next-generation sequencing panel identifies pathogenic variants in patients with unknown subtype of epidermolysis bullosa: subclassification with prognostic implications. *J Invest Dermatol.* 2017;137(12):2649-2652.
40. Has C, Küsel J, Reimer A, et al. The position of targeted next-generation sequencing in epidermolysis bullosa diagnosis. *Acta Derm Venereol.* 2018;98(4):437-440.
41. Lucky AW, Dagaonkar N, Lammers K, et al. A comprehensive next-generation sequencing assay for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Pediatr Dermatol.* 2018;35(2):188-197.
42. Schuilenga-Hut PH, Pv V, Jonkman MF, et al. Mutation analysis of the entire keratin 5 and 14 genes in patients with epidermolysis bullosa simplex and identification of novel mutations. *Hum Mutat.* 2003;21(4):447.
43. Pfindner EG, Bruckner AL. Epidermolysis bullosa simplex. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews® [Internet].* Seattle, WA: University of Washington; 1998.
44. Szczecincka W, Nesteruk D, Wertheim-Tysarowska K, et al. Under-recognition of acral peeling skin syndrome: 59 new cases with 15 novel mutations. *Br J Dermatol.* 2014;171(5):1206-1210.
45. Wertheim-Tysarowska K, Otdak M, Giza A, et al. Novel sporadic and recurrent mutations in KRT5 and KRT14 genes in polish epidermolysis bullosa simplex patients: further insights into epidemiology and genotype-phenotype correlation. *J Appl Genet.* 2016;57(2):175-181.
46. Kim EN, Harris AG, Bingham LJ, et al. A review of 52 pedigrees with epidermolysis bullosa simplex identifying ten novel mutations in KRT5 and KRT14 in Australia. *Acta Derm Venereol.* 2017;97(9):1114-1119.
47. Fuentes I, Campos M, Repetto G, et al. Molecular epidemiology of junctional epidermolysis bullosa: discovery of novel and frequent LAMB3 mutations in Chilean patients with diagnostic significance. *Br J Dermatol.* 2017;176(4):1090-1092.
48. Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa. *J Pediatr.* 2008;152(2):276-280.
49. Fine JD, Hintner H. *Life with Epidermolysis Bullosa (EB): Etiology, Diagnosis, Multidisciplinary Care and Therapy.* New York, NY: Springer-Verlag/Wien; 2008.
50. Varki R, Sadowski S, Pfindner E, Uitto J. Epidermolysis bullosa. I. Molecular genetics of the junctional and hemidesmosomal variants. *J Med Genet.* 2006;43(8):641-652.
51. Kiritsi D, Kern JS, Schumann H, et al. Molecular mechanisms of phenotypic variability in junctional epidermolysis bullosa. *J Med Genet.* 2011;48(7):450-457.
52. Hammersen J, Has C, Naumann-Bartsch N, et al. Genotype, clinical course, and therapeutic decision making in 76 infants with severe generalized junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 2016;136(11):2150-2157.
53. Kern JS, Grüniger G, Imsak R, et al. Forty-two novel COL7A1 mutations and the role of a frequent single nucleotide polymorphism in the MMP1 promoter in modulation of disease severity in a large European dystrophic epidermolysis bullosa cohort. *Br J Dermatol.* 2009;161(5):1089-1097.
54. van den Akker PC, Mellerio JE, Martinez AE, et al. The inversa type of recessive dystrophic epidermolysis bullosa is caused by specific arginine and glycine substitutions in type VII collagen. *J Med Genet.* 2011;48:160-167.
55. Escámez MJ, García M, Cuadrado-Corrales N, et al. The first COL7A1 mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol.* 2010;163(1):155-161.
56. Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, et al. Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell.* 1991;66(6):1301-1311.
57. Uttam J, Hutton E, Coulombe PA, et al. The genetic basis of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(17):9079-9084.
58. Kang TW, Lee JS, Kim SE, et al. Novel and recurrent mutations in Keratin 5 and 14 in Korean patients with Epidermolysis bullosa simplex. *J Dermatol Sci.* 2010;57(2):90-94.
59. Rugg EL, Racht-Préhu MO, Rochat A, et al. Donor splice site mutation in keratin 5 causes in-frame removal of 22 amino acids of H1 and 1A rod domains in Dowling-Meara epidermolysis bullosa simplex. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(3):293-300.
60. Koss-Harnes D, Hoyheim B, Anton-Lamprecht I, et al. A site-specific plectin mutation causes dominant epidermolysis bullosa simplex

- Ogna: two identical de novo mutations. *J Invest Dermatol.* 2002;118(1):87-93.
61. Nakano A, Chao SC, Pulkkinen L, et al. Laminin 5 mutations in junctional epidermolysis bullosa: molecular basis of Herlitz vs. non-Herlitz phenotypes. *Hum Genet.* 2002;110(1):41-51.
  62. Christiano AM, McGrath JA, Tan KC, Uitto J. Glycine substitutions in the triple-helical region of type VII collagen result in a spectrum of dystrophic epidermolysis bullosa phenotypes and patterns of inheritance. *Am J Hum Genet.* 1996;58(4):671-681.
  63. Christiano AM, LaForgia S, Paller AS, et al. Prenatal diagnosis for recessive dystrophic epidermolysis bullosa in 10 families by mutation and haplotype analysis in the type VII collagen gene (COL7A1). *Mol Med.* 1996;2(1):59-76.
  64. van den Akker PC, van Essen AJ, Kraak MM, et al. Long-term follow-up of patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa in the Netherlands: expansion of the mutation database and unusual phenotype-genotype correlations. *J Dermatol Sci.* 2009;56(1):9-18.
  65. Cserhalmi-Friedman PB, McGrath JA, Mellerio JE, et al. Restoration of open reading frame resulting from skipping of an exon with an internal deletion in the COL7A1 gene. *Lab Invest.* 1998;78(12):1483-1492.
  66. Hovnanian A, Hilal L, Blanchet-Bardon C, et al. Recurrent nonsense mutations within the type VII collagen gene in patients with severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet.* 1994;55(2):289-296.
  67. Varki R, Sadowski S, Uitto J, Pfendner E. Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J Med Genet.* 2007;44(3):181-192.
  68. Kon A, Pulkkinen L, Ishida-Yamamoto A, et al. Novel COL7A1 mutations in dystrophic forms of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1998;111(3):534-537.
  69. Lee JY, Li C, Chao SC, et al. A de novo glycine substitution mutation in the collagenous domain of COL7A1 in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol Res.* 2000;292(4):159-163.
  70. Whittock NV, Ashton GH, Mohammedi R, et al. Comparative mutation detection screening of the type VII collagen gene (COL7A1) using the protein truncation test, fluorescent chemical cleavage of mismatch, and conformation sensitive gel electrophoresis. *J Invest Dermatol.* 1999;113(4):673-686.
  71. Gardella R, Castiglia D, Posteraro P, et al. Genotype-phenotype correlation in Italian patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 2002;119(6):1456-1462.
  72. Cuadrado-Corrales N, Garcia M, Escamez MJ, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol: COL7A1. Disease: Epidermolysis Bullosa, Dystrophic. *Hum Genet.* 2010;127:109-124.
  73. Christiano AM, Amano S, Eichenfield LF, et al. Premature termination codon mutations in the type VII collagen gene in recessive dystrophic epidermolysis bullosa result in nonsense-mediated mRNA decay and absence of functional protein. *J Invest Dermatol.* 1997;109(3):390-394.
  74. Christiano AM, D'Alessio M, Paradisi M, et al. A common insertion mutation in COL7A1 in two Italian families with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1996;106(4):679-684.
  75. Terracina M, Posteraro P, Schubert M, et al. Compound heterozygosity for a recessive glycine substitution and a splice site mutation in the COL7A1 gene causes an unusually mild form of localized recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1998;111(5):744-750.
  76. Mallipeddi R, Bleck O, Mellerio JE, et al. Dilemmas in distinguishing between dominant and recessive forms of dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol.* 2003;149(4):810-818.
  77. Hammami-Hauasli N, Schumann H, Raghunath M, et al. Some, but not all, glycine substitution mutations in COL7A1 result in intracellular accumulation of collagen VII, loss of anchoring fibrils, and skin blistering. *J Biol Chem.* 1998;273(30):19228-19234.
  78. Kon A, Nomura K, Pulkkinen L, et al. Novel glycine substitution mutations in COL7A1 reveal that the Pasini and Cockayne-Touraine variants of dominant dystrophic epidermolysis bullosa are allelic. *J Invest Dermatol.* 1997;109(5):684-687.
  79. Kahofer P, Bruckner-Tuderman L, Metze D, et al. Dystrophic epidermolysis bullosa inversa with COL7A1 mutations and absence of GDA-J/F3 protein. *Pediatr Dermatol.* 2003;20(3):243-248.
  80. Almaani N, Liu L, Harrison N, et al. New glycine substitution mutations in type VII collagen underlying epidermolysis bullosa pruriginosa but the phenotype is not explained by a common polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 gene promoter. *Acta Derm Venereol.* 2009;89(1):6-11.
  81. Gardella R, Belletti L, Zoppi N, et al. Identification of two splicing mutations in the collagen type VII gene (COL7A1) of a patient affected by the localisata variant of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet.* 1996;59(2):292-300.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Mariath LM, Santin JT, Frantz JA, Doriqui MJR, Kiszewski AE, Schuler-Faccini L. An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants. *Clin Genet.* 2019;1-10. <https://doi.org/10.1111/cge.13555>

## Supplementary Material

**Table S1. Variants of uncertain significance in the EB patients studied.**

Gene	Variant of uncertain significance (VUS)	N (alleles)
<i>KRT5</i>	<i>KRT5</i> , c.1723G>A, p.Val575Ile	1
<i>PLEC</i>	<i>PLEC</i> , c.1003C>T, p.Pro335Ser	1
	<i>PLEC</i> , c.3778A>G, p.Ile1260Val	1
	<i>PLEC</i> , c.4108C>T, p.Arg1370Cys	1
	<i>PLEC</i> , c.4936G>A, p.Glu1646Lys	1
	<i>PLEC</i> , c.5246C>T, p.Thr1749Met	1
	<i>PLEC</i> , c.5470C>T, p.Arg1824Cys	1
	<i>PLEC</i> , c.5659G>A, p.Glu1887Lys	1
	<i>PLEC</i> , c.7595G>A, p.Arg2532Gln	1
	<i>PLEC</i> , c.9131G>A, p.Arg3044Gln	1
	<i>PLEC</i> , c.10543G>A, p.Ala3515Thr	1
	<i>PLEC</i> , c.10646C>T, p.Thr3549Met	1
	<i>PLEC</i> , c.10739A>C, p.Glu3580Ala	1
<i>TGM5</i>	<i>TGM5</i> , c.1149A>G, p.(=)	1
	<i>TGM5</i> , c.1312G>A, p.Asp438Asn	1
<i>LAMA3</i>	<i>LAMA3</i> , c.695G>A, p.Arg232His	1
	<i>LAMA3</i> , c.732C>A, p.Ser244Arg	1
	<i>LAMA3</i> , c.1097G>A, p.Arg366His	1
	<i>LAMA3</i> , c.1562C>T, p.Ser521Phe	1
	<i>LAMA3</i> , c.1613G>T, p.Arg538Leu	1
	<i>LAMA3</i> , c.2896T>C, p.Tyr966His	1
	<i>LAMA3</i> , c.3242A>G, p.Gln1081Arg	1
	<i>LAMA3</i> , c.3456G>A, p.(=)	1
<i>LAMB3</i>	<i>LAMB3</i> , c.1217A>G, p.Gln406Arg	1
	<i>LAMB3</i> , c.2327C>T, p.Ser776Leu	1
	<i>LAMB3</i> , c.2841G>A, p.(=)	1
	<i>LAMB3</i> , c.3068G>A, p.Arg1023Gln	1
	<i>LAMB3</i> , c.3310C>T, p.Arg1104Trp	1
<i>LAMC2</i>	<i>LAMC2</i> , c.1262G>A, p.Gly421Glu	1
	<i>LAMC2</i> , c.1986C>T, p.(=)	1
<i>COL17A1</i>	<i>COL17A1</i> , c.289A>G, p.Thr97Ala	1
	<i>COL17A1</i> , c.316C>T, p.Arg106Cys	1
	<i>COL17A1</i> , c.446C>T, p.Ala149Val	1
	<i>COL17A1</i> , c.1138G>A, p.Ala380Thr	1
	<i>COL17A1</i> , c.1618C>A, p.Leu540Met	1
	<i>COL17A1</i> , c.1761T>C, p.(=)	1
	<i>COL17A1</i> , c.1859T>G, p.Met620Arg	1
	<i>COL17A1</i> , c.2063G>A, p.Arg688Gln	1
	<i>COL17A1</i> , c.2361G>C, p.Gln787His	1
	<i>COL17A1</i> , c.2716G>A, p.Gly906Ser	1
	<i>COL17A1</i> , c.3157G>A, p.Glu1053Lys	1
	<i>COL17A1</i> , c.3205C>T, p.Arg1069Trp	1
	<i>COL17A1</i> , c.3329C>T, p.Pro1110Leu	1
	<i>COL17A1</i> , c.3730G>A, p.Asp1244Asn	1
	<i>COL17A1</i> , c.4156+3A>TTA, p.?	1
<i>ITGB4</i>	<i>ITGB4</i> , c.1262C>T, p.Thr421Met	1
	<i>ITGB4</i> , c.2422G>A, p.Ala808Thr	1
	<i>ITGB4</i> , c.2929C>T, p.Arg977Cys	1
	<i>ITGB4</i> , c.4589C>T, p.Thr1530Met	2
	<i>ITGB4</i> , c.4664G>A, p.Arg1555Gln	1
<i>COL7A1</i>	<i>COL7A1</i> , c.263C>T, p.Pro88Leu	1



	<i>COL7A1</i> , c.802C>T, p.Pro268Ser	1
	<i>COL7A1</i> , c.972G>T, p.(=)	1
	<i>COL7A1</i> , c.1907G>T, p.Gly636Val	6
	<i>COL7A1</i> , c.2158C>T, p.His720Tyr	1
	<i>COL7A1</i> , c.2791C>A, p.Arg931Ser	1
	<i>COL7A1</i> , c.3412G>A, p.Val1138Met	1
	<i>COL7A1</i> , c.3605G>A, p.Arg1202His	1
	<i>COL7A1</i> , c.4075G>A, p.Glu1359Lys	1
	<i>COL7A1</i> , c.4162C>T, p.Arg1388Cys	1
	<i>COL7A1</i> , c.7522-4A>G, p.?	1
	<i>COL7A1</i> , c.8530C>T, p.Arg2844Trp	1
	<i>COL7A1</i> , c.8676G>T, p.Trp2892Cys	1
<i>FERMT1</i>	<i>FERMT1</i> , c.1525G>A, p.Glu509Lys	1
	<i>FERMT1</i> , c.1612G>A, p.Glu538Lys	1
	<i>FERMT1</i> , c.1014C>T, p.(=)	1

**Table S2. Rare variants in patients with no causal mutation identified**

<b>ID</b>	<b>Clinical EB Type</b>	<b>Variants</b>	<b>Zygoty</b>	<b>Classification</b>
#1065	EBS	<i>PLEC</i> , c.5470C>T, p.Arg1824Cys	Heterozygous	VUS
		<i>ITGB4</i> , c.4589C>T, p.Thr1530Met	Heterozygous	VUS
		<i>LAMB3</i> , c.2422C>T, p.Gln808Ter	Heterozygous	Pathogenic*
#1069	EBS	<i>FERMT1</i> , c.1525G>A, p.Glu509Lys	Heterozygous	VUS
#1070	EBS	<i>PLEC</i> , c.9131G>A, p.Arg3044Gln	Heterozygous	VUS
		<i>COL17A1</i> , c.4156+3A>TTA, p.?	Heterozygous	VUS
#1078	EBS	<i>COL7A1</i> , c.3412G>A, p.Val1138Met	Heterozygous	VUS
		<i>COL7A1</i> , c.2791C>A, p.Arg931Ser	Heterozygous	VUS
		<i>COL7A1</i> , c.972G>T, p.(=)	Heterozygous	VUS
		<i>LAMA3</i> , c.1562C>T, p.Ser521Phe	Heterozygous	VUS
		<i>LAMA3</i> , c.3242A>G, p.Gln1081Arg	Heterozygous	VUS
		<i>COL17A1</i> , c.1618C>A, p.Leu540Met	Heterozygous	VUS
		<i>COL17A1</i> , c.1138G>A, p.Ala380Thr	Heterozygous	VUS
		#1105	JEB	Only benign variants identified

\*Although classified as pathogenic according to ACMG criteria, this variant was identified in heterozygosity (*LAMB3* is associated to JEB only in a recessive manner) and the patient's phenotype was not compatible with JEB. For these reasons we not considered this variant as the disease-causing in this case.

**Table S3. DEB subtypes and genotypes of patients carrying novel *COL7A1* pathogenic/likely-pathogenic variants**

<b>ID</b>	<b>EB Subtype</b>	<b>Pathogenic variant 1</b>	<b>Pathogenic variant 2</b>
#1005	RDEB, generalized intermediate	<i>COL7A1</i> , c.7380+2T>C, p.?	<i>COL7A1</i> , c.7246G>A, p.Gly2416Ser
#1008	RDEB, localized	<i>COL7A1</i> , c.6937G>A, p.Gly2313Arg	<i>COL7A1</i> , c.2767G>A, p.Gly923Arg
#1015	RDEB, generalized severe	<i>COL7A1</i> , c.4018C>T, p.Arg1340Ter	<i>COL7A1</i> , c.1758delC, p.Ser587fs
#1022	RDEB, generalized severe	<i>COL7A1</i> , c.1758delC, p.Ser587fs	<i>COL7A1</i> , c.1758delC, p.Ser587fs
#1023	DDEB, generalized	<i>COL7A1</i> , c.1758delC, p.Ser587fs	-
#1025	RDEB, generalized intermediate	<i>COL7A1</i> , c.7078G>A, p.Gly2360Arg	<i>COL7A1</i> , c.7756C>T, p.Gln2586Ter
#1028	RDEB, generalized intermediate	<i>COL7A1</i> , c.7814G>T, p.Gly2605Val	<i>COL7A1</i> , c.4011G>A, p.(=)
#1029	RDEB, localized	<i>COL7A1</i> , c.8109+1G>T, p.?	<i>COL7A1</i> , c.4011G>A, p.(=)
#1032	DDEB, generalized	<i>COL7A1</i> , c.6100_6120delGGGGAGCCTGGAAAGCCTGGT, p.Gly2034_Gly2040del	-
#1033	RDEB, generalized intermediate	<i>COL7A1</i> , c.8109+1G>T, p.?	<i>COL7A1</i> , c.7957G>A, p.Gly2653Arg
#1041	RDEB, generalized severe	<i>COL7A1</i> , c.5737G>T, p.Gly1913Cys	<i>COL7A1</i> , c.4027C>T, p.Arg1343Ter
#1047	RDEB, not defined	<i>COL7A1</i> , c.4378C>T, p.Gln1460Ter	<i>COL7A1</i> , c.1758delC, p.Ser587fs
#1049	RDEB, localized	<i>COL7A1</i> , c.5576_5577delAA, p.Lys1859fs	<i>COL7A1</i> , c.5132_5133insTCACC, p.Gly1712fs
#1050	RDEB, generalized intermediate*	<i>COL7A1</i> , c.5449C>T, p.Gln1817Ter	Not identified
#1057	RDEB, generalized severe	<i>COL7A1</i> , c.2783_2784insGACAC, p.Gln929fs	<i>COL7A1</i> , c.325_326insCG, p.Glu109fs
#1060	RDEB, generalized severe	<i>COL7A1</i> , c.8191G>T, p.Gly2731Cys	<i>COL7A1</i> , c.8191G>T, p.Gly2731Cys
#1063	RDEB, localized	<i>COL7A1</i> , c.5282G>A, p.Gly1761Asp	<i>COL7A1</i> , c.5820G>A, p.(=)
#1067	RDEB, localized	<i>COL7A1</i> , c.5047C>T, p.Arg1683Ter	<i>COL7A1</i> , c.5124+1G>A, p.?
#1075	DDEB, localized	<i>COL7A1</i> , c.5308G>C, p.Gly1770Arg	-
#1082	RDEB, generalized severe	<i>COL7A1</i> , c.5047C>T, p.Arg1683Ter	<i>COL7A1</i> , c.4288G>T, p.Gly1430Ter
#1093	RDEB, generalized severe	<i>COL7A1</i> , c.7411C>T, p.Arg2471Ter	<i>COL7A1</i> , c.2783_2784insGACAC, p.Gln929fs
#1094	DDEB, pretibial	<i>COL7A1</i> , c.5321C>A, p.Pro1774His	-
#1096	DDEB, localized	<i>COL7A1</i> , c.5097+1G>A, p.?	-
#1099	RDEB, generalized severe	<i>COL7A1</i> , c.1758delC, p.Ser587fs	<i>COL7A1</i> , c.1758delC, p.Ser587fs
#1106	RDEB, localized	<i>COL7A1</i> , c.6698G>A, p.Gly2233Asp	<i>COL7A1</i> , c.7420C>T, p.Arg2474Cys

\* Clinical presentation typical of RDEB generalized intermediate. The second pathogenic variant, not identified until now, is still under investigation.

## Supplementary Figures

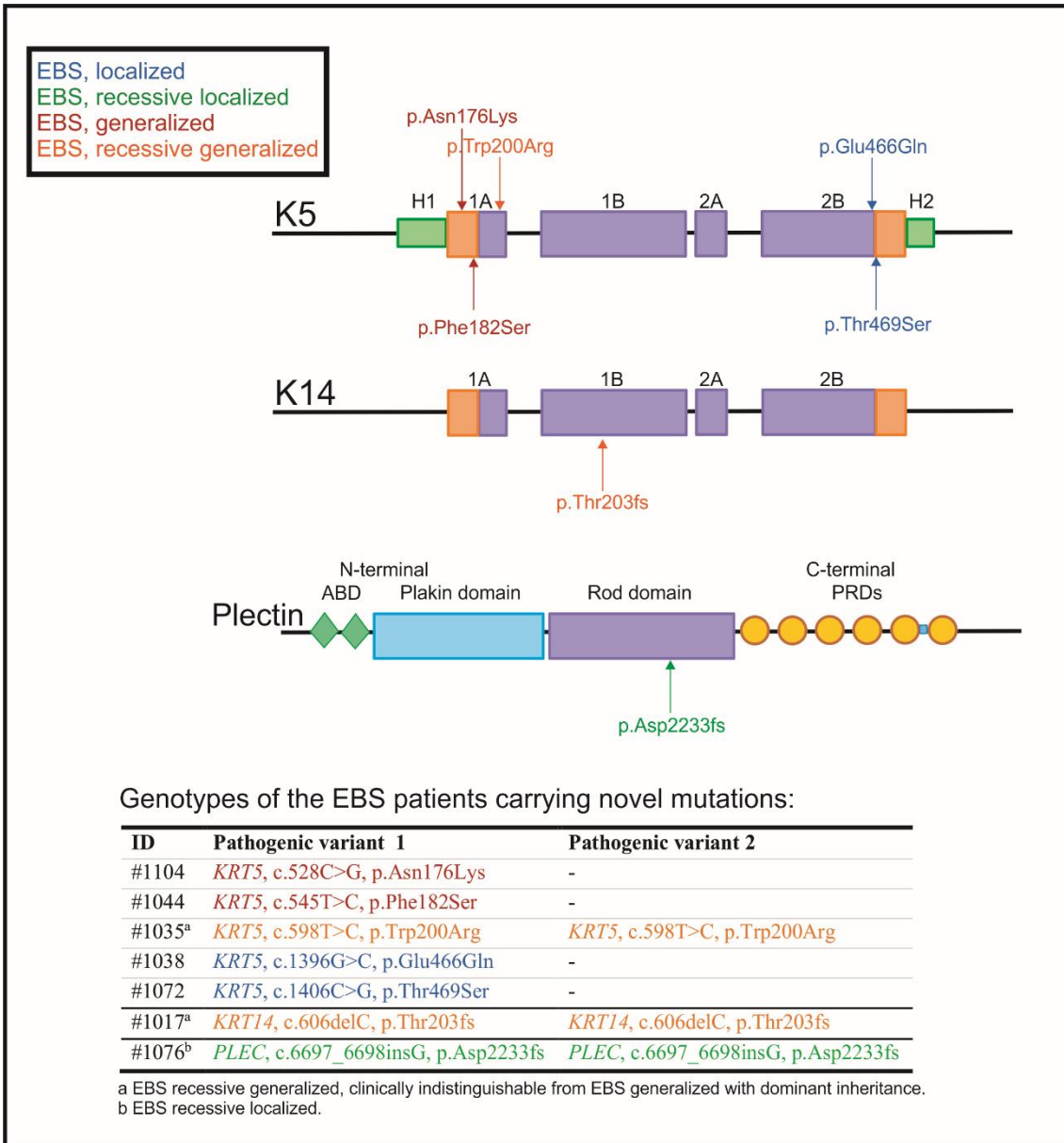
### Graphical Abstract

#### **Figure S1. Novel pathogenic/likely pathogenic variants identified in EBS patients.**

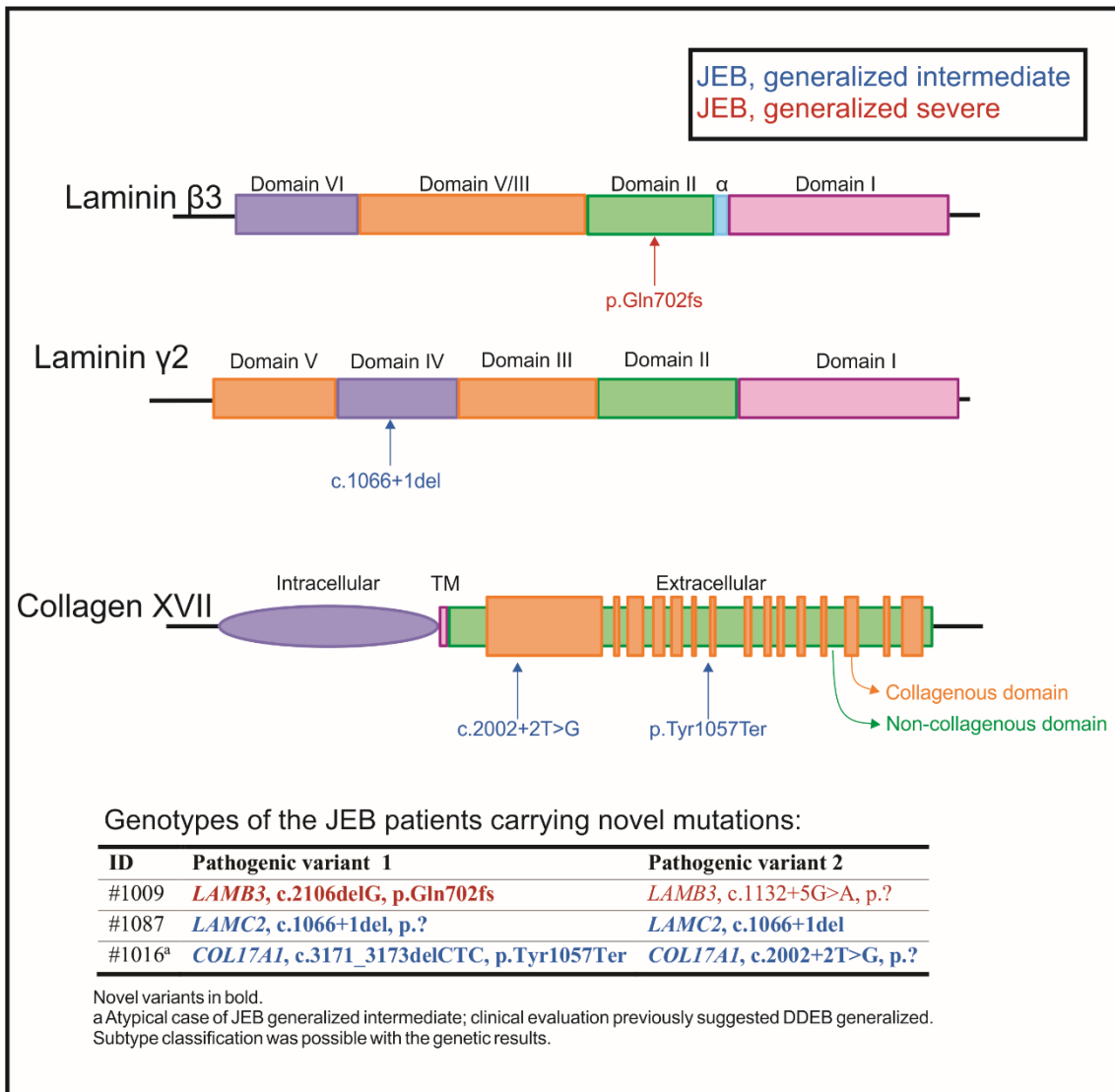
The variants are colored according to the associated EB subtype. Patient's genotypes are shown in the table below. In K5 and K14: nonhelical head domains in green (H1 and H2);  $\alpha$ -helical rod domains in purple and the helix boundary motifs in orange. In Plectin: ABD – actin binding domain; PRD – plakin repeat domains.

#### **Figure S2. Novel pathogenic/likely pathogenic variants identified in JEB patients.**

The variants are colored according to the associated EB subtype. Patient's genotypes are shown in the table below. TM – transmembrane domain.

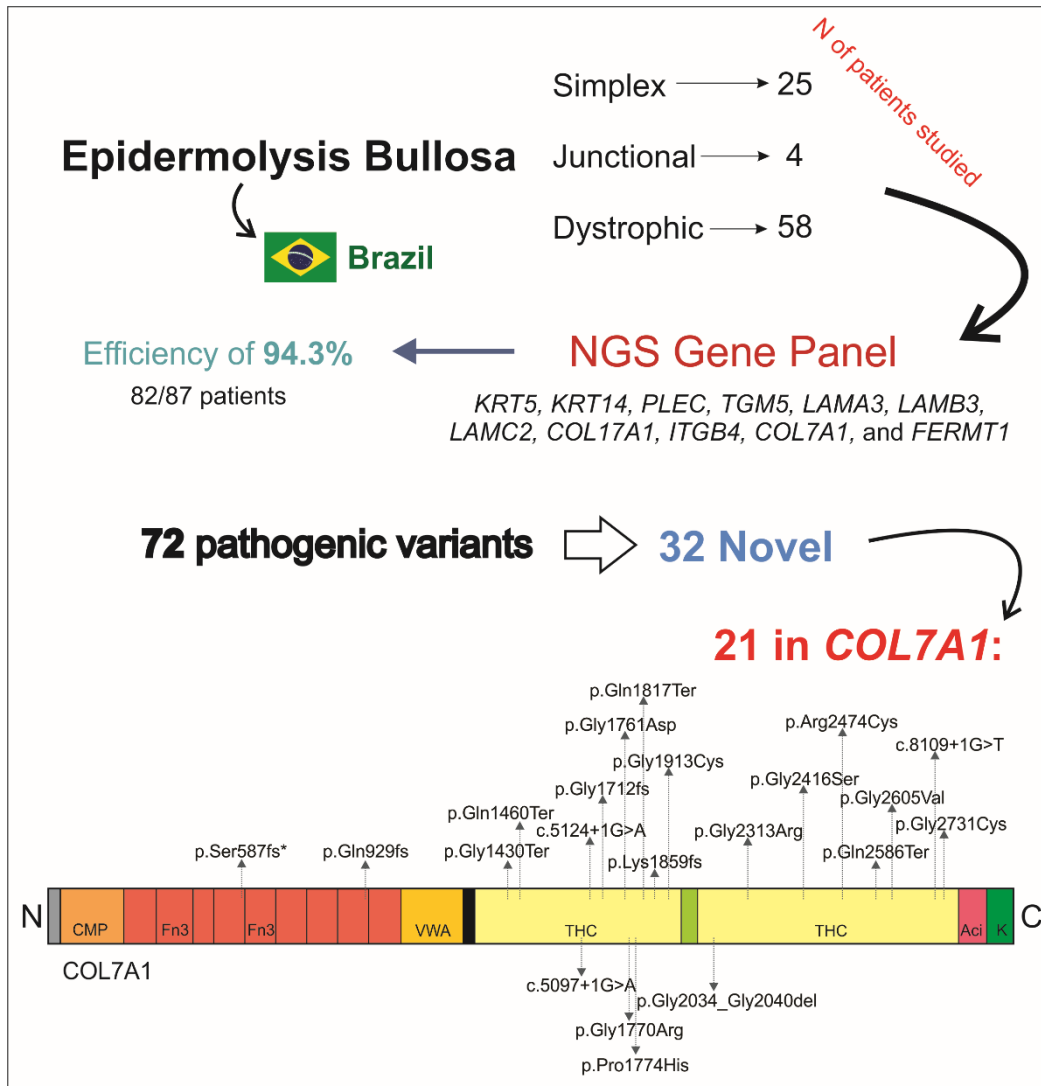


**Figure S1.** Novel pathogenic/likely pathogenic variants identified in EBS patients. The variants are colored according to the associated EB subtype. Patient's genotypes are shown in the table below. In K5 and K14: nonhelical head domains in green (H1 and H2); a-helical rod domains in purple and the helix boundary motifs in orange. In Plectin: ABD – actin binding domain; PRD – plakin repeat domains.



**Figure S2.** Novel pathogenic/likely pathogenic variants identified in JEB patients. The variants are colored according to the associated EB subtype. Patient's genotypes are shown in the table below. TM – transmembrane domain.

## Graphical Abstract



## **CAPÍTULO V**

---

### **ARTIGO 2**

#### **Epidermolysis bullosa with congenital absence of skin: Clinical and genetic characterization of a 23-case series**

Artigo publicado na revista *Clinical Genetics*



## LETTER TO THE EDITOR

# Epidermolysis bullosa with congenital absence of skin: Clinical and genetic characterization of a 23-case series

To the Editor:

Epidermolysis bullosa (EB) with congenital absence of skin (CAS), previously referred to as Bart's syndrome, is characterized by the coexistence of inherited EB and aplasia cutis congenita.<sup>1</sup> A few case reports have suggested that CAS is a rare clinical sign associated with all main EB types, including dominant and recessive inheritance of EB.<sup>1,2</sup> Our objective in this study was to characterize the clinical and genetic features of a case series of 23 patients with EB and CAS.

The patients were recruited in Brazilian medical centers. Diagnostic criteria were based on the consensus report by Has et al.<sup>3</sup> The present study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (project 31 608) and Plataforma Brasil (protocol 2.481.885). DNA was extracted from saliva and/or whole blood samples. Genetic analysis was performed through a next-generation sequencing (NGS)-based multigene panel on Ion Torrent Platform (Thermo Fisher Scientific, USA). This panel covers 11 genes associated with EB: *KRT5*, *KRT14*, *PLEC*, *TGM5*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *COL7A1* and *FERMT1*. Information regarding runs, parameters and data analyses is detailed elsewhere.<sup>4</sup>

The patients studied here are part of a large sample of 113 Brazilian EB patients (37 EB simplex, five junctional EB, 71 dystrophic EB), from which we have identified 26 cases of CAS (23%). Three of them were not included in this study since we could not perform a genetic analysis. In a previous study we characterized the recurrent and novel variants associated to EB in Brazil.<sup>4</sup>

From the 23 patients with EB and CAS, 21 were diagnosed with dystrophic EB (DEB) and two with EB simplex (EBS). Table 1 presents the genetic and clinical information from patients studied here. In patient EBO2, the disease-causing variant was not identified, suggesting the influence of other genes not included in the panel (such as *KLHL24*, recently implicated in EBS),<sup>3</sup> the existence of large rearrangements, deep intronic variants or regulatory mutations not identified by NGS.

Although in utero trauma due to friction of the limbs is a known cause of CAS in EB,<sup>2,5</sup> it does not explain why this condition occurs more frequently in some families than in others. In the case series here studied, we observed a recurrence of CAS within three families (total of six individuals; Table 1), which indicates a genetic influence on this phenomenon.

The only genotype-phenotype correlation hypothesis to date suggested that missense pathogenic variants occurring near

noncollagenous interruptions of the triple-helix domain (THD) of collagen VII could explain the occurrence of CAS in DEB.<sup>2</sup> In our case series, considering exclusively patients with DEB caused by missense variants, nine out of 11 carried at least one variant close to the noncollagenous interruptions. These variants are predicted to lead to the formation of a less stable thermosensitive protein, which could explain this phenomenon.<sup>2</sup> Premature termination codon (PTC) variants leading to the complete absence of collagen VII are commonly associated to the most severe subtypes of DEB. It is plausible that the skin fragility itself is the cause of CAS for the severe cases associated with PTC variants. However, CAS is also observed in patients with very mild phenotypes (eg, dominant DEB-nails only). The molecular mechanisms involved in CAS are not clear yet, but it is reasonable to assume a genetic influence on this condition, especially in moderate and mild EB cases.




In conclusion, this study expands the spectrum of known pathogenic variants in EB with CAS and strengthens previous hypothesis of possible genotype-phenotype correlation. Additional studies will be important to confirm these findings and to elucidate the molecular processes involved.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Our special thanks to the patients and their families and also to the DEBRA Brasil and APPEB-DF associations. This study was supported by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INaGeMP/CNPq/FAPERGS), grant 465549/2014-4.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available upon reasonable request.

Luiza M. Mariath,<sup>1</sup>  Juliana T. Santin,<sup>2</sup> Jeanine A. Frantz,<sup>3</sup> Maria J. R. Doriquí,<sup>4</sup> Lavinia Schuler-Faccini,<sup>1,5</sup>  and Ana E. Kiszewski,<sup>6,7</sup> 

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>DEBRA Brasil, Blumenau, Brazil

<sup>4</sup>Section of Medical Genetics, Hospital Infantil Dr. Juvêncio Mattos, São Luís, Brazil

**TABLE 1** Clinical and genetic information from patients with epidermolysis bullosa (EB) and congenital absence of skin (CAS) included in this 23-case series

ID	EB subtype	CAS	Variant 1	Consequence	Variant 2	Consequence
<b>EBS</b>						
EB01	EBS-localized	Bilateral to foot	KRT14, c.373C > T, p.Arg125Cys	Missense	-	
EB02	EBS (clinical diagnosis)	Bilateral to leg and foot	Not identified <sup>d</sup>			
<b>DDEB</b>						
EB03 <sup>a</sup>	DDEB-localized	Unilateral to leg	<b>COL7A1, c.6044G &gt; A, p.Gly2015Glu</b>	Missense	-	
EB04 <sup>a</sup>	DDEB-localized	Unilateral to thigh, leg and foot	<b>COL7A1, c.6044G &gt; A, p.Gly2015Glu</b>	Missense	-	
EB05	RDEB-severe	Bilateral to hand; unilateral to elbow and leg	COL7A1, c.325_326insCG, p.Glu109fs	Frameshift	COL7A1, c.325_326insCG, p.Glu109fs	Frameshift
EB06	RDEB-severe	Bilateral to foot	COL7A1, c.1758del, p.Ser587fs	Frameshift	COL7A1, c.1758del, p.Ser587fs	Frameshift
EB07	RDEB-severe	Unilateral to leg	COL7A1, c.5047C > T, p.Arg1683Ter	Nonsense	COL7A1, c.5047C > T, p.Arg1683Ter	Nonsense
EB08	RDEB-severe	Bilateral to leg and foot	<b>COL7A1, c.5737G &gt; T, p.Gly1913Cys</b>	Missense	COL7A1, c.4027C > T, p.Arg1343Ter	Nonsense
EB09	RDEB-severe	Bilateral to foot	COL7A1, c.4378C > T, p.Gln1460Ter	Nonsense	COL7A1, c.1758del, p.Ser587fs	Frameshift
EB10	RDEB-severe	Bilateral to leg and foot	<b>COL7A1, c.8191G &gt; T, p.Gly2731Cys</b>	Missense	<b>COL7A1, c.8191G &gt; T, p.Gly2731Cys</b>	Missense
EB11	RDEB-severe	Bilateral to leg	COL7A1, c.5047C > T, p.Arg1683Ter	Nonsense	COL7A1, c.4288G > T, p.Gly1430Ter	Nonsense
EB12 <sup>a</sup>	RDEB-severe	Bilateral to leg and foot	<b>COL7A1, c.7078G &gt; A, p.Gly2360Arg</b>	Missense	COL7A1, c.58_70del, p.Arg20fs	Frameshift
EB13 <sup>a</sup>	RDEB-severe	Bilateral to leg and foot	<b>COL7A1, c.7078G &gt; A, p.Gly2360Arg</b>	Missense	COL7A1, c.58_70del, p.Arg20fs	Frameshift
EB14 <sup>a,c</sup>	RDEB-severe	Unilateral to knee, leg and foot	COL7A1, c.6527dupC, p.Gly2177fs	Frameshift	COL7A1, c.325_326insCG, p.Glu109fs	Frameshift
EB15	RDEB-severe	Bilateral to foot	COL7A1, c.2005C > T, p.Arg669Ter	Nonsense	COL7A1, c.2005C > T, p.Arg669Ter	Nonsense
EB16	RDEB-intermediate	Bilateral to leg and foot	COL7A1, c.8109 + 1G > T	Splice-site	COL7A1, c.7957G > A, p.Gly2653Arg	Missense
EB17	RDEB-intermediate	Bilateral to leg and foot	COL7A1, c.5047C > T, p.Arg1683Ter	Nonsense	<b>COL7A1, c.6022C &gt; T, p.Arg2008Cys</b>	Missense
EB18	RDEB-intermediate	Bilateral to leg and foot	COL7A1, c.5449C > T, p.Gln1817Ter	Nonsense	Not identified <sup>b</sup>	
EB19	RDEB-intermediate	Unilateral to knee	COL7A1, c.7249C > T, p.Gln2417Ter	Nonsense	<b>COL7A1, c.6016G &gt; A, p.Gly2006Ser</b>	Missense
EB20	RDEB-localized	Bilateral to foot; unilateral to leg	<b>COL7A1, c.6022C &gt; T, p.Arg2008Cys</b>	Missense	COL7A1, c.4011G > A, p.=	Splice-site
EB21	RDEB-localized	Unilateral to knee, leg and foot	COL7A1, c.5047C > T, p.Arg1683Ter	Nonsense	COL7A1, c.5124 + 1G > A	Splice-site
EB22 <sup>a,c</sup>	RDEB-localized	Unilateral to leg	COL7A1, c.6527dupC, p.Gly2177fs	Frameshift	COL7A1, c.7738C > T, p.Arg2580Cys	Missense
EB23	RDEB, not defined	Bilateral to foot	COL7A1, c.5047C > T, p.Arg1683Ter	Nonsense	COL7A1, c.7249C > T, p.Gln2417Ter	Nonsense

Notes: Missense variants occurring close to the noncollagenous interruptions of the THD domain are in bold. The variants are listed in The Human Gene Mutation Database (HGMD; www.hgmd.cf.ac.uk) and were previously described.<sup>4</sup>

Abbreviations: DDEB, dominant DEB; RDEB, recessive DEB.

<sup>a</sup>Familial cases: patient EB03 is the mother of EB04, patients EB12 and EB13 are sisters, patient EB22 is the mother of EB14.

<sup>b</sup>For patient EB18 we suggest the second pathogenic variant might be a large rearrangement or a deep intronic variant not identified by NGS. The clinical diagnosis of EB18 was based on clinical signs more commonly associated with RDEB-intermediate; however, we cannot exclude a possible dominant inheritance, taking into account the considerable phenotypic overlap among RDEB and DDEB subtypes.<sup>3</sup>

<sup>c</sup>Patients EB14 and EB22, although from the same family, share only one pathogenic variant, and the distinct second variant may explain the contrasting phenotypes.

<sup>d</sup>No pathogenic variants identified in KRT5, KRT14, PLEC, TGM5, LAMA3, LAMB3, LAMC2, COL7A1, ITGB4, COL7A1 and FERMT1.

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica  
Populacional (INaGeMP),  
Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup>Section of Dermatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de  
Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>7</sup>Section of Pediatric Dermatology, Hospital da Criança Santo Antônio,  
Irmãdade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre,  
Porto Alegre, Brazil

#### Correspondence

Dr Ana E. Kiszewski,  
Section of Dermatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre  
Rua Sarmento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, Brazil.  
Email: kiszewski@gmail.com

#### Peer Review

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/cge.13762>.

#### ORCID

Luiza M. Mariath  <https://orcid.org/0000-0002-6626-934X>

Lavinia Schuler-Faccini  <https://orcid.org/0000-0002-2428-0460>

Ana E. Kiszewski  <https://orcid.org/0000-0002-6287-6302>

#### REFERENCES

1. Bart BJ. Epidermolysis bullosa and congenital localized absence of skin. *Arch Dermatol.* 1970;101(1):78-81.
2. Chiaverini C, Charlesworth A, Fernandez A, et al. Aplasia cutis congenita with dystrophic epidermolysis bullosa: clinical and mutational study. *Br J Dermatol.* 2014;170(4):901-906.
3. Has C, Bauer JW, Bodemer C, et al. Consensus re-classification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility. *Br J Dermatol.* 2020:1-14. <https://doi.org/10.1111/bjd.18921>.
4. Mariath LM, Santin JT, Frantz JA, Doriquri MJR, Kiszewski AE, Schuler-Faccini L. An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants. *Clin Genet.* 2019;96(3):189-198.
5. Smith SZ, Cram DL. A mechanobullous disease of the newborn. Bart's Syndrome. *Arch Dermatol.* 1978;114(1):81-84.

## CAPÍTULO VI

---

### ARTIGO 3

#### **Genotype-phenotype correlations on epidermolysis bullosa with congenital absence of skin: a comprehensive review**

Artigo submetido à revista *Clinical Genetics*

## **Genotype-phenotype correlations on epidermolysis bullosa with congenital absence of skin: a comprehensive review**

Luiza Monteavaro Mariath<sup>1</sup>, Juliana Tosetto Santin<sup>2</sup>, Jeanine Aparecida Frantz<sup>3,4</sup>, Maria Juliana Rodovalho Doriqui<sup>5</sup>, Lavínia Schuler-Faccini<sup>1,6</sup>, Ana Elisa Kiszewski<sup>7,8,\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Faculty of Medicine, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, Brazil

<sup>4</sup> Debra-Brasil, Blumenau, Brazil

<sup>5</sup> Section of Medical Genetics, Hospital Infantil Dr. Juvêncio Mattos, São Luís, Brazil

<sup>6</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INaGeMP), Porto Alegre, Brazil

<sup>7</sup> Section of Dermatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>8</sup> Section of Pediatric Dermatology, Hospital da Criança Santo Antônio, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author:

Ana Elisa Kiszewski

kiszewski@gmail.com

**Running head:** Review on epidermolysis bullosa with CAS

**Conflict of Interest Statement:** the authors declare no conflicts of interest.

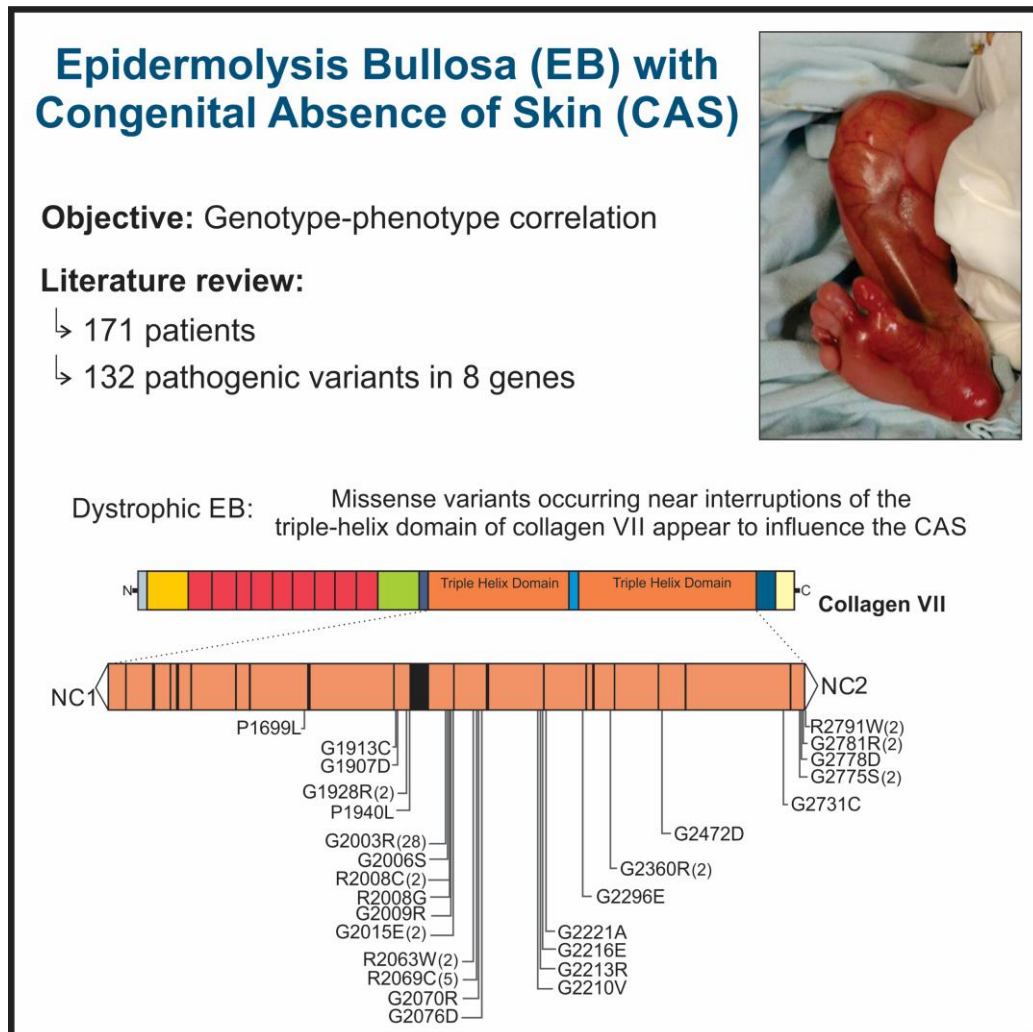
**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## **Abstract**

Congenital absence of skin (CAS) is a clinical sign associated with the main types of epidermolysis bullosa (EB). Very few studies have investigated the genetic background that may influence the occurrence of this condition. Our objective was to investigate genotype-phenotype correlations on EB with CAS through a literature revision on the pathogenic variants previously reported. A total of 171 cases (49 EB simplex, EBS; 23 junctional EB, JEB; and 99 dystrophic EB, DEB), associated with 132 pathogenic variants in eight genes, were included in the genotype-phenotype analysis. In EBS, CAS showed to be a recurrent clinical sign in EBS with pyloric atresia and EBS associated with kelch-like protein 24; CAS was also described in patients with keratins 5/14 alterations, particularly involving severe phenotypes. In JEB, this is a common clinical sign in JEB with pyloric atresia associated with premature termination codon variants and/or amino acid substitutions located in the extracellular domain of integrin  $\alpha 6\beta 4$  genes. In DEB with CAS, missense variants occurring close to non-collagenous interruptions of the triple-helix domain of collagen VII appear to influence this condition. This study is the largest review of patients with EB and CAS and expands the spectrum of known variants on this phenomenon.

**Keywords:** epidermolysis bullosa, genetics, aplasia cutis, Bart's syndrome.

## Graphical Abstract



Congenital absence of skin (CAS) is a rare clinical sign associated with the main types of epidermolysis bullosa (EB). The objective of this study was to investigate genotype-phenotype correlations through a literature revision on the pathogenic variants previously reported in EB with CAS. A total of 171 cases (49 EB simplex, 23 junctional EB and 99 dystrophic EB), associated with 132 pathogenic variants in eight genes, were included in the analysis. In dystrophic EB with CAS, missense variants occurring close to non-collagenous interruptions of the triple-helix domain of collagen VII appear to influence this condition. This study is the largest review of patients with EB and CAS and expands the spectrum of known variants on this phenomenon.

## 1. Introduction

Epidermolysis bullosa (EB) is a genetic skin disorder characterized by skin fragility and blistering of the skin and mucous membranes following a minimal friction or mechanical trauma. EB is classified in four major types, based on the level of skin within which blisters develop: EB simplex (EBS), junctional EB (JEB), dystrophic EB (DEB) and Kindler EB (KEB).<sup>1,2</sup> EB with congenital absence of skin (CAS) is characterized by the coexistence of inherited EB and aplasia cutis congenita (Figure 1). It was originally described by Bart et al.<sup>3</sup> as a new syndrome, and hence referred to as Bart's syndrome.<sup>3,4</sup> Subsequent studies, however, demonstrated that CAS is a clinical sign associated with all main clinical types of EB, including both dominant and recessive inheritance.<sup>5-7</sup>

The most widely accepted hypothesis is that CAS results from *in utero* trauma due to friction of the limbs.<sup>5,8</sup> However, it does not explain why this condition occurs more frequently in some families than in others, which could indicate a possible genetic influence. Very few studies have investigated this phenomenon in EB, making it difficult to establish genotype-phenotype correlations. To the best of our knowledge, only one previous study has proposed a possible genetic association. Chiaverini et al.<sup>5</sup> suggested that missense variants occurring near the non-collagenous interruptions of the triple-helix domain (THD) of collagen VII could explain the occurrence of CAS in moderate forms of DEB. The lack of subsequent studies has prevented the confirmation of this hypothesis and the exploration of new ones. There are no studies on genotype-phenotype correlations for the other clinical forms of EB.

Our objective in this study was to perform a literature review on genetic data of patients with EB and CAS, aiming to establish possible genotype-phenotype correlations and to explore the genetic background that may influence the occurrence of this phenomenon in all clinical forms of EB.

## 2. Methods

Literature review was performed using PubMed, MEDLINE, Scielo and Google Scholar databases. We searched in these databases for multiple terms related to CAS in EB: 'aplasia cutis', 'absence of skin', 'Bart's syndrome' and 'denuded skin', always using 'AND epidermolysis bullosa'. Additionally, we reviewed articles on EB subtypes frequently



associated with CAS: ‘epidermolysis bullosa-bullous dermolysis of the newborn’ and ‘epidermolysis bullosa with pyloric atresia’. Since CAS is more commonly described in severe phenotypes, we also reviewed genetic studies on severe cases using the search terms ‘severe epidermolysis bullosa mutation’. Relevant references mentioned in selected articles were also reviewed. We included in the present study only articles that clearly expressed the occurrence of EB and CAS and described the associated genetic variants.

A total of 47 articles reporting cases of EB with CAS were identified after searching, screening and filtering steps. We emphasize that only articles describing the disease-causing variant were selected. The genotype-phenotype analysis included a total of 171 cases (49 EBS, 23 JEB and 99 DEB).

The present study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (project 31608) and Plataforma Brasil (protocol 2.481.885) and is part of a Brazilian project on EB coordinated by our research group.<sup>9</sup>

### **3. Results and Discussion**

#### **3.1 Evidence for a genetic influence on congenital absence of skin in epidermolysis bullosa**

A total of 132 different pathogenic variants in eight genes were identified among the 171 patients with EB and CAS (Figure 2; Tables 1-3). In our review, considering only those with detailed genetic information, the most common EB type associated with CAS was DEB (99 cases), followed by EBS (49) and JEB (23). The exact underlying mechanisms of CAS in EB are not fully understood yet. Considering the number of associated genes, the variability of phenotypes, and the heterogeneous patterns of aplasia cutis among the subtypes of EB, it is likely that there is no single explanation. Instead, we suggest that a combination of factors might modulate the occurrence and severity of this condition, including the gene and pathogenic variant associated, the patient’s genetic background, and also environmental factors.

Among several hypotheses that have been suggested to explain the occurrence of CAS in EB, the most widely accepted is that it results from *in utero* trauma caused by leg rubbing.<sup>5,8</sup> For patients with severe forms of EB, this hypothesis is quite reasonable,

considering the substantial skin fragility associated. However, it does not explain why several patients with mild EB subtypes also present this condition. For example, there are case reports that have described CAS in patients with DEB-self-improving (previously known as DEB-bullous dermolysis of the newborn), a mild subtype characterized by a rapid improvement of skin fragility within the first days or months of life.<sup>10-13</sup> It is plausible, therefore, to suggest that genetic variants, leading to specific effects on protein formation and function, may differently influence the occurrence of this phenomenon in EB patients.

Another piece of evidence that supports a genetic influence is the notable recurrence of CAS within EB families. Of the 171 patients included in this study, 52 are familial cases from 15 different families. Intrafamilial recurrence of CAS has been described in all main EB types since the first reports, when EB with CAS was still considered a distinct syndrome (Bart's syndrome).<sup>3,14-16</sup> Since then, several case reports have described the recurrence of this phenomenon among siblings and other members of a same family.<sup>5,17-19</sup>

Finally, an additional argument that supports the hypothesis of a genetic influence on CAS in EB is the higher prevalence of some specific genetic variants even among unrelated patients. For example, six variants of collagen VII located in a 13-amino acid sequence (p.Gly2003Arg, p.Gly2006Ser, p.Arg2008Cys, p.Arg2008Gly, p. Gly2009Arg and p.Gly2015Glu) were collectively described in a total of 10 unrelated families (Table 3; Figure 2C). In addition, the remarkable high prevalence of CAS in specific EB subtypes also suggest a biological role on this phenomenon, as observed in the EB subtypes with pyloric atresia (associated with *PLEC* and *ITGB4* genes) and EBS-*KLHL24* (Figure 2A and B, Table 1 and 2), to be discussed in more detail in the topics below.

### **3.2 Congenital absence of skin (CAS) in epidermolysis bullosa simplex (EBS): genotype-phenotype correlation**

EBS is characterized by intraepidermal blistering, due to cleavage within the basal layer of keratinocytes.<sup>2,20,21</sup> The complex genetic background involves seven different genes associated with a broad spectrum of clinical severity. Most EBS cases are inherited in a dominant manner, although several cases of autosomal recessive inheritance have been reported.<sup>2,22,23</sup> EBS is subdivided in many subtypes based on the severity of clinical signs, being EBS-localized (in which the distribution of blistering is primarily restricted to hands

and feet) and EBS-severe (generalized distribution of blistering over the body) the most common subtypes.<sup>21</sup> About 75% of EBS cases are due to *KRT5* or *KRT14* mutations, encoding the keratins 5 and 14, whose interaction provides strength and flexibility to basal keratinocytes.<sup>20,24</sup>

Despite the fact that EBS is the most common EB type,<sup>25</sup> there are few case reports of CAS in EBS, which can be explained by the usual milder clinical presentation and also by a possible underreporting of cases. In Table 1 we gathered all pathogenic variants described to date in patients with EBS and CAS, comprising a total of 49 patients and 23 different variants. In Figure 2A we show a schematic representation of the localization of these variants. Considering the cases associated with *KRT5* and *KRT14* pathogenic variants, we observed that all except one presented severe forms of EBS, pointing out that CAS seems to be a rarer clinical sign in mild EBS cases.

Eight distinct *KRT5/KRT14* variants were described in patients with CAS: one frameshift deletion, one intronic deletion leading to aberrant splicing, three nonsense variants associated with recessive inheritance and three missense variants (Table 1). The missense variants are located at the highly conserved ends of the  $\alpha$ -helical rod domain, named helix initiation and termination peptides (HIP and HTP), essential for keratin intermediate filament assembling (Figure 2A).<sup>20,22</sup> Variants in these motifs interfere with the early stages of filament elongation<sup>26</sup> and hence are frequently associated with severe subtypes of EBS (EBS-severe).<sup>20,22</sup> The variant p.Glu477Lys of keratin 5 (K5), in particular, was described in six patients with EBS and CAS by Lalor et al.<sup>7</sup> In their study, only one from six patients carrying this variant did not present CAS, and all of them showed a distinctive, severe and sometimes fatal phenotype.<sup>7</sup> This severe phenotype was probably a result from the localization and nature of the amino acid substitution: a glutamic acid to lysine substitution at position 477 of K5, in the last position of the HTP sequence. Through *in silico* modeling analysis, the authors suggested that this variant likely results in mechanical instability by modifying the strength of keratins interactions.<sup>7,27</sup> Thus, the severe effect of p.Glu477Lys of keratin 5 helps to explain the occurrence of CAS in these patients. Likewise, it is possible that other close variants associated with similar modifications may lead to this same clinical presentation.

It is noteworthy the high frequency of CAS in patients presenting the rare subtype EBS-severe with pyloric atresia (EBS-PA), a severe subtype involving neonatal blistering, pyloric atresia and early lethality, associated with *PLEC* pathogenic variants (Table 1; Figure 1A).<sup>28,29</sup> All EBS-PA patients who were born with absence of skin carried premature termination codons (PTC) variants in *PLEC*, including nonsense variants, out-of-frame splicing variants and frameshift insertions/deletions, commonly resulting in the reduction or complete absence of plectin expression. Plectin is a cytolinker protein with crucial role in stabilizing and organizing the keratin intermediate filament networks in cells.<sup>30</sup> The previous reports have demonstrated that CAS is a very common clinical sign in EBS-PA, despite the rarity of this subtype. It is important to note, however, that the aplasia cutis occurs in a generalized manner in these patients,<sup>31</sup> in contrast to most other EB types in which the CAS is usually localized in lower leg and foot.<sup>5,32</sup>

In Table 1, it is also notable a high frequency of CAS in patients carrying mutations in *KLHL24* gene, which encodes kelch-like protein 24. This new protein has recently been implicated in a novel syndromic subtype of EBS, named EBS intermediate with cardiomyopathy, characterized by extensive CAS and skin fragility at birth, improvement in skin blistering with age and dilated cardiomyopathy in early adulthood.<sup>2,33-35</sup> All patients reported to date carry pathogenic variants in translation initiation codon, resulting in N-terminal truncation of KLHL24. Although this protein appears to influence the turnover of intermediated filaments (especially keratin 14) in keratinocytes, its physiological role and molecular mechanisms of action are still unknown.<sup>33,36,37</sup> Future studies are needed to understand the underlying mechanisms and to determine whether CAS is a constant clinical sign found in patients with this EB subtype.

### **3.3 Congenital absence of skin (CAS) in junctional epidermolysis bullosa (JEB): genotype-phenotype correlation**

JEB is characterized by cleavage and blistering within the lamina lucida, that is, the junction of the skin basement membrane zone. The genetic inheritance pattern is autosomal recessive and seven distinct genes have been implicated in JEB.<sup>2</sup> Epidemiological studies point out that JEB is the rarer main EB type.<sup>25</sup> A significant clinical variability is observed

in JEB, varying from a severe form with early lethality, to a mild clinical presentation, including limited cutaneous fragility and blistering, often only acral.<sup>1,2,38,39</sup>

The two major subtypes of JEB are JEB-severe and JEB-intermediate due to pathogenic variants in *LAMA3*, *LAMB3* or *LAMC2* genes (encoding laminin-332) or in *COL17A1* (encoding collagen XVII).<sup>1,2</sup> JEB with pyloric atresia (JEB-PA), caused by *ITGA6* and *ITGB4* mutations, is a rare and severe subtype characterized by severe skin fragility, pyloric atresia, frequently CAS and early lethality.<sup>2,40</sup> Milder non-lethal cases of JEB-PA have also been described, characterized by less severe skin involvement.<sup>41-43</sup>

A total of 23 cases of JEB and CAS with the respective disease-causing variants were described in the literature, most of them presenting the subtype JEB-PA caused by pathogenic variants in *ITGB4* or *ITGA6* genes. Although involving a severe phenotype, only two cases of JEB-severe due to alterations in laminin-332 genes was described, indicating that alterations in these genes are rarely associated to CAS. On the other hand, the high frequency of CAS among patients with JEB-PA was noteworthy, especially considering such a rare subtype with approximately only 100 known cases.<sup>44</sup> It is important to note that the CAS in JEB-PA, as well as in EBS-PA, involves a distinct and more severe phenotype. In contrast to other EB subtypes, in which it usually affects only the extremities, in EB with pyloric atresia the aplasia cutis is widespread, affecting several sites of the body.<sup>31,43,45</sup>

The severe forms of JEB-PA usually result from PTC variants in both alleles of *ITGB4* or *ITGA6*, encoding the subunits of integrin  $\alpha6\beta4$ , and are associated with the absence of integrin  $\alpha6\beta4$  expression. Integrin  $\alpha6\beta4$  is a transmembrane polypeptide essential to provide resilience and stability to the skin and mucous membranes.<sup>46-48</sup> Most patients with JEB-PA and CAS carry variants predict to result in PTC in *ITGB4* (Table 2), indicating that an absence or a significant reduction of integrin  $\alpha6\beta4$  expression could explain the occurrence of CAS and the severe phenotype associated.

On the other hand, eight distinct missense variants were also described in patients with JEB-PA (seven in *ITGB4* and one in *ITGA6*) (Table 2; Figure 2B). Although the effect of missense variants is usually less serious than PTC, several authors have demonstrated that the nature and the position of the substitution also affect integrin  $\alpha6\beta4$  expression and, consequently, the associated phenotype.<sup>43,49</sup> Studies on genotype-phenotype correlations have pointed out that most substitutions falling in the extracellular domain of *ITGB4* are

usually associated with a more severe phenotype in comparison to variants located in the cytoplasmic tail.<sup>39,43,50,51</sup> Interestingly, six of the seven missense variants of *ITGB4* identified in JEB-PA with CAS patients are located in the extracellular domain (Figure 2B). Collectively, we can summarize that CAS occurs very frequently in patients with JEB-PA and, in general, are associated with severe phenotypes caused by PTC variants and/or missense variants located in the extracellular domain of *ITGB4*.

### **3.4 Congenital absence of skin (CAS) in dystrophic epidermolysis bullosa (DEB): genotype-phenotype correlation**

DEB is characterized by blistering within the sublamina densa region within the uppermost dermis and is inherited either by autosomal dominant (DDEB) or recessive (RDEB) manner.<sup>1</sup> *COL7A1*, the only gene associated with DEB, encodes type VII collagen, the major component of the anchoring fibrils. DEB shows considerable phenotypic variability, ranging from mild clinical signals, such as a limited tendency to blistering or nail involvement, to severe phenotype, including generalizing blistering, severe extracutaneous complications and early lethality.<sup>1,2,52</sup> DEB is classified in two main groups, based on the inheritance pattern, recessive DEB (RDEB) and dominant DEB (DDEB), and subdivided in many clinical subtypes, which consider the clinical signs and severity associated.<sup>1,2</sup>

We have identified a total of 99 cases of DEB and CAS with description of the genetic variants associated. DEB is, considering all main EB types, the one with more case reports of CAS. Although previously considered rare, CAS seems to be more common than the supposed, especially in DEB patients. A total of 81 different *COL7A1* pathogenic variants were identified associated with contrasting levels of severity (Table 3; Figure 2C). While in some patients the CAS is only the first clinical sign of a severe skin fragility to be manifested progressively throughout life, in other cases the disease rapidly ameliorates and may resolve completely over the first years of life.<sup>2,10</sup> This striking contrast of phenotypes demonstrates the importance of genotype-phenotype correlation studies, in order to understand how genetics influences this phenomenon in patients with such distinct skin fragility.

PTC variants resulting in the complete absence of collagen VII usually cause the most severe subtype, RDEB-severe.<sup>2,53,54</sup> It is likely that the severe effect of PTC variants itself, leading to extreme skin fragility, is the cause of CAS in patients carrying *COL7A1*

null variants, regardless of the specific causative mutation. On the other hand, missense variants in *COL7A1* are associated with a considerable phenotypic variability, since both the nature and position of amino acid substitutions differently affect collagen VII formation and expression.<sup>53,55</sup> It is possible to suggest, therefore, that specific missense variants may influence particular phenotypes, such as CAS.

The collagenous triple-helix domain (THD) of collagen VII is characterized by a repeating Gly-X-Y amino acid sequence, which contains 19 non-collagenous interruptions/imperfections.<sup>56</sup> Chiaverini et al.,<sup>5</sup> based on a case series of 22 patients and on two other previous reports, suggested a potential association of missense variants falling near THD interruptions and the occurrence of CAS in patients with moderate forms of DEB. New case reports published in recent years and our careful literature review allowed us to extend the analysis to a larger number of patients to investigate this proposed hypothesis. Indeed, of the 75 patients carrying missense variants, 65 (86.7%) presented at least one amino acid substitution close to the non-collagenous interruptions (Figure 3; Table 3). The THD domain is responsible for the pro-motility activity of collagen VII for human keratinocyte migration.<sup>57</sup> Mutations close to THD non-collagenous interruptions would lead to the formation of a less stable thermosensitive protein, which could explain this phenomenon.<sup>5,58</sup>

In contrast to this apparent correlation, some specific missense variants affect the central regions of the collagenous segment (Figure 3). Numerous *COL7A1* missense variants affect protein formation and function in different ways, leading to distinct biological consequences. Previous studies have proposed that the location of mutations and the resulting degree of abnormal folding could influence phenotypic effects.<sup>53</sup> It is plausible to suggest, therefore, that other specific portions of the collagenous domain play distinct roles in protein formation and stability, resulting, when disrupted, in distinct phenotypic effects, such as CAS. In this sense, the variant p.Gly2575Arg was demonstrated to interfere with the molecular stability and triple-helical domain assembly of collagen VII, while p.Gly2049Glu and p.Arg2063Trp cause local destabilization of the triple-helix domain and a reduced ability to support cell adhesion and migration.<sup>57</sup> Furthermore, the residues at positions 2063 and 2069 affect the Y position of a hydrophilic motif of collagen VII, which is crucial for protein function.<sup>5,56</sup> Therefore, although the amino acid substitutions occurring near non-collagenous interruptions seem to influence the manifestation of CAS in DEB, other variants

located in crucial portions of collagen VII can also result in this phenomenon by a mechanism not yet recognized, but may involve an alteration in the protein stability.

### **3.5 Study's Limitations and Important Considerations**

In this study our objective was to investigate possible genotype-phenotype correlations on EB with CAS and, therefore, we only included in the analysis cases with detailed genetic information. Several clinical case reports which could strengthen the revision on the clinical subtypes associated to CAS were not studied here.

Although our extensive investigation in the literature, it is possible that some reported cases of EB with CAS containing genetic data may eventually have not been included in this study. First, this condition is often omitted in reports, either because it is not the focus of the study or because it is a transitory condition and the lesions usually healed spontaneously after some weeks or months. Additionally, authors usually mention this condition using different terms, and therefore, a few studies may have escaped from our search. Since CAS is a specific and well-characterized clinical sign, we did not include in this review studies that mentioned exclusively 'severe skin fragility' or 'erosions at birth', as it could refer to other clinical signs.

It is important to note that there is a publication bias in the literature, since not all cases of CAS are reported, and this is a limitation of the present review. Individual case reports are not published often as before, since scientific journals usually prefer cohort studies. Still, even large cohort studies sometimes do not describe phenotypic details and the information about the occurrence of CAS may be lost. Therefore, although this study has included an extensive review of the described cases of CAS in EB, being representative of the literature, it is important to consider the existence of other non-published cases. We emphasize that a complete and accurate clinical description when reporting new medical cases is essential for subsequent studies on genotype-phenotype correlations.

Additionally, we consider important to consolidate the knowledge on CAS as a clinical sign associated with all EB types, and no longer a distinct syndrome.<sup>1</sup> While running this research, we have noticed that some authors still consider Bart's syndrome to be a separated disease with a defined inheritance pattern. Therefore, it is essential to make clear



that CAS is one of the several clinical signs associated with EB. We hope that this study, as well as the next studies, will help to consolidate this knowledge.

#### 4. Conclusions

This review expands the spectrum of known mutations in EB with CAS, strengthens previous hypotheses and gives new insights into a genotype-phenotype correlation. We have found that:

- In EBS with CAS, *KRT5* and *KRT14* missense variants are usually located at the highly conserved ends HIP and HTP, mostly associated with severe phenotypes. There is a notable high frequency of CAS in EBS-PA associated with *PLEC* gene and EBS-intermediate associated with the recently discovered gene *KLHL24*. Additional studies are needed to verify whether CAS is a constant clinical sign in this last subtype.
- In JEB, CAS is a recurrent clinical sign in patients with JEB severe with pyloric atresia, despite the rarity of this subtype. Most variants described in patients with JEB-PA and CAS are PTC variants or amino acid substitutions located in the extracellular domain of integrin  $\alpha6\beta4$ .
- DEB is, considering all main EB types, the one with more case reports of CAS, involving the highest phenotypic variability. Missense variants occurring near THD interruptions of collagen VII appear to influence this condition in DEB, suggesting that alterations in protein stability may be a mechanism involved.

Future studies will be important to confirm these findings and to elucidate the specific molecular processes involved. Previously considered a rare clinical sign, CAS seems to be more common in EB than expected. The present study is the largest review of cases of EB with CAS and will be important for future studies trying to understand the genetic background involved in this phenomenon.

#### Acknowledgments

This study was supported by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INaGeMP/CNPq/FAPERGS), grant number 465549/2014-4.

## References

1. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, et al. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(6):1103-26.
2. Has C, Bauer JW, Bodemer C, Bolling MC, Bruckner-Tuderman L, Diem A, et al. Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility. *Br J Dermatol.* 2020.
3. Bart BJ, Gorlin RJ, Anderson VE, Lynch FW. Congenital localized absence of skin and associated abnormalities resembling epidermolysis bullosa. A new syndrome. *Arch Dermatol.* 1966;93(3):296-304.
4. Bart BJ. Epidermolysis bullosa and congenital localized absence of skin. *Arch Dermatol.* 1970;101(1):78-81.
5. Chiaverini C, Charlesworth A, Fernandez A, Barbarot S, Bessis D, Bodemer C, et al. Aplasia cutis congenita with dystrophic epidermolysis bullosa: clinical and mutational study. *Br J Dermatol.* 2014;170(4):901-6.
6. Kayki G, Bozkaya D, Ozaltin F, Orhan D, Kaymaz F, Korkmaz E, et al. Epidermolysis Bullosa with Pyloric Atresia and Aplasia Cutis in a Newborn Due to Homozygous Mutation in ITGB4. *Fetal Pediatr Pathol.* 2017;36(4):332-9.
7. Lalor L, Titeux M, Palisson F, Fuentes I, Yubero MJ, Tasanen K, et al. Epidermolysis bullosa simplex-generalized severe type due to keratin 5 p.Glu477Lys mutation: Genotype-phenotype correlation and in silico modeling analysis. *Pediatr Dermatol.* 2019;36(1):132-8.
8. Smith SZ, Cram DL. A mechanobullous disease of the newborn. Bart's syndrome. *Arch Dermatol.* 1978;114(1):81-4.
9. Mariath LM, Santin JT, Frantz JA, Doriqui MJR, Kiszewski AE, Schuler-Faccini L. An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants. *Clin Genet.* 2019;96(3):189-98.
10. Boccaletti V, Zambruno G, Castiglia D, Magnani C, Tognetti E, Fabrizi G, et al. Recessive bullous dermolysis of the newborn in preterm siblings with a missense mutation in type VII collagen. *Pediatr Dermatol.* 2015;32(2):e42-7.
11. Diociaiuti A, Castiglia D, Giancristoforo S, Guerra L, Proto V, Dotta A, et al. Frequent Occurrence of Aplasia Cutis Congenita in Bullous Dermolysis of the Newborn. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(6):784-7.
12. Hashimoto K, Matsumoto M, Iacobelli D. Transient bullous dermolysis of the newborn. *Arch Dermatol.* 1985;121(11):1429-38.
13. Heinecke G, Marinkovich MP, Rieger KE. Intraepidermal Type VII Collagen by Immunofluorescence Mapping: A Specific Finding for Bullous Dermolysis of the Newborn. *Pediatr Dermatol.* 2017;34(3):308-14.
14. Zelickson B, Matsumura K, Kist D, Epstein EH, Bart BJ. Bart's syndrome. Ultrastructure and genetic linkage. *Arch Dermatol.* 1995;131(6):663-8.
15. Vivona G, Frontali M, Di Nunzio ML, Vendemiati A. Aplasia cutis congenita and/or epidermolysis bullosa. *Am J Med Genet.* 1987;26(2):497-502.
16. Lestringant GG, Akel SR, Qayed KI. The pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa syndrome. Report of a case and review of the literature. *Arch Dermatol.* 1992;128(8):1083-6.

17. Charlesworth A, Gagnoux-Palacios L, Bonduelle M, Ortonne JP, De Raeve L, Meneguzzi G. Identification of a lethal form of epidermolysis bullosa simplex associated with a homozygous genetic mutation in plectin. *J Invest Dermatol.* 2003;121(6):1344-8.
18. Chen Z, Bu W, Feng S, Wang H. Bart's syndrome in a family affected three consecutive generations with mutation c.6007G>A in COL7A1. *J Dermatol.* 2018;45(8):1000-2.
19. Birnbaum RY, Landau D, Elbedour K, Ofir R, Birk OS, Carmi R. Deletion of the first pair of fibronectin type III repeats of the integrin beta-4 gene is associated with epidermolysis bullosa, pyloric atresia and aplasia cutis congenita in the original Carmi syndrome patients. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(8):1063-6.
20. Arin MJ. The molecular basis of human keratin disorders. *Hum Genet.* 2009;125(4):355-73.
21. Coulombe PA, Kerns ML, Fuchs E. Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility. *J Clin Invest.* 2009;119(7):1784-93.
22. Arin MJ, Grimberg G, Schumann H, De Almeida H, Jr., Chang YR, Tadini G, et al. Identification of novel and known KRT5 and KRT14 mutations in 53 patients with epidermolysis bullosa simplex: correlation between genotype and phenotype. *Br J Dermatol.* 2010;162(6):1365-9.
23. Khani P, Ghazi F, Zekri A, Nasri F, Behrangi E, Aghdam AM, et al. Keratins and epidermolysis bullosa simplex. *J Cell Physiol.* 2018;234(1):289-97.
24. Bolling MC, Lemmink HH, Jansen GH, Jonkman MF. Mutations in KRT5 and KRT14 cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients. *Br J Dermatol.* 2011;164(3):637-44.
25. Fine JD. Epidemiology of Inherited Epidermolysis Bullosa Based on Incidence and Prevalence Estimates From the National Epidermolysis Bullosa Registry. *JAMA Dermatol.* 2016;152(11):1231-8.
26. Steinert PM. Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J Invest Dermatol.* 1993;100(6):729-34.
27. Lee CH, Kim MS, Chung BM, Leahy DJ, Coulombe PA. Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(7):707-15.
28. Pfindner E, Uitto J. Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Invest Dermatol.* 2005;124(1):111-5.
29. Natsuga K. Plectin-related skin diseases. *J Dermatol Sci.* 2015;77(3):139-45.
30. Winter L, Wiche G. The many faces of plectin and plectinopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2013;125(1):77-93.
31. Kariminejad A, Vahidnezhad H, Ghaderi-Sohi S, Ghannadan AR, Youssefian L, Parsimehr E, et al. Widespread aplasia cutis congenita in sibs with PLEC1 and ITGB4 variants. *Am J Med Genet A.* 2019;179(8):1547-55.
32. Han YM, Lee N, Byun SY, Cheon SJ, Ko HC. Bart's Syndrome with Novel Frameshift Mutations in the COL7A1 Gene. *Fetal Pediatr Pathol.* 2019;38(1):72-9.
33. Lin Z, Li S, Feng C, Yang S, Wang H, Ma D, et al. Stabilizing mutations of KLHL24 ubiquitin ligase cause loss of keratin 14 and human skin fragility. *Nat Genet.* 2016;48(12):1508-16.
34. He Y, Maier K, Leppert J, Hausser I, Schwieger-Briel A, Weibel L, et al. Monoallelic Mutations in the Translation Initiation Codon of KLHL24 Cause Skin Fragility. *Am J Hum Genet.* 2016;99(6):1395-404.
35. El Hachem M, Barresi S, Diociaiuti A, Boldrini R, Condorelli AG, Capoluongo E, et al. Phenotypic Features of Epidermolysis Bullosa Simplex due to KLHL24 Mutations in 3 Italian Cases. *Acta Derm Venereol.* 2019;99(2):238-9.

36. Bolling MC, Jonkman MF. KLHL24: Beyond Skin Fragility. *J Invest Dermatol.* 2019;139(1):22-4.
37. Has C. The "Kelch" Surprise: KLHL24, a New Player in the Pathogenesis of Skin Fragility. *J Invest Dermatol.* 2017;137(6):1211-2.
38. Kiritsi D, Kern JS, Schumann H, Kohlhase J, Has C, Bruckner-Tuderman L. Molecular mechanisms of phenotypic variability in junctional epidermolysis bullosa. *J Med Genet.* 2011;48(7):450-7.
39. Varki R, Sadowski S, Pfindner E, Uitto J. Epidermolysis bullosa. I. Molecular genetics of the junctional and hemidesmosomal variants. *J Med Genet.* 2006;43(8):641-52.
40. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, et al. A founder effect of c.1938delC in ITGB4 underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing. *Exp Dermatol.* 2011;20(1):74-6.
41. Mencía Á, García M, García E, Llamas S, Charlesworth A, de Lucas R, et al. Identification of two rare and novel large deletions in ITGB4 gene causing epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Exp Dermatol.* 2016;25(4):269-74.
42. Schumann H, Kiritsi D, Pigors M, Hausser I, Kohlhase J, Peters J, et al. Phenotypic spectrum of epidermolysis bullosa associated with  $\alpha\beta 4$  integrin mutations. *Br J Dermatol.* 2013;169(1):115-24.
43. Dang N, Klingberg S, Rubin AI, Edwards M, Borelli S, Relic J, et al. Differential expression of pyloric atresia in junctional epidermolysis bullosa with ITGB4 mutations suggests that pyloric atresia is due to factors other than the mutations and not predictive of a poor outcome: three novel mutations and a review of the literature. *Acta Derm Venereol.* 2008;88(5):438-48.
44. Orphanet. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data. Orphanet Report Series, Rare Diseases collection [Internet]. 2020; Number 1 : Diseases listed in alphabetical order. Available from: [http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence\\_of\\_rare\\_diseases\\_by\\_alphabetical\\_list.pdf](http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_diseases_by_alphabetical_list.pdf).
45. Iacovacci S, Cicuzza S, Odorisio T, Silvestri E, Kayserili H, Zambruno G, et al. Novel and recurrent mutations in the integrin beta 4 subunit gene causing lethal junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Exp Dermatol.* 2003;12(5):716-20.
46. Turcan I, Pasmooij AM, van den Akker PC, Lemmink H, Halmos GB, Sinke RJ, et al. Heterozygosity for a Novel Missense Mutation in the ITGB4 Gene Associated With Autosomal Dominant Epidermolysis Bullosa. *JAMA Dermatol.* 2016;152(5):558-62.
47. de Pereda JM, Lillo MP, Sonnenberg A. Structural basis of the interaction between integrin  $\alpha 6\beta 4$  and plectin at the hemidesmosomes. *Embo j.* 2009;28(8):1180-90.
48. Chung HJ, Uitto J. Epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Dermatol Clin.* 2010;28(1):43-54.
49. Micheloni A, De Luca N, Tadani G, Zambruno G, D'Alessio M. Intracellular degradation of beta4 integrin in lethal junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Br J Dermatol.* 2004;151(4):796-802.
50. Pulkkinen L, Kim DU, Uitto J. Epidermolysis bullosa with pyloric atresia: novel mutations in the beta4 integrin gene (ITGB4). *Am J Pathol.* 1998;152(1):157-66.
51. Nakano A, Pulkkinen L, Murrell D, Rico J, Lucky AW, Garzon M, et al. Epidermolysis bullosa with congenital pyloric atresia: novel mutations in the beta 4 integrin gene (ITGB4) and genotype/phenotype correlations. *Pediatr Res.* 2001;49(5):618-26.

52. Varki R, Sadowski S, Uitto J, Pfenner E. Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J Med Genet.* 2007;44(3):181-92.
53. Dang N, Murrell DF. Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol.* 2008;17(7):553-68.
54. Christiano AM, Anhalt G, Gibbons S, Bauer EA, Uitto J. Premature termination codons in the type VII collagen gene (COL7A1) underlie severe, mutilating recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Genomics.* 1994;21(1):160-8.
55. Hovnanian A, Rochat A, Bodemer C, Petit E, Rivers CA, Prost C, et al. Characterization of 18 new mutations in COL7A1 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa provides evidence for distinct molecular mechanisms underlying defective anchoring fibril formation. *Am J Hum Genet.* 1997;61(3):599-610.
56. Christiano AM, Greenspan DS, Lee S, Uitto J. Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the alpha 1(VII) chain and identification of intragenic polymorphisms. *J Biol Chem.* 1994;269(32):20256-62.
57. Woodley DT, Hou Y, Martin S, Li W, Chen M. Characterization of molecular mechanisms underlying mutations in dystrophic epidermolysis bullosa using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 2008;283(26):17838-45.
58. Chiaverini C, Charlesworth AV, Youssef M, Cuny JF, Rabia SH, Lacour JP, et al. Inversa dystrophic epidermolysis bullosa is caused by missense mutations at specific positions of the collagenic domain of collagen type VII. *J Invest Dermatol.* 2010;130(10):2508-11.
59. Mariath LM, Santin JT, Frantz JA, Doriqui MJR, Schuler-Faccini L, Kiszewski AE. Epidermolysis bullosa with congenital absence of skin: Clinical and genetic characterization of a 23-case series. *Clin Genet.* 2020.
60. Gostyńska KB, Bremer J, van Dijk-Bos KK, Sinke R, Pasmooij AM, Jonkman MF. In-frame Exon Skipping in KRT5 due to Novel Intronic Deletion Causes Epidermolysis Bullosa Simplex, Generalized Severe. *Acta Derm Venereol.* 2017;97(1):105-7.
61. García M, Santiago JL, Terrón A, Hernández-Martín A, Vicente A, Fortuny C, et al. Two novel recessive mutations in KRT14 identified in a cohort of 21 Spanish families with epidermolysis bullosa simplex. *Br J Dermatol.* 2011;165(3):683-92.
62. Yiasemides E, Trisnowati N, Su J, Dang N, Klingberg S, Marr P, et al. Clinical heterogeneity in recessive epidermolysis bullosa due to mutations in the keratin 14 gene, KRT14. *Clin Exp Dermatol.* 2008;33(6):689-97.
63. Ciubotaru D, Bergman R, Baty D, Indelman M, Pfenner E, Petronius D, et al. Epidermolysis bullosa simplex in Israel: clinical and genetic features. *Arch Dermatol.* 2003;139(4):498-505.
64. Charlesworth A, Chiaverini C, Chevrant-Breton J, DelRio M, Diociaiuti A, Dupuis RP, et al. Epidermolysis bullosa simplex with PLEC mutations: new phenotypes and new mutations. *Br J Dermatol.* 2013;168(4):808-14.
65. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Arita K, Nakamura H, Ohyama M, et al. Plectin deficiency leads to both muscular dystrophy and pyloric atresia in epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mutat.* 2010;31(10):E1687-98.
66. Nakamura H, Sawamura D, Goto M, McMillan JR, Park S, Kono S, et al. Epidermolysis bullosa simplex associated with pyloric atresia is a novel clinical subtype caused by mutations in the plectin gene (PLEC1). *J Mol Diagn.* 2005;7(1):28-35.

67. Yenamandra VK, van den Akker PC, Lemmink HH, Jan SZ, Diercks GFH, Vermeer M, et al. Cardiomyopathy in patients with epidermolysis bullosa simplex with mutations in KLHL24. *Br J Dermatol.* 2018;179(5):1181-3.
68. Alkhalifah A, Chiaverini C, Charlesworth A, Has C, Lacour JP. Burnlike scars: A sign suggestive of KLHL24-related epidermolysis bullosa simplex. *Pediatr Dermatol.* 2018;35(3):e193-e5.
69. Schierz IAM, Giuffrè M, Del Vecchio A, Antona V, Corsello G, Piro E. Recognizable neonatal clinical features of aplasia cutis congenita. *Ital J Pediatr.* 2020;46(1):25.
70. Okulu E, Durmaz CD, Tunc G, Guzel A, Kutlay NY, Erdevi O, et al. A novel mutation in ITGB4 gene in a newborn with epidermolysis bullosa, pyloric atresia, and aplasia cutis congenita. *Egypt J Med Hum Genet.* 2020;21(16):1-4.
71. Wang JY, Marinkovich MP, Rieger KE. Epidermolysis bullosa with pyloric atresia consistently demonstrates concurrent low intra-basal epidermal and lamina lucida cleavage planes: a survey of six cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;34(4):e200-e3.
72. Stoevesandt J, Borozdin W, Girschick G, Hamm H, Höcht B, Kohlhase J, et al. Lethal junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia due to compound heterozygosity for two novel mutations in the integrin  $\beta 4$  gene. *Klin Padiatr.* 2012;224(1):8-11.
73. Allegra M, Gagnoux-Palacios L, Gache Y, Roques S, Lestringant G, Ortonne JP, et al. Rapid decay of  $\alpha 6$  integrin caused by a mis-sense mutation in the propeller domain results in severe junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Invest Dermatol.* 2003;121(6):1336-43.
74. Pulkkinen L, Rouan F, Bruckner-Tuderman L, Wallerstein R, Garzon M, Brown T, et al. Novel ITGB4 mutations in lethal and nonlethal variants of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: missense versus nonsense. *Am J Hum Genet.* 1998;63(5):1376-87.
75. Ruzzi L, Gagnoux-Palacios L, Pinola M, Belli S, Meneguzzi G, D'Alessio M, et al. A homozygous mutation in the integrin  $\alpha 6$  gene in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Clin Invest.* 1997;99(12):2826-31.
76. Vidal F, Aberdam D, Miquel C, Christiano AM, Pulkkinen L, Uitto J, et al. Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Nat Genet.* 1995;10(2):229-34.
77. Dănescu S, Has C, Senila S, Ungureanu L, Cosgarea R. Epidemiology of inherited epidermolysis bullosa in Romania and genotype-phenotype correlations in patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(5):899-903.
78. van den Akker PC, Mellerio JE, Martinez AE, Liu L, Meijer R, Dopping-Hepenstal PJ, et al. The inversa type of recessive dystrophic epidermolysis bullosa is caused by specific arginine and glycine substitutions in type VII collagen. *J Med Genet.* 2011;48(3):160-7.
79. Giner T, Has C, Goebeler M, Leverkus M, Bröcker E-B, Hamm H. An Adult Patient with a Rare Subform of Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Inversa (Gedde-Dahl). *The Open Dermatology Journal.* 2010;4:52-4.
80. Jerábková B, Kopecková L, Bucková H, Veselý K, Valícková J, Fajkusová L. Analysis of the COL7A1 gene in Czech patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals novel and recurrent mutations. *J Dermatol Sci.* 2010;59(2):136-40.
81. Dang N, Klingberg S, Marr P, Murrell DF. Review of collagen VII sequence variants found in Australasian patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals nine novel COL7A1 variants. *J Dermatol Sci.* 2007;46(3):169-78.

82. Gardella R, Zoppi N, Zambruno G, Barlati S, Colombi M. Different phenotypes in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients sharing the same mutation in compound heterozygosity with two novel mutations in the type VII collagen gene. *Br J Dermatol.* 2002;147(3):450-7.
83. Christiano AM, McGrath JA, Tan KC, Uitto J. Glycine substitutions in the triple-helical region of type VII collagen result in a spectrum of dystrophic epidermolysis bullosa phenotypes and patterns of inheritance. *Am J Hum Genet.* 1996;58(4):671-81.
84. Winberg JO, Hammami-Hauasli N, Nilssen O, Anton-Lamprecht I, Naylor SL, Kerbacher K, et al. Modulation of disease severity of dystrophic epidermolysis bullosa by a splice site mutation in combination with a missense mutation in the COL7A1 gene. *Hum Mol Genet.* 1997;6(7):1125-35.
85. Christiano AM, Bart BJ, Epstein EH, Uitto J. Genetic basis of Bart's syndrome: a glycine substitution mutation in the type VII collagen gene. *J Invest Dermatol.* 1996;106(6):1340-2.

## Figures Legends

**Figure 1. Congenital absence of skin in patients with epidermolysis bullosa.**

**Figure 2. Schematic representation of all pathogenic variants described to date in patients with epidermolysis bullosa and congenital absence of skin.** The pathogenic variants are represented in the respective locations in the proteins domains. The numbers in parentheses indicate the number of individuals in which the variant was identified. (A) Variants in keratin 5, keratin 14, plectin and kelch-like 24 associated with epidermolysis bullosa simplex. (B) Variants in integrin  $\beta 4$ , integrin  $\alpha 6$  and  $\gamma 2$  chain of laminin-332 associated with junctional epidermolysis bullosa. (C) Variants in collagen VII associated with dystrophic epidermolysis bullosa.

**Figure 3. Schematic representation of all *COL7A1* missense variants at triple-helix domain identified thus far in dystrophic epidermolysis bullosa with congenital absence of skin.** The triple-helix domain (THD) of collagen VII is shown in detail. The 19 noncollagenous interruptions are indicated in black bars. Lower variants are the ones located near the interruptions of THD. The numbers in parentheses indicate the number of individuals in which the variant was identified. The interruptions are shown in both italic and grey highlighted. The mutated amino acids are in both bold and red.



**Table 1. Revision of all genetic variants described to date in patients with epidermolysis bullosa simplex (EBS) and congenital absence of skin.**

Ref ID	EB Subtype	Variant 1	Variant 2
(59) #EB01	EBS-loc	<i>KRT14</i> , p.Arg125Cys	-
(7) #Patient 1	EBS-gen sev	<i>KRT5</i> , p.Glu477Lys	-
#Patient 2	EBS-gen sev	<i>KRT5</i> , p.Glu477Lys	-
#Patient 4	EBS-gen sev	<i>KRT5</i> , p.Glu477Lys	-
#Patient 5	EBS-gen sev	<i>KRT5</i> , p.Glu477Lys	-
#Patient 6	EBS-gen sev	<i>KRT5</i> , p.Glu477Lys	-
(60) #Index patient - II-3	EBS-gen sev	<i>KRT5</i> , c.1218+2_1218+31del	-
(24) #6 - EB201	EBS-gen	<i>KRT5</i> , p.Ala180Asp	-
#40 - EB205	EBS-gen	<i>KRT14</i> , c.1240_1249del	-
(61) #2	EBS-DM <sup>b</sup>	<i>KRT14</i> , p.Arg125Cys	-
#3	EBS-DM <sup>b</sup>	<i>KRT14</i> , p.Arg125Cys	-
#6	EBS-DM <sup>b</sup>	<i>KRT5</i> , p.Glu477Lys	-
#17	EBS recessive	<i>KRT14</i> , p.Lys116Ter	<i>KRT14</i> , p.Lys116Ter
(62) #Proband	EBS recessive	<i>KRT14</i> , p.Tyr204Ter	<i>KRT14</i> , p.Tyr204Ter
(63) #Family 1 - proband	EBS-recessive	<i>KRT14</i> , p.Gln396Ter	<i>KRT14</i> , p.Gln396Ter
(31) #Family 2 (2)	ND <sup>c</sup>	<i>PLEC</i> , c.1058_1067del <sup>e</sup>	
(64) #Patient 1	EBS-PA	<i>PLEC</i> , c.3342-2A>G	<i>PLEC</i> , c.3902_3903del
(65) #1	EBS-PA and MD	<i>PLEC</i> , p.Glu3662Ter	<i>PLEC</i> , c.11453_11462del
(28) #2	EBS-PA	<i>PLEC</i> , p.Gln305Ter	<i>PLEC</i> , p.Gln305Ter
#4	EBS-PA	<i>PLEC</i> , c.2769_2788del	<i>PLEC</i> , c.2769_2788del
(66) #Proband 1	EBS-PA	<i>PLEC</i> , p.Gln305Ter	<i>PLEC</i> , c.1344G>A <sup>§</sup>
#Proband 2 <sup>a</sup>	EBS-PA	<i>PLEC</i> , p.Arg1189Ter	<i>PLEC</i> , p.Gln2538Ter <i>PLEC</i> , p.Arg1189Ter
(17) #Probands 1 and 2 (2)	EBS recessive <sup>d</sup>	<i>PLEC</i> , c.2680_2693del <sup>f</sup>	<i>PLEC</i> , c.2680_2693del <sup>f</sup>
(35) #Case 1	EBS	<i>KLHL24</i> , c.2T>C	-
#Case 2	EBS	<i>KLHL24</i> , c.3G>A	-
#Case 3	EBS	<i>KLHL24</i> , c.2T>C	-
(67) #Index patient - III:2	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
(68) #Case Report	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
(33) #Patient 1	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Patient 2	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Patient 3	EBS	<i>KLHL24</i> , c.3G>T	-
#Patient 4	EBS	<i>KLHL24</i> , c.3G>A	-
#Patient 5	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
(34) #Family A (2)	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Family B (3)	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Family C	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Family D	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Family E	EBS	<i>KLHL24</i> , c.2T>C	-
#Family F	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Family G	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Family H	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Family I	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
#Family J (2)	EBS	<i>KLHL24</i> , c.1A>G	-
<b>Total of patients: 49</b>			

EBS-loc: EBS, localized; EBS-gen sev: EBS, generalized severe; EBS-PA: EBS with pyloric atresia; EBS-PA and MD: EBS with pyloric atresia and muscular dystrophy; EBS-DM: Dowling-Meara ND: Not defined. Variants nomenclature are in accordance to the HGVS recommendations, and that is the reason why some variants can be differently described in the original publication. The subtype indication is the same as described in the original article; some nomenclatures have been modified in the most recent EB classification (2014; 2020).<sup>1,2</sup> In the 'ID' column, the number indicated in parentheses indicates the number of cases described within the same family.

<sup>a</sup> Nomenclature not used anymore. Subtype equivalent to EBS-severe.

<sup>b</sup> Patient harbored a heterozygous mutation (p.Gln2538Ter) and homozygous mutations (p.Arg1189Ter).

<sup>c</sup> The authors described the phenotype just as 'aplasia cutis congenita', with no mention on the epidermolysis bullosa subtype. The two siblings described in the article died within the first 24h after birth. Since pathogenic variants in *PLEC* are associated with EB, we have included these cases in this revision.

<sup>d</sup> Although the suggestive phenotype of EB-PA, the occurrence of PA was not substantiated.

<sup>e</sup> Heterozygous variant identified in consanguineous parents.

<sup>f</sup> The numbering of the mutation differs from that in the original publication due to the adjustment according to the plectin reference NM\_000445 (NCBI).

<sup>g</sup> Splice-site variant.

**Table 2. Revision of all genetic variants described to date in patients with junctional epidermolysis bullosa (JEB) and congenital absence of skin.**

Ref	ID	EB Subtype	Variant 1	Variant 2
(69)	#1	JEB-gen sev	<i>LAMC2</i> , c.1A>G	<i>LAMC2</i> , c.1A>G
	#2	JEB-gen sev	<i>LAMC2</i> , p.Arg223Ter	<i>LAMC2</i> , p.Arg223Ter
(70)	#1	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.565_566+2del	<i>ITGB4</i> , c.565_566+2del
(71)	#Case 5	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.1860+1G>A	<i>ITGB4</i> , c.2254+1G>T
(31)	#Family 1 (2)	ND <sup>a</sup>	<i>ITGB4</i> , c.1342delinsTGGACA <sup>b</sup>	
(6)	#1	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.3793+1G>A	<i>ITGB4</i> , c.3793+1G>A
(41)	#Patient 3	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.470_566+182del	<i>ITGB4</i> , c.2783-2A>G
	#Patient 4	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.3321_3331del	<i>ITGB4</i> , p.Tyr333Asp
	#Patients 5 and 6 (2)	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , p.Gly234Val	<i>ITGB4</i> , c.3707_3725del
(72)	#1	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.600dupC	<i>ITGB4</i> , p.Gln845Ter
(43)	#EB049	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , p.Gly273Asp	<i>ITGB4</i> , c.3903dupC
(19)	#Family 1 - P1	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.3226_3795del <sup>c</sup>	<i>ITGB4</i> , c.3226_3795del <sup>c</sup>
	#Family 2 - P2 and P3 (2)	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.3226_3795del <sup>c</sup>	<i>ITGB4</i> , c.3226_3795del <sup>c</sup>
(73)	#1	JEB-PA	<i>ITGA6</i> , p.Ser47Leu	<i>ITGA6</i> , p.Ser47Leu
(45)	#Patient 1	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.952_954del <sup>d</sup>	Not identified
(51)	#Family B	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , p.Asp131Tyr	<i>ITGB4</i> , p.Gly273Asp
(74)	#Family 3 - proband's sibling	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , p.Arg1281Trp	<i>ITGB4</i> , p.Arg252Cys
(50)	# Family 2 - proband's sibling	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.120_121del	<i>ITGB4</i> , p.Cys245Gly
(75)	#1	JEB-PA	<i>ITGA6</i> , c.791del	<i>ITGA6</i> , c.791del
(76)	#1	JEB-PA	<i>ITGB4</i> , c.1150del	<i>ITGB4</i> , c.3801+2_3801+3insT
	<b>Total of patient: 23</b>			

JEB-gen sev: JEB, generalized severe; JEB-PA: JEB with pyloric atresia. Variants nomenclature are in accordance to the HGVS recommendations, and that is the reason why some variants can be differently described in the original publication. In the 'ID' column, the number indicated in parentheses indicates the number of cases described within the same family.

<sup>a</sup> The authors described the phenotype just as 'aplasia cutis congenita', with no mention on the epidermolysis bullosa subtype. The first case died a few hours after birth and the second case had intrauterine fetal death at 25 weeks of pregnancy. Since pathogenic variants in *ITGB4* are associated with EB, we have included these cases in this revision.

<sup>b</sup> Heterozygous variant identified in consanguineous parents.

<sup>c</sup> Deletion of exons 27-30 of *ITGB4*.

<sup>d</sup> Variant also known as ΔN318del.

**Table 3. Revision of all genetic variants described to date in patients with dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) and congenital absence of skin.**

Ref ID	EB Subtype	Variant 1	Variant 2
(59) EB03/EB04 (2)	DDEB-loc	<b>COL7A1, p.Gly2015Glu</b>	-
EB05	RDEB-sev	COL7A1, c.325_326insCG	COL7A1, c.325_326insCG
EB06	RDEB-sev	COL7A1, c.1758del	COL7A1, c.1758del
EB07	RDEB-sev	COL7A1, p.Arg1683Ter	COL7A1, p.Arg1683Ter
EB08	RDEB-sev	<b>COL7A1, p.Gly1913Cys</b>	COL7A1, p.Arg1343Ter
EB09	RDEB-sev	COL7A1, p.Gln1460Ter	COL7A1, c.1758del
EB10	RDEB-sev	<b>COL7A1, p.Gly2731Cys</b>	<b>COL7A1, p.Gly2731Cys</b>
EB11	RDEB-sev	COL7A1, p.Arg1683Ter	COL7A1, p.Gly1430Ter
EB12/EB13 (2)	RDEB-sev	<b>COL7A1, p.Gly2360Arg</b>	COL7A1, c.58_70del
EB14	RDEB-sev	COL7A1, c.6527dupC	COL7A1, c.325_326insCG
EB15	RDEB-sev	COL7A1, p.Arg669Ter	COL7A1, p.Arg669Ter
EB16	RDEB-intermed	COL7A1, c.8109+1G>T	COL7A1, p.Gly2653Arg
EB17	RDEB-intermed	COL7A1, p.Arg1683Ter	<b>COL7A1, p.Arg2008Cys</b>
EB18	RDEB-intermed	COL7A1, p.Gln1817Ter	Not identified
EB19	RDEB-intermed	COL7A1, p.Gln2417Ter	<b>COL7A1, p.Gly2006Ser</b>
EB20	RDEB-loc	<b>COL7A1, p.Arg2008Cys</b>	COL7A1, c.4011G>A, p.(=)
EB21	RDEB-loc	COL7A1, p.Arg1683Ter	COL7A1, c.5124+1G>A
EB22	RDEB-loc	COL7A1, c.6527dupC	COL7A1, p.Arg2580Cys
EB23	RDEB, ND	COL7A1, p.Arg1683Ter	COL7A1, p.Gln2417Ter
(32) #Case Report	RDEB-gen sev	COL7A1, c.3841_3843delinsTGGGG	COL7A1, c.8109_8109+5del
(18) #Family (3)	DDEB	<b>COL7A1, p.Gly2003Arg</b>	-
(13) #Patient 4	RDEB-BDN	COL7A1, p.Gly1667Glu; <b>COL7A1, p.Pro1940Leu;</b> COL7A1, p.Arg2633Trp	(3 pathogenic variants identified)
(11) #Case 1	RDEB-BDN	COL7A1, c.497dupA	<b>COL7A1, p.Gly2216Glu</b>
#Case 2	RDEB-BDN	COL7A1, c.4783-1G>A	<b>COL7A1, p.Pro1699Leu</b>
(77) #6	RDEB-gen sev	COL7A1, c.425A>G <sup>d</sup>	Not identified
#8	RDEB-gen sev	COL7A1, c.425A>G <sup>d</sup>	COL7A1, p.Arg669Ter
(5) #1	RDEB-gen sev	COL7A1, p.Arg1343Ter	COL7A1, p.Arg1343Ter
#2	RDEB-gen sev	COL7A1, c.5944_5945delinsTA	COL7A1, c.5944_5945delinsTA
#3	RDEB-gen sev	COL7A1, c.425A>G <sup>d</sup>	COL7A1, c.425A>G <sup>d</sup>
#4	RDEB-gen sev	COL7A1, p.Arg2610Ter	COL7A1, p.Arg2610Ter
#5	RDEB-gen sev	COL7A1, c.7929+2T>C	COL7A1, c.6527dupC
#6	RDEB-gen sev	COL7A1, c.4518+1G>C	COL7A1, c.502_503insG
#7	RDEB-gen sev	COL7A1, p.Gly2575Arg	COL7A1, c.4212_4213ins8
#8/9 (2)	DDEB	<b>COL7A1, p.Gly1928Arg</b>	-
#10/11 (2)	DDEB	<b>COL7A1, p.Gly2003Arg</b>	-
#12	RDEB-other	COL7A1, p.Gly1483Asp	COL7A1, p.Gly1483Asp
#13	RDEB-other	COL7A1, p.Gly2575Arg	<b>COL7A1, p.Gly2778Asp</b>
#14	RDEB-other	<b>COL7A1, p.Arg2008Gly</b>	COL7A1, c.474_485dupins11del18
#15	RDEB-other	<b>COL7A1, p.Gly2221Ala</b>	COL7A1, c.7930-1G>C
#16	RDEB-other	COL7A1, p.Ser47Leu	COL7A1, p.Arg2492Ter
#17	RDEB-other	COL7A1, c.5398_5425del	COL7A1, c.5398_5425del
#18	RDEB-other	COL7A1, c.6900+1G>A	<b>COL7A1, p.Arg2791Trp</b>
#19	RDEB-other	Not identified	COL7A1, c.425A>G <sup>c, d</sup>
#20/21 (2)	RDEB-inv	<b>COL7A1, p.Gly2781Arg</b>	COL7A1, p.Arg1632Ter
#22	RDEB-inv	<b>COL7A1, p.Gly2472Asp</b>	COL7A1, c.1874_1875del
(78) #1	RDEB-inv	COL7A1, p.Gly2695Ser	COL7A1, p.Gly2695Ser
#4	RDEB-inv	<b>COL7A1, p.Arg2069Cys</b>	<b>COL7A1, p.Arg2069Cys</b>
#9	RDEB-inv	<b>COL7A1, p.Gly2213Arg</b>	COL7A1, c.4918del
#11	RDEB-inv	<b>COL7A1, p.Arg2069Cys</b>	COL7A1, c.5662_5663insG

	#14	RDEB-inv	<b>COL7A1, p.Gly2775Ser</b>	<i>COL7A1</i> , c.425A>G <sup>d</sup>
	#17	RDEB-inv	<b>COL7A1, Gly1907Asp</b>	<i>COL7A1</i> , p.Arg1687Ter
(79)	#Case report	RDEB-inv	<i>COL7A1</i> , c.425A>G <sup>d</sup>	<b>COL7A1, p.Arg2069Cys</b>
(80)	#1	RDEB-gen sev	<i>COL7A1</i> , c.425A>G <sup>d</sup>	<i>COL7A1</i> , c.425A>G <sup>d</sup>
	#4	RDEB-gen sev	<i>COL7A1</i> , c.425A>G <sup>d</sup>	<i>COL7A1</i> , c.682+1G>A
	#7	RDEB-gen sev	<i>COL7A1</i> , c.425A>G <sup>d</sup>	<i>COL7A1</i> , p.Gly2049Glu
	#9	RDEB-gen sev	<i>COL7A1</i> , c.425A>G <sup>d</sup>	<b>COL7A1, p.Arg2063Trp</b>
	#12	RDEB-gen sev	<i>COL7A1</i> , p.Arg1343Ter	<i>COL7A1</i> , p.Gly2557Arg
	#14	RDEB-gen sev	<i>COL7A1</i> , p.Gly2049Glu	<i>COL7A1</i> , c.5644dupA
	#17	RDEB-gen sev	<i>COL7A1</i> , c.6751-2_6751-1del	<i>COL7A1</i> , c.6751-2_6751-1del
	#19	RDEB-inv	<b>COL7A1, p.Arg2069Cys</b>	<i>COL7A1</i> , c.425A>G <sup>d</sup>
	#21	RDEB-inv	<b>COL7A1, p.Arg2069Cys</b>	<i>COL7A1</i> , p.Arg1340Ter
	#25	RDEB-other	<i>COL7A1</i> , p.Arg525Ter	<b>COL7A1, p.Gly2296Glu</b>
	#28	DDEB	<b>COL7A1, p.Gly2003Arg</b>	-
	#32	DDEB	<b>COL7A1, p.Gly2070Arg</b>	-
	#33	DDEB-gen	<b>COL7A1, p.Gly2076Asp</b>	-
(81)	#EB43	RDEB-nHS <sup>a</sup>	<i>COL7A1</i> , c.3478del	<b>COL7A1, p.Gly2775Ser</b>
	#EB17-VI:12	DDEB	<b>COL7A1, p.Arg2791Trp</b> + <b>p.Gly2210Val<sup>e</sup></b>	-
(82)	#Case 2 - nHS-RDEB	RDEB-nHS <sup>a</sup>	<b>COL7A1, p.Arg2063Trp</b>	<i>COL7A1</i> , 4965C>T <sup>d</sup>
(83)	#Proband of Family 4	RDEB-mitis <sup>b</sup>	<i>COL7A1</i> , p.Gly2653Arg	<i>COL7A1</i> , p.Arg2471Ter
(84)	#LB4-1	RDEB-loc	<b>COL7A1, p.Gly2009Arg</b>	<i>COL7A1</i> , c.8523_8527+9del
(85)	#Family (22)	DDEB	<b>COL7A1, p.Gly2003Arg</b>	-
	<b>Total of patients: 99</b>			

RDEB: recessive DEB; DDEB: dominant DEB; -sev: severe; -intermed: intermediate; -gen: generalized; -inv: inversa; -loc: localized; -BDN: bullous dermolysis of the newborn; -nHS: non-Hallopeau-Siemens. ND: Not defined. Missense variants occurring close to the noncollagenous interruptions of the THD are in **bold**. Variants nomenclature are in accordance to the HGVS recommendations, and that is the reason why some variants can be differently described in the original publication. The subtype indication is the same as described in the original article; some nomenclatures have been modified in the most recent EB classification (2020).<sup>2</sup> In the 'ID' column, the number indicated in parentheses indicates the number of cases described within the same family.

<sup>a</sup> Nomenclature not used anymore. Subtype equivalent to RDEB-intermed;

<sup>b</sup> Nomenclature not used anymore. Subtype equivalent to RDEB-loc;

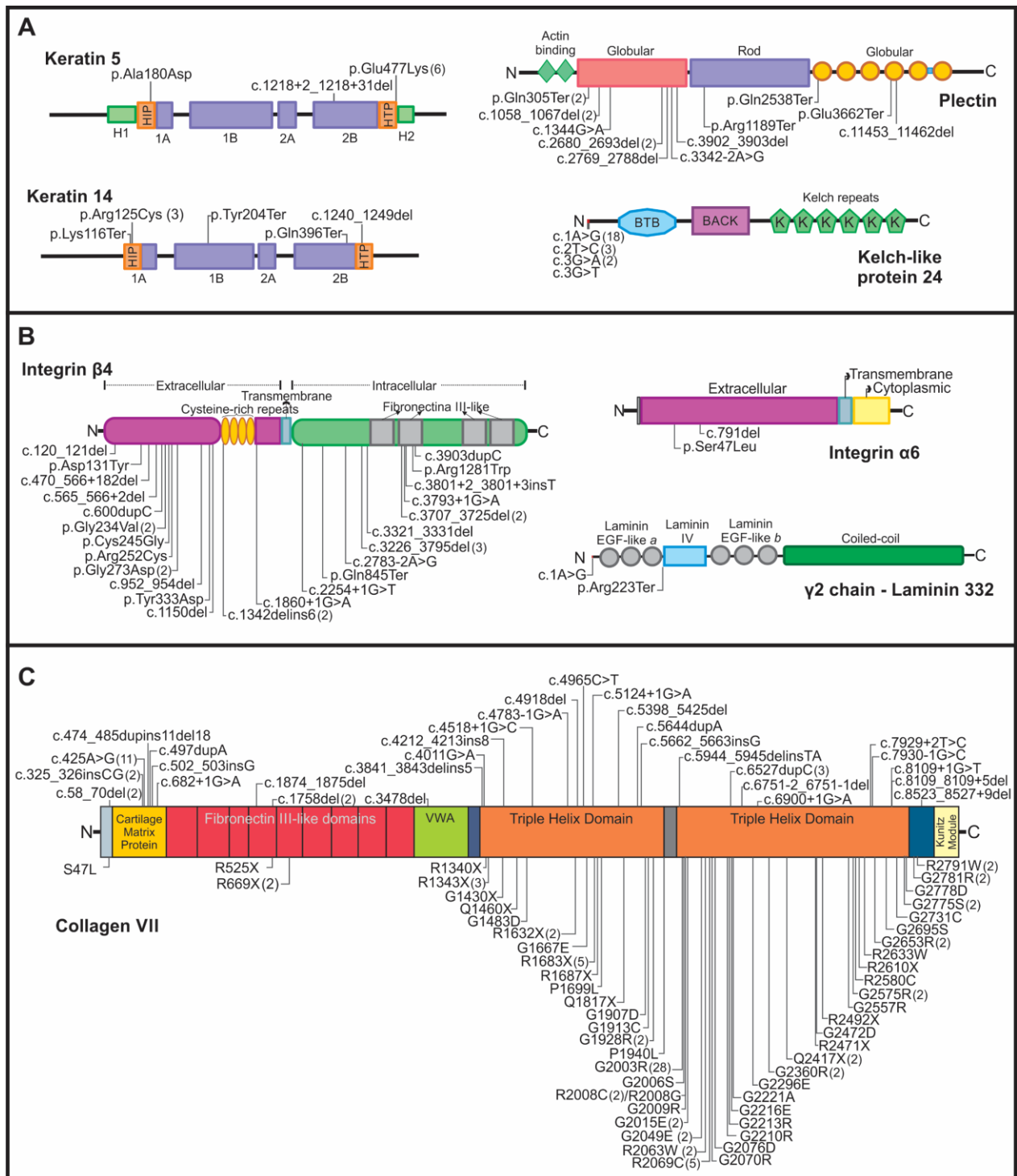
<sup>c</sup> In the original article described as c.425G/A, probably a mistake, the correct variant nomenclature is c.425A>G;

<sup>d</sup> Splice-site variant;

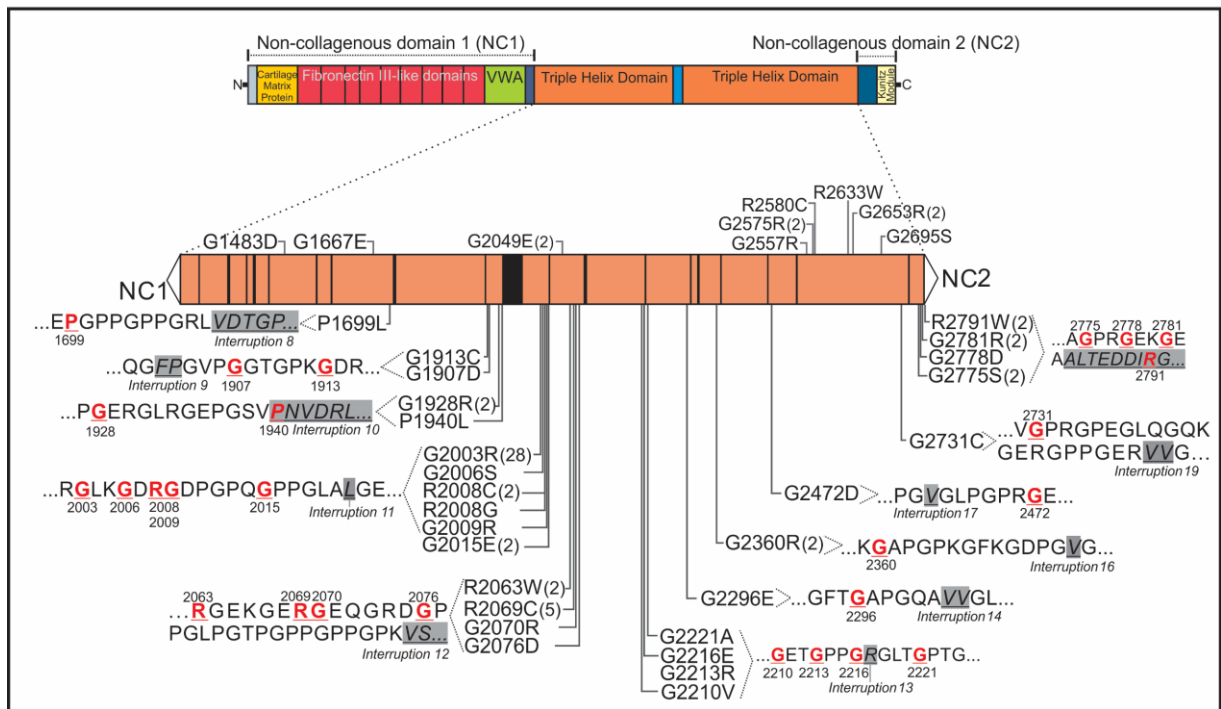
<sup>e</sup> The two variants were identified on the same allele.



**Figure 1. Congenital absence of skin in patients with epidermolysis bullosa.**



**Figure 2. Schematic representation of all pathogenic variants described to date in patients with epidermolysis bullosa and congenital absence of skin.** The pathogenic variants are represented in the respective locations in the proteins domains. The numbers in parentheses indicate the number of individuals in which the variant was identified. (A) Variants in keratin 5, keratin 14, plectin and kelch-like 24 associated with epidermolysis bullosa simplex. (B) Variants in integrin beta 4, integrin alpha 6 and gamma 2 chain of laminin-332 associated with junctional epidermolysis bullosa. (C) Variants in collagen VII associated with dystrophic epidermolysis bullosa.



**Figure 3. Schematic representation of all *COL7A1* missense variants at triple-helix domain identified thus far in dystrophic epidermolysis bullosa with congenital absence of skin.** The triple-helix domain (THD) of collagen VII is shown in detail. The 19 noncollagenous interruptions are indicated in black bars. Lower variants are the ones located near the interruptions of THD. The numbers in parentheses indicate the number of individuals in which the variant was identified. The interruptions are shown in both italic and grey highlighted. The mutated amino acids are in both bold and red.



## **CAPÍTULO VII**

---

### **ARTIGO 4**

**A importância do resultado genético para o diagnóstico de epidermólise bolhosa e como variantes de *splicing* podem influenciar a gravidade da doença**

Manuscrito em preparação

## **A importância do resultado genético para o diagnóstico de epidermólise bolhosa e como variantes de *splicing* podem influenciar a gravidade da doença**

Luiza Monteavaro Mariath<sup>1</sup>, Juliana Tosetto Santin<sup>2</sup>, Jeanine Aparecida Frantz<sup>3,4</sup>, Maria Juliana Rodovalho Doriqui<sup>5</sup>, Ana Elisa Kiszewski<sup>6,7</sup>, Lavínia Schuler-Faccini<sup>1,8</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Regional de Blumenau, Brasil.

<sup>4</sup> DEBRA-Brasil, Brasil.

<sup>5</sup> Seção de Genética Médica, Hospital Infantil Dr. Juvêncio Mattos, Brasil.

<sup>6</sup> Seção de Dermatologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brasil.

<sup>7</sup> Seção de Dermatologia Pediátrica, Hospital da Criança Santo Antônio, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brasil.

<sup>8</sup> Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP), Brasil.

### *Introdução*

Em países de baixa e média renda, como o Brasil, a maior parte dos pacientes com Epidermólise Bolhosa (EB) são diagnosticados através apenas de exame clínico, dada a inacessibilidade ou dificuldade técnica de exames adicionais de diagnóstico. Um painel de 11 genes específico para EB foi desenvolvido e se mostrou eficaz para a detecção das variantes patogênicas e para o diagnóstico do subtipo associado de 94,3% dos pacientes com EB analisados (Mariath *et al.*, 2019). O presente estudo surgiu da curiosidade de se verificar a importância do resultado genético para o correto diagnóstico. Dessa forma, o objetivo desse estudo é comparar a hipótese clínica inicial e o diagnóstico genético definitivo de uma amostra brasileira de EB, estimando a proporção de casos em que o resultado genético foi essencial para o diagnóstico final. Além disso, um segundo objetivo desse estudo é caracterizar as variantes genéticas associadas aos casos cujo exame clínico não foi capaz, sozinho, de indicar o diagnóstico, buscando correlacionar o efeito dessas variantes ao fenótipo atípico associado.

### *Materiais e Métodos*

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada por dermatologistas especialistas em EB, que indicaram o provável subtipo clínico associado. Na impossibilidade de o exame ser realizado por dermatologista, fotografias dos pacientes foram subsequentemente analisadas. Pacientes que não foram classificados quanto ao provável subtipo clínico de EB, ou cujo resultado genético não apontou a variante causal, foram excluídos dessa análise. Assim, a amostra incluída nesse estudo compreendeu um total de 76 casos índice que tiveram o diagnóstico clínico inicial e o resultado genético definitivo. O painel de genes de sequenciamento de nova geração incluiu os principais genes da EB (*KRT5*, *KRT14*, *PLEC*, *TGM5*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *COL7A1* e *FERMT1*) e foi descrito em maiores detalhes em estudo prévio (Mariath et al., 2019).

### *Resultados e Discussão*

O resultado genético foi essencial para o correto diagnóstico do subtipo de EB associado em 32 dos 76 pacientes analisados (42,1%). A tabela 1 apresenta, para os 32 pacientes, o subtipo clínico sugerido inicialmente e o diagnóstico definitivo após o resultado genético. Salienta-se que uma vez que as formas EB distrófica recessiva localizada (EBDR-loc) e EB distrófica dominante localizada (EBDD-loc) são clinicamente indistinguíveis, para esses pacientes o resultado genético é sempre indispensável para determinação do padrão de herança.

Um achado marcante na análise realizada foi a alta frequência de pacientes com o diagnóstico de EBDR-loc, um subtipo considerado raro, cuja apresentação clínica é bastante atenuada em relação às demais formas clássicas de EBDR (Figura 1). Um total de 15 indivíduos, representando 27,3% do total de casos de EB distrófica (15/55), foram diagnosticados com EBDR-loc. Considerando os pacientes cujo resultado genético foi determinante para o diagnóstico, esse subtipo representou 46,9% (15/32) dos casos. Além de se sobrepôr à forma dominante, a EBDR-loc pode ser facilmente confundida com as formas brandas dos demais subtipos de EB, pelo envolvimento de sinais clínicos bastante leves. Ao analisar as variantes patogênicas identificadas nos pacientes com esse subtipo de EB, outra constatação interessante foi observada: 12 dos 15 pacientes (80%) apresentavam pelo menos uma variante de sítio de *splice* (Tabela 1 e Tabela 2).

O *splicing* ou processamento de RNA é uma etapa necessária para a síntese de uma proteína funcional. Simplificadamente, consiste no reconhecimento das junções éxon-íntron

pelo complexo Spliceossomo, que atua excisando os íntrons para formação do mRNA maduro (Singh et al., 2018). Via de regra, variantes genéticas que afetam as junções éxon-íntron, ou seja, as variantes de sítio de *splice*, são consideradas patogênicas por comprometerem o *splicing* do pré-mRNA e, conseqüentemente, afetarem de maneira importante a formação da proteína (Ohno et al., 2017). Entretanto, diversos estudos vêm demonstrando que variantes de sítio de *splice* podem estar associadas a fenótipos menos graves, através de um mecanismo conhecido como *in-frame exon-skipping* (Caminsky et al., 2014; Toyonaga et al., 2015). De forma sintética, esse processo envolve a exclusão de um éxon (ou “salto” sobre um éxon, em livre tradução de *exon-skipping*) sem causar alteração no restante da sequência que está sendo formada. Conseqüentemente, a proteína formada terá a ausência dos aminoácidos codificados pelo éxon excisado (ou “*skipped*”), mas o restante da proteína será normal, o que permitirá a preservação, ao menos parcial, da sua função (Figura 2). Genes que possuem éxons curtos e em grande número apresentam mais frequentemente o mecanismo de *in-frame exon-skipping* (Hamada et al., 2008; Kiritsi et al., 2011; Colombo et al., 2014; Kowalewski et al., 2016).

O fenômeno de *in-frame exon-skipping* foi descrito previamente em alguns pacientes com formas leves de EB, como EBDR-loc, EBD-pré-tibial e EB juncional localizada. Os estudos acerca do efeito das variantes de *splice* associadas a tais casos demonstraram que uma parcela de transcritos normais continuava a ser produzida, o que permitia a função normal ou pouco diminuída da proteína e explicava o fenótipo atenuado observado (Gardella et al., 1996; Terracina et al., 1998; Kiritsi et al., 2011; Toyonaga et al., 2015; Kowalewski et al., 2016; Masunaga, Kubo and Ishiko, 2018). Algumas das variantes identificadas no presente estudo já foram associadas previamente ao mecanismo de *in-frame exon-skipping* em pacientes com fenótipos leves de EB (Tabela 2) (Gardella et al., 1996; Terracina et al., 1998; Schwieger-Briel et al., 2015). Ainda que esse mecanismo já tenha sido descrito em EB, trata-se de um fenômeno até então considerado raro. Os relatos anteriores usualmente envolviam casos isolados da doença, que se destacaram justamente pela atipicidade.

Na análise realizada, não apenas o número de pacientes com EBDR-loc surpreendeu, mas principalmente o fato de que 80% desses casos estão associados a variantes em sítios de *splice*. De acordo com relatos prévios da literatura, sugere-se que o fenômeno de *in-frame exon-skipping* possa estar modulando a patogenicidade das variantes identificadas nos casos de EBDR-loc aqui estudados, o que explicaria o fenótipo leve dos pacientes. Propõe-se,

portanto, que esse mecanismo pode ser mais recorrente em EB do que antes previsto, ao menos na população brasileira. Estudos mostraram que 107 dos 118 éxons do gene *COL7A1* estão *in-frame* e por isso poderiam, em teoria, ser retirados sem causar alterações na fase de leitura, o que fortalece a hipótese do mecanismo de *in-frame exon-skipping* ser mais frequente nesse gene (Bremer *et al.*, 2016). De qualquer forma, estudos adicionais são essenciais para estabelecer o efeito dessas variantes e verificar se elas são mais frequentes em algumas populações.

Ademais, destaca-se que as variantes de *splice* foram recorrentes também em pacientes com outros subtipos de EB menos graves, além da EBDR-loc. Do total de 32 casos cujo resultado genético foi necessário para o diagnóstico, 22 deles apresentavam ao menos uma variante de *splice* (12 EBDR-loc e 10 de outros subtipos de EB) (Tabela 1). Assim, a hipótese proposta de possível mecanismo de *in-frame exon-skipping* modulando fenótipos mais brandos de EB poderia ser expandida para os demais subtipos da doença. Entretanto, análises adicionais acerca dos efeitos dessas variantes são necessárias para comprovar as hipóteses propostas e melhor entender o *background* genético envolvido na EB.

### *Conclusões e Perspectivas*

O presente estudo teve como objetivo primário verificar a concordância entre a hipótese clínica e o diagnóstico genético. De fato, demonstrou-se que a avaliação clínica, mesmo quando realizada por especialistas, não resolve todos os casos de EB. Entretanto, o achado secundário que mais se destacou foi a elevada frequência de pacientes com formas leves de EB carregando variantes de sítios de *splice*, o que levantou a hipótese de modulação pelo mecanismo de *in-frame exon-skipping*.

Para comprovar as hipóteses aqui levantadas, análises acerca do efeito das variantes de *splice* são necessárias. Entre as diferentes abordagens que podem ser utilizadas, destaca-se a técnica de *minigene*, que permite avaliar o efeito de variantes intrônicas sem a necessidade de analisar o mRNA do paciente, assim dispensando a necessidade de biópsia de pele. Simplificadamente, o método se baseia na amplificação, a partir do DNA do paciente, do fragmento contendo o éxon adjacente à variante e as regiões intrônicas adjacentes. Após clonagem do fragmento em vetor de expressão e transfecção em cultura de células, o RNA é extraído e RT-PCR é realizado para amplificação dos transcritos, que são

visualizados em gel de agarose e diretamente sequenciados (Boaretto *et al.*, 2010; Gaildrat *et al.*, 2010; Giorgi *et al.*, 2015). O método permite verificar o efeito da variante para o *splicing* e já foi realizado em estudos sobre EB (Covaciu *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016).

O fenômeno de *in-frame exon-skipping*, por resultar em fenótipos atenuados de EB, tem sido proposto como abordagem terapêutica para casos graves de EB. Análises *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado grande potencial para essa abordagem (Bornert *et al.*, 2016; Bremer *et al.*, 2016; Bremer *et al.*, 2019). Dessa forma, a comprovação do efeito das variantes de *splice* será importante não apenas para melhor entender os mecanismos envolvidos na patogênese da EB e como eles interferem na gravidade fenotípica, mas também para melhor compreender o mecanismo de *exon-skipping* e suas potenciais aplicações terapêuticas.

## Referências

- Boaretto F, Vettori A, Casarin A, Vazza G, Muglia M, Rossetto MG, Cavallaro T, Rizzuto N, Carelli V, Salviati L et al. (2010) Severe CMT type 2 with fatal encephalopathy associated with a novel MFN2 splicing mutation. *Neurology* 74(23):1919-21.
- Bornert O, Kuhl T, Bremer J, van den Akker PC, Pasmooij AM, Nystrom A (2016) Analysis of the functional consequences of targeted exon deletion in *COL7A1* reveals prospects for dystrophic epidermolysis bullosa therapy. *Mol Ther* 24(7):1302-11.
- Bremer J, Bornert O, Nystrom A, Gostynski A, Jonkman MF, Aartsma-Rus A, van den Akker PC, Pasmooij AM (2016) Antisense Oligonucleotide-mediated Exon Skipping as a Systemic Therapeutic Approach for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther Nucleic Acids* 5(10):e379.
- Bremer J, van der Heijden EH, Eichhorn DS, Meijer R, Lemmink HH, Scheffer H, Sinke RJ, Jonkman MF, Pasmooij AMG, Van den Akker PC (2019) Natural Exon Skipping Sets the Stage for Exon Skipping as Therapy for Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther Nucleic Acids* 18:465-475.
- Caminsky N, Mucaki EJ, Rogan PK (2014) Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis. *F1000Res* 3:282.
- Colombo EA, Fontana L, Roversi G, Negri G, Castiglia D, Paradisi M, Zambruno G, Larizza L (2014) Novel physiological RECQL4 alternative transcript disclosed by molecular characterisation of Rothmund-Thomson Syndrome sibs with mild phenotype. *Eur J Hum Genet* 22(11):1298-304.
- Covaciu C, Grosso F, Pisaneschi E, Zambruno G, Gregersen PA, Sommerlund M, Hertz JM, Castiglia D (2011) A founder synonymous *COL7A1* mutation in three Danish families with dominant dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa identifies exonic regulatory sequences required for exon 87 splicing. *Br J Dermatol* 165(3):678-82.
- Escamez MJ, Garcia M, Cuadrado-Corrales N, Llamas SG, Charlesworth A, De Luca N, Illera N, Sanchez-Jimeno C, Holguin A, Duarte B et al. (2010) The first *COL7A1* mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol* 163(1):155-61.

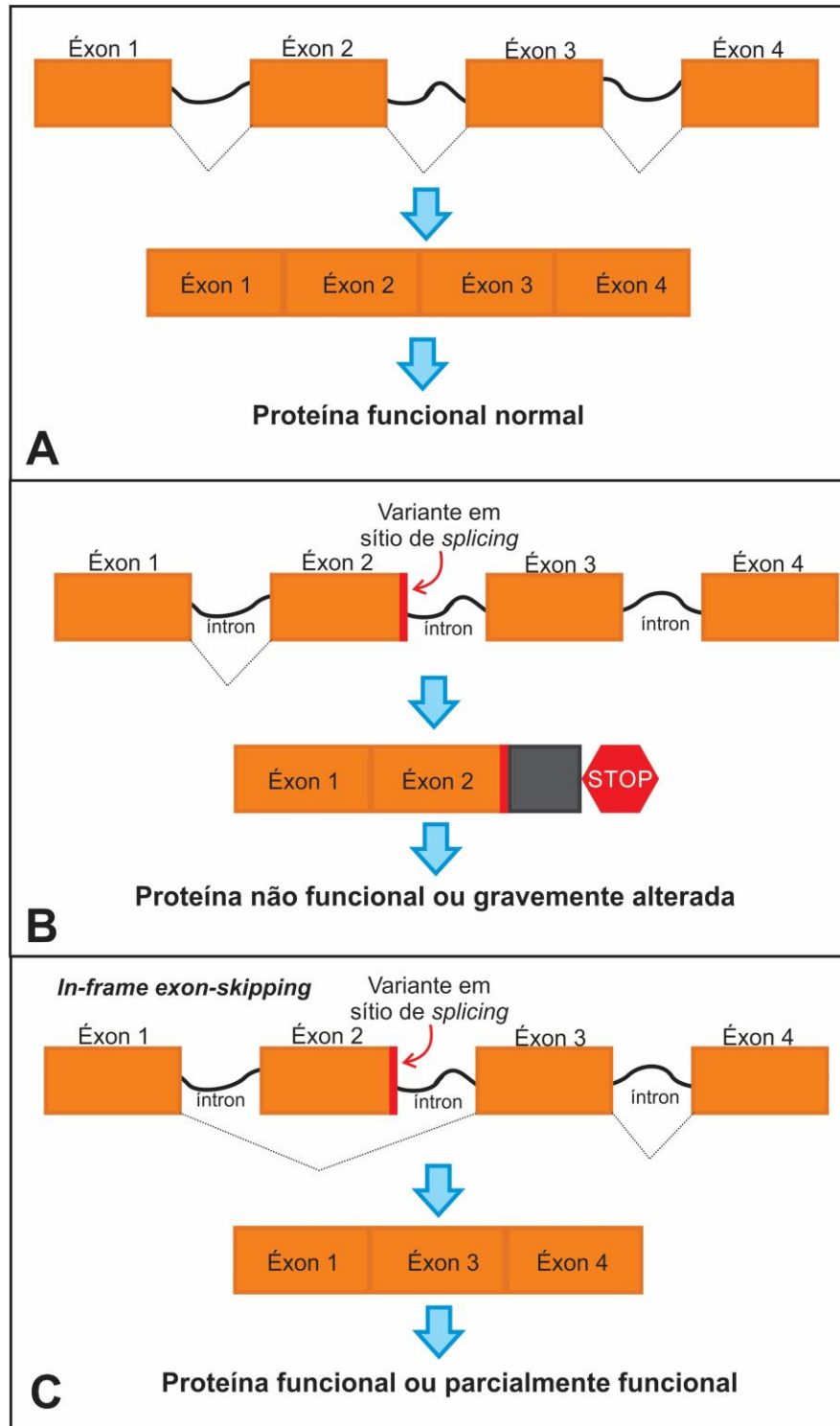
- Gaildrat P, Killian A, Martins A, Tournier I, Frebourg T, Tosi M (2010) Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods Mol Biol* 653:249-57.
- Gardella R, Belletti L, Zoppi N, Marini D, Barlati S, Colombi M (1996) Identification of two splicing mutations in the collagen type VII gene (*COL7A1*) of a patient affected by the localisata variant of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* 59(2):292-300.
- Giorgi G, Casarin A, Trevisson E, Dona M, Cassina M, Graziano C, Picci L, Clementi M, Salviati L (2015) Validation of CFTR intronic variants identified during cystic fibrosis population screening by a minigene splicing assay. *Clin Chem Lab Med* 53(11):1719-23.
- Hamada T, Fukuda S, Sakaguchi S, Yasumoto S, Kim SC, Hashimoto T (2008) Molecular and clinical characterization in Japanese and Korean patients with Hailey-Hailey disease: six new mutations in the ATP2C1 gene. *J Dermatol Sci* 51(1):31-6.
- Kiritsi D, Kern JS, Schumann H, Kohlhase J, Has C, Bruckner-Tuderman L (2011) Molecular mechanisms of phenotypic variability in junctional epidermolysis bullosa. *J Med Genet* 48(7):450-7.
- Kowalewski C, Bremer J, Gostynski A, Wertheim-Tysarowska K, Wozniak K, Bal J, Jonkman MF, Pasmooij AM (2016) Amelioration of junctional epidermolysis bullosa due to exon skipping. *Br J Dermatol* 174(6):1375-1379.
- Lee M, Xu G, Wang K, Wang H, Zhang J, Tang Z, Lin Z, Yang Y (2016) Recessive dystrophic epidermolysis bullosa caused by a de novo interstitial deletion spanning *COL7A1* and a hemizygous splicing mutation in trans. *Clin Exp Dermatol* 41(4):372-8.
- Mariath LM, Santin JT, Frantz JA, Doriqui MJR, Kiszewski AE, Schuler-Faccini L (2019) An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants. *Clin Genet* 96(3):189-198.
- Masunaga T, Kubo A, Ishiko A (2018) Splice site mutation in *COL7A1* resulting in aberrant in-frame transcripts identified in a case of recessive dystrophic epidermolysis bullosa, pretibial. *J Dermatol* 45(6):742-745.
- Ohno K, Takeda JI, Masuda A (2018) Rules and tools to predict the splicing effects of exonic and intronic mutations. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 9(1).
- Schwieger-Briel A, Weibel L, Chmel N, Leppert J, Kernland-Lang K, Gruninger G, Has C (2015) A *COL7A1* variant leading to in-frame skipping of exon 15 attenuates disease severity in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* 173(5):1308-11.
- Singh NN, Luo D, Singh RN (2018) Pre-mRNA Splicing Modulation by Antisense Oligonucleotides. *Methods Mol Biol* 1828:415-437.
- Terracina M, Posteraro P, Schubert M, Sonogo G, Atzori F, Zambruno G, Bruckner-Tuderman L, Castiglia D (1998) Compound heterozygosity for a recessive glycine substitution and a splice site mutation in the *COL7A1* gene causes an unusually mild form of localized recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 111(5):744-50.
- Toyonaga E, Nishie W, Komine M, Murata S, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Ohtsuki M, Shimizu H (2015) Skipped exon in *COL7A1* determines the clinical phenotypes of dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* 172(4):1141-4.
- van den Akker PC, van Essen AJ, Kraak MM, Meijer R, Nijenhuis M, Meijer G, Hofstra RM, Pas HH, Scheffer H, Jonkman MF (2009) Long-term follow-up of patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa in the Netherlands: expansion of the mutation database and unusual phenotype-genotype correlations. *J Dermatol Sci* 56(1):9-18.
- Varki R, Sadowski S, Uitto J, Pfenninger E (2007) Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J Med Genet* 44(3):181-92.

*Figuras e Tabelas*



**Figura 1.** Pacientes com o subtipo epidermólise bolhosa distrófica recessiva localizada (EBDR-loc) associado a variantes de sítio de *splice*. (A-B) Paciente 18; (C-D) Paciente 09. As variantes associadas estão detalhadas na Tabela 1.





**Figura 2. Possíveis consequências das variantes em sítio de *splicing*.** (A) Em situações normais, os íntrons são excisados durante o processo de transcrição e a proteína formada é funcional. (B) A maior parte das variantes de sítio de *splice* impedem o correto reconhecimento dos íntrons e, assim, resultam na quebra da fase de leitura e na consequente formação de códon de parada prematura. A proteína formada é não funcional ou é gravemente alterada. (C) Variantes de sítio de *splice* associadas a *in-frame exon-skipping* resultam na exclusão de um éxon inteiro (ou inclusão de um íntron), mas sem causar alteração na fase de leitura. A proteína formada, ainda que alterada, tem função próxima à normalidade.

**Tabela 1. Pacientes cujo resultado genético se mostrou indispensável para o diagnóstico do subtipo de epidermólise bolhosa.**

ID	Subtipo Clínico <sup>a</sup>	Subtipo Clínico+Genético <sup>b</sup>	Variante 1	Variante 2	Variante 3 <sup>c</sup>	História Familiar	Consanguinidade
01	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDD, loc	<i>COL7A1</i> , p.Gly1770Arg	-		+	-
02	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDD, loc	<i>COL7A1</i> , p.Gly2015Glu	-		+	-
03	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDD, loc	<i>COL7A1</i> , p.Gly2028Arg	-		+	Desconhecido
04	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDD, loc	<i>COL7A1</i> , p.Gly2028Arg	-		+	Desconhecido
05	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDD, loc	<b><i>COL7A1</i>, c.5097+1G&gt;A</b>	-		+	-
06	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDR inversa	<i>COL7A1</i> , p.Gly2653Arg	<i>COL7A1</i> , c.325_326insCG	<b>(<i>COL7A1</i>, p.Gly636Val)</b>	-	Desconhecido
07	EBD, pré-tibial <sup>e</sup>	EBDR, pré-tibial	<i>COL7A1</i> , p.Gly2653Arg	<i>COL7A1</i> , c.325_326insCG	<b>(<i>COL7A1</i>, p.Gly636Val)</b>	-	Desconhecido
08	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDR, loc	<b><i>COL7A1</i>, c.7380+2T&gt;C</b>	<b><i>COL7A1</i>, c.7380+2T&gt;C</b>		+	-
09	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDR, loc	<b><i>COL7A1</i>, c.7380+2T&gt;C</b>	<b><i>COL7A1</i>, c.7380+2T&gt;C</b>		-	+
10	EBDD, gen	EBDR, loc	<b><i>COL7A1</i>, c.7380+2T&gt;C</b>	<b><i>COL7A1</i>, c.7380+2T&gt;C</b>		-	Desconhecido
11	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , p.Arg185Ter	<i>COL7A1</i> , p.Arg2622Trp	<b>(<i>COL7A1</i>, p.Pro1940Leu)</b>	-	-
12	EBS, loc	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , p.Arg1683Ter	<i>COL7A1</i> , p.Arg2622Trp	<b>(<i>COL7A1</i>, p.Pro1940Leu)</b>	-	-
13	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , p.Gly1761Asp	<b><i>COL7A1</i>, c.5820G&gt;A, p.(=)</b>		+	Desconhecido
14	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , p.Arg1683Ter	<b><i>COL7A1</i>, c.5124+1G&gt;A</b>		-	Desconhecido
15	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , c.887del	<b><i>COL7A1</i>, c.7344G&gt;A, p.(=)</b>		-	-
16	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDR, loc	<b><i>COL7A1</i>, p.Gly2313Arg</b>	<i>COL7A1</i> , p.Gly923Arg		-	Desconhecido
17	EBS, gen	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , p.Arg1683Ter	<b>(<i>COL7A1</i>, p.Pro88Leu)<sup>f</sup></b>		+	+
18	EBS, loc	EBDR, loc	<b><i>COL7A1</i>, c.8109+1G&gt;T</b>	<b><i>COL7A1</i>, c.4011G&gt;A, p.(=)</b>		-	-
19	EBS, gen	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , p.Arg2008Cys	<b><i>COL7A1</i>, c.4011G&gt;A, p.(=)</b>		-	Desconhecido
20	EBD, loc <sup>d</sup>	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , c.5576_5577del	<i>COL7A1</i> , c.5132_5133insTCACC		+	-
21	EBJ, loc	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , p.Gly2653Arg	<i>COL7A1</i> , p.Arg1340Ter		-	-
22	EBDD, gen	EBDR, loc	<i>COL7A1</i> , p.Gly2233Asp	<i>COL7A1</i> , p.Arg2474Cys		-	-
23	EBDD, gen	EBDR, gen intermed	<i>COL7A1</i> , c.189del	<b><i>COL7A1</i>, c.7380+2T&gt;C</b>		-	Desconhecido
24	EBDD, gen	EBDR, gen intermed	<b><i>COL7A1</i>, c.7380+2T&gt;C</b>	<i>COL7A1</i> , p.Gly2416Ser		-	Desconhecido
25	EBDD, gen	EBDR, gen intermed	<i>COL7A1</i> , p.Gly2605Val	<b><i>COL7A1</i>, c.4011G&gt;A, p.(=)</b>		-	-
26	EBDD, gen	EBDR, gen intermed	<b><i>COL7A1</i>, c.8109+1G&gt;T</b>	<i>COL7A1</i> , p.Gly2653Arg		+	-
27	EBDD, gen	EBDR, gen intermed	<i>COL7A1</i> , c.325_326insCG	<i>COL7A1</i> , c.325_326insCG	<b>(<i>COL7A1</i>, p.Gly636Val)</b>	-	-
28	EBDD, gen	EBDR, gen intermed	<i>COL7A1</i> , p.Arg1683Ter	<i>COL7A1</i> , p.Arg226Ter		-	-
29	EBDD, gen	EBDR, gen grave	<i>COL7A1</i> , c.1758del	<i>COL7A1</i> , c.1758del		+	+
30	EBD, loc <sup>d</sup>	EBS, recessiva loc	<i>PLEC</i> , c.6697_6698insG	<i>PLEC</i> , c.6697_6698insG		+	-
31	EBD, loc <sup>d</sup>	EBJ, gen intermed	<b><i>LAMC2</i>, c.1066+1delG</b>	<b><i>LAMC2</i>, c.1066+1delG</b>		+	+
32	EBDD, gen	EBJ, gen intermed	<i>COL17A1</i> , c.3171_3173del	<b><i>COL17A1</i>, c.2002+2T&gt;G</b>		-	-

Variantes que afetam o *splicing* estão destacadas em negrito. EB: epidermólise bolhosa; EBDD: EB distrófica dominante; EBDR: EB distrófica recessiva; EBS: EB simples; EBJ: EB juncional; loc: localizada; gen: generalizada; intermed: intermediária. Nas colunas 'História Familiar e 'Consanguinidade', '+' é positivo e '-' é negativo. <sup>a</sup>Sugerido por avaliação clínica. <sup>b</sup>Diagnóstico após

a análise genética. <sup>c</sup>Alguns pacientes apresentavam uma 3ª variante de significado incerto. <sup>d,e</sup>As formas dominante e recessiva de EBD-loc e EBD-pré-tibial são fenotipicamente iguais, o que impossibilitou a sugestão do subtipo. <sup>f</sup>A 2ª variante patogênica do paciente ID 24 não foi detectada, mas uma variante de significado incerto (p.Pro88Leu) foi identificada.

**Tabela 2. Variantes de COL7A1 que potencialmente influenciam o *splicing* identificadas em pacientes com epidermólise bolhosa distrófica recessiva localizada (EBDR-loc) no presente estudo.**

<b>Variante</b>	<b>Localização</b>	<b>Predição de efeito<sup>a</sup></b>	<b>Referência<sup>b</sup></b>
<b>COL7A1, c.4011G&gt;A, p.(=)</b>	Variante no último nucleotídeo do éxon 33.	Alteração de sítio doador de <i>splice</i> WT, muito provavelmente afetando <i>splicing</i> .	van den Akker et al., 2009
<b>COL7A1, c.5097+1G&gt;A</b>	Variante em junção éxon-íntron (íntron 55).	Alteração de sítio doador de <i>splice</i> WT, muito provavelmente afetando <i>splicing</i> .	Mariath et al., 2019
<b>COL7A1, c.5820G&gt;A, p.(=)</b>	Variante no último nucleotídeo do éxon 70.	Alteração de sítio doador de <i>splice</i> WT, muito provavelmente afetando <i>splicing</i> .	Terracina et al., 1998
<b>COL7A1, c.6937G&gt;A, p.Gly2313Arg</b>	Variante no primeiro nucleotídeo do éxon 89.	Ativação de um sítio crítico acceptor exônico, Potencial alteração de <i>splicing</i> .  Criação de sítio silenciador de <i>splicing</i> exônico (ESS, <i>exonic splicing silencer</i> ). Potencial alteração de <i>splicing</i> .  Alteração de sítio reforçador de <i>splicing</i> exônico (ESE, <i>exonic splicing enhancer</i> ). Potencial alteração de <i>splicing</i> .	Mariath et al., 2019
<b>COL7A1, c.7344G&gt;A, p.(=)</b>	Variante no último nucleotídeo do éxon 95.	Alteração de sítio doador de <i>splice</i> WT, muito provavelmente afetando <i>splicing</i> .	Gardella et al., 1996
<b>COL7A1, c.7380+2T&gt;C</b>	Variante em junção éxon-íntron (íntron 96).	Alteração de sítio doador de <i>splice</i> WT, muito provavelmente afetando <i>splicing</i> .	Escamez et al., 2010
<b>COL7A1, c.8109+1G&gt;T</b>	Variante em junção éxon-íntron (íntron 109).	Alteração de sítio doador de <i>splice</i> WT, muito provavelmente afetando <i>splicing</i> .	Mariath et al., 2019
<b>(COL7A1, c.263C&gt;T, p.Pro88Leu)</b>	Variante próxima ao final do éxon 2 (quatro nucleotídeos para o final).	Criação de sítio silenciador de <i>splicing</i> exônico (ESS, <i>exonic splicing silencer</i> ). Potencial alteração de <i>splicing</i> .	This study
<b>(COL7A1, c.1907G&gt;T, p.Gly636Val)</b>	Variante no primeiro nucleotídeo do éxon 15.	Criação de sítio silenciador de <i>splicing</i> exônico (ESS, <i>exonic splicing silencer</i> ). Potencial alteração de <i>splicing</i> .	Schwieger-Briel et al., 2015
<b>(COL7A1, c.5819C&gt;T, p.Pro1940Leu)</b>	Variante no penúltimo nucleotídeo do éxon 70.	Criação de sítio silenciador de <i>splicing</i> exônico (ESS, <i>exonic splicing silencer</i> ). Potencial alteração de <i>splicing</i> .  Alteração de sítio reforçador de <i>splicing</i> exônico (ESE, <i>exonic splicing enhancer</i> ). Potencial alteração de <i>splicing</i> .	Varki et al., 2007

Entre parênteses estão as variantes de significado incerto; as demais foram classificadas como patogênicas. <sup>a</sup> Predição de efeito para o *splicing* informada pela ferramenta Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>). <sup>b</sup> Estudos que descreveram a variante pela primeira vez.

## **CAPÍTULO VIII**

---

### **ARTIGO 5**

**Gene panel for diagnosis of epidermolysis bullosa: proposal of a feasible and efficient approach**

Artigo aceito para publicação na revista Anais Brasileiros de Dermatologia

**Title: Gene panel for diagnosis of epidermolysis bullosa: proposal of a feasible and efficient approach**

Luiza Monteavaro Mariath<sup>1</sup>, Ana Elisa Kiszewski<sup>2,3</sup>, Juliana Tosetto Santin<sup>4</sup>, Jeanine Aparecida Frantz<sup>5,6</sup>, Maria Juliana Rodovalho Doriqui<sup>7</sup>, Marina Siebert<sup>8</sup>, Ursula Matte<sup>1,8</sup>, Lavínia Schuler-Faccini<sup>1,9\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Section of Dermatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Section of Pediatric Dermatology, Hospital da Criança Santo Antônio, Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup> Faculty of Medicine, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brazil

<sup>6</sup> DEBRA Brasil, Blumenau, SC, Brazil

<sup>7</sup> Section of Medical Genetics, Hospital Infantil Dr. Juvêncio Mattos, São Luís, MA, Brazil

<sup>8</sup> Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>9</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INaGeMP), Porto Alegre, RS, Brazil

**Corresponding author:**

Lavínia Schuler-Faccini

Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Email: lavinia.faccini@ufrgs.br

**Conflicts of interest:** The authors declare no conflicts of interest.

**Funding:** This study was supported by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INaGeMP/CNPq/FAPERGS), grant number 465549/2014-4, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **Abstract**

**Background:** Epidermolysis bullosa (EB) is characterized by cutaneous fragility and blistering of skin. Historically, EB diagnosis is achieved by immunofluorescence mapping (IFM) or transmission electron microscopy (TEM), both involving biopsy procedures. Next-generation sequencing (NGS) is a useful tool for identification of genetic variants.

Next-generation sequencing (NGS), is an important tool for EB diagnosis. In Brazil, access to EB diagnostic methods is limited, and consequently, most patients do not have an accurate diagnosis. The diagnosis allows the indication of prognosis and the genetic counselling of the patient.

**Objectives:** To evaluate the cost-effectiveness of an NGS-based gene panel compared to IFM and TEM techniques by analyzing its benefits, limitations and the economic aspects involved.

**Methods:** The gene panel included the 11 main genes associated with EB. We compared the gene panel to the IFM and TEM methods, assessing the average cost, advantages and limitations, through a price survey and literature review.

**Results:** Both IFM and TEM methods require skin biopsy, are dependent on the investigator's expertise, and are subject to frequent inconclusive results. The EB gene panel is effective for the conclusive diagnosis, presents high efficiency and accuracy, is economically feasible and excludes the need for biopsy. The gene panel allows for prognosis, prenatal genetic diagnosis and genetic counseling.

**Study limitations:** We were unable to find TEM laboratories for EB diagnosis in Brazil; thus, the estimated cost of TEM was based on prices in the USA.

**Conclusion:** Our study supports the gene panel as the first-choice method for EB diagnosis.

**Keywords:** epidermolysis bullosa; genetic counselling; diagnosis; genetic testing.

## Introduction

Epidermolysis bullosa (EB) comprises a clinically and genetically heterogeneous group of genetic disorders characterized by the fragility of the skin, with the formation of blisters, erosions and wounds following minimal trauma.<sup>1</sup> EB is classified into four main types according to the level of skin within which blisters develop: EB simplex (EBS; intraepidermal), junctional EB (JEB; within the lamina lucida of the basement membrane), dystrophic EB (DEB; below the basement membrane) and Kindler syndrome (mixed pattern of blistering).<sup>1,2</sup> The subclassification takes into account the clinical features involved, the distribution of blisters (generalized or localized) and the severity of cutaneous and extracutaneous signs.<sup>2</sup> Pathogenic variants in at least 16 genes encoding proteins with structural roles, account for the genetic and allelic heterogeneity of EB.<sup>2,3</sup>

The incidence and prevalence of EB were estimated in the USA as 19.57 and 11.07 per 1 million live births, respectively.<sup>4</sup> There are no epidemiological studies concerning EB in Brazil. The association DEBRA-Brasil, in an effort to register Brazilian EB patients, now has more than 900 records of cases in the country (unpublished data). It is estimated that the actual number of affected Brazilians is even higher, taking into account the underdiagnosis of the disease, especially in mild cases, the misdiagnosis and the early death in severe cases, and the difficulty in accessing the main health centers.

The diagnosis of EB around the world is mostly achieved by clinical exam followed by direct immunofluorescence (known as immunofluorescence mapping or immunomapping) and/or transmission electron microscopy, both of which use skin biopsy samples.<sup>5</sup> When available, genetic testing is also an important tool for diagnosis. The classification of the type of EB is important for the patient's prognosis and for genetic counseling of the family.

Immunofluorescence mapping (IFM) is based on the use of specific monoclonal antibodies that enable the identification of the most likely mutated protein and the level of skin cleavage in severe types of EB.<sup>5-7</sup> However, the information is dependent on the quality and number of antibodies<sup>3</sup>, and inconclusive results can occur for various reasons. First, artificial cleavage of the skin may occur during storage and processing, leading to erroneous results.<sup>7</sup> It is also possible that skin cleavage is absent, and consequently, the type of EB



cannot be determined in these cases.<sup>7</sup> Finally, the interpretation of the results is dependent on the investigators' experience, thus requiring a group of experts for a correct diagnosis.<sup>3,5</sup>

Transmission electron microscopy (TEM) also enables EB diagnosis through identification of the skin level at which cleavage occurs. A distinction is that this technique additionally permits the visualization and semiquantitative assessment of ultrastructural anomalies that are specific for subtypes of EB (keratin filaments; desmosomes; hemidesmosomes; anchoring filaments and fibrils).<sup>5</sup> However, this method incurs high costs and requires laborious processing and analysis and highly proficient TEM laboratories with appropriate expertise.<sup>5</sup> In addition, the results obtained by TEM may be uninformative due to the absence of skin cleavage, nonspecific alterations or subtle changes in the adhesion structures. Artifacts may also occur due to biopsy technique or processing.<sup>3</sup> Due to the scarcity of TEM laboratories, this method is rarely the first choice for EB diagnosis.

Until recently, genetic testing for diagnostics purposes included only Sanger sequencing of candidate genes, which are chosen after IFM and/or TEM, a laborious and expensive strategy.<sup>1</sup> Next-generation sequencing (NGS) technology has emerged as a useful tool for the identification of genetic variants, and several studies in EB have proven its high diagnostic sensitivity.<sup>8-12</sup>

In Brazil, access to EB diagnosis methods is available only to a small group of patients. The first reason is related to the technical difficulties involved, which requires experts for the analyses. Although this issue is common to all who perform these techniques, it is even more prevalent in a country such as Brazil due to the lack of analysts with experience. The second reason is related to the insufficiency of specialized healthcare centers in Brazil and the unavailability of exams through the Brazilian public health system. Consequently, the majority of patients from Brazil do not have an accurate and conclusive diagnosis of the associated EB type, either due to the technical difficulties that culminate in inconclusive results or the lack of access to these methods in Brazil.

In view of the difficulty of this diagnosis in Brazil, our group has proposed a gene panel specific for EB through NGS technology. In a previous study, we described the novel and recurrent variants identified in Brazilian patients through the gene panel.<sup>13</sup> The objective of the present study is to evaluate the cost-effectiveness of this panel in comparison to the

historically employed methods, discussing the main advantages and limitations of each method, as well as the economic aspects involved.

## **Methods**

### **Ethical aspects**

The present study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (project number 31608) and Plataforma Brasil (protocol number 2.481.885).

### **EB gene panel**

The NGS gene panel was designed to be specific for EB, to solve the vast majority of cases and to present a feasible cost for the Brazilian reality. Therefore, the 11 main genes associated with the four EB types were included in the panel (*KRT5*, *KRT14*, *PLEC*, *TGM5*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *COL7A1* and *FERMT1*). The panel, with a size of 62.72 kb and 574 amplicons, was designed using AmpliSeq Designer software (Thermo Fisher Scientific, USA). Ion Torrent technology (Thermo Fisher Scientific, USA) was used for sequencing. Information about the parameters of the runs, the data analysis and the classification of the identified variants has been described in a previous study.<sup>13</sup>

### **Assessment of methods for EB diagnosis**

To estimate the cost involved in the execution of IFM, TEM and gene panel sequencing, a price survey was conducted in Brazilian hospitals/laboratories that perform each method. For the TEM technique, prices were surveyed in laboratories from the USA due to the lack of Brazilian institutions performing this method for EB diagnosis. The estimated cost is the average of the quoted prices. As the cost of gene panel sequencing is dependent on the number of samples to be analyzed, for calculation purposes, the price estimate has taken into account a reference number of 20 samples. The characteristics of each method, as well as its inherent advantages and limitations, have been reviewed in specialized literature.

## **Results**

The positive and negative points of the techniques used for EB diagnosis are summarized in Table 1. As demonstrated in a previous study,<sup>13</sup> the efficiency of the designed NGS gene panel was 94.3% (the pathogenic variants were identified in 82 of the 87 index cases). Although IFM and TEM show diagnostic accuracy, only the gene panel allows a comprehensive and definitive result, including the identification of the causal genetic alteration. Moreover, as an important benefit, the gene panel does not require the invasive biopsy procedure (particularly harmful for these patients with sensitive skin), which is indispensable in the other two methods.

The cost of the gene panel for EB diagnostics was estimated at 800 BRL (eight hundred Brazilian Reais; 1 BRL=0.25 USD) per sample, taking into account a total of 20 analyzed samples. The average price of IFM assays in Brazil is 500 BRL (125 USD). After an extensive search in several Brazilian reference centers, we were unable to find TEM laboratories for EB diagnosis in the country. For estimation purposes, a price survey was carried out in TEM laboratories from the USA, which indicated an average price of 3,920 BRL (980 USD).

Figure 1 compiles the main characteristics, advantages and implications of the EB gene panel for the disease's diagnosis.

## **Discussion**

The present study reviewed the diagnostic methods for epidermolysis bullosa and its advantages and disadvantages and evaluated the potential use of the gene panel as the first-choice method for the diagnosis of this disease in Brazil.

### **Gene panel x IFM and TEM: effectiveness, immediate benefits and potential future**

Historically, IFM and TEM have been the most commonly employed techniques to diagnose EB, and both allow for the determination of the level of skin cleavage and the consequent indication of the associated EB type.<sup>5</sup> Although both methods present diagnostic accuracy in determining the major type of EB, they do not indicate the mode of genetic inheritance and require experience for analysis and are subject to frequent imprecise or inconclusive results (Table 1).<sup>3,14</sup> MET, particularly, is a very laborious technique and

requires notable technical knowledge, and is, therefore, rarely used. The identification of the associated pathogenic variant is the most definitive and accurate criterion for the diagnosis of EB. The Sanger sequencing of candidate genes is, therefore, performed in specialized centers, subsequent to IFM and/or TEM.<sup>5,14</sup> Although informative in most cases, the combination of IFM, TEM and Sanger sequencing fails in approximately 15% of cases, either due to doubtful clinical diagnosis or due to intrinsic technical limitations.<sup>8</sup> Moreover, this combined approach may be expensive and laborious because several EB genes present a large number of exons, such as *COL7A1* (118 exons) and *COL17A1* (56 exons).<sup>8</sup>

In contrast to Sanger sequencing, the NGS gene panel allows for the simultaneous sequencing of a number of genes with known associations with the disease,<sup>1</sup> thus not requiring the prior determination of candidate genes. Genetic analysis using the gene panel is rapid, highly precise and conclusive for the diagnosis of EB, reducing the need for previous exams, such as IFM and TEM (Table 1).

IFM and TEM require skin biopsy, which is frequently harvested from a fresh spontaneous blister. This is a procedure considered invasive, and in EB patients' reality, considering their fragile skin, it becomes even more aggressive. In addition, in several cases, the biopsy exam needs to be repeated due to inconclusive results. Since the NGS screening assays do not require skin biopsy and they may be performed from saliva samples and provide rapid and accurate diagnoses, some authors have suggested a rethink on the current methods for evaluating EB patients.<sup>15</sup> The identification of causal variants associated with EB allows for prognosis, prenatal and preimplantation genetic diagnosis and reliable genetic counseling.<sup>3</sup>

Although NGS is a powerful tool for genetic diagnosis, there are also some limitations that should be considered. The main challenge lies in the bioinformatics analyses required to determine the genetic variants and, most importantly, to indicate its causality.<sup>8</sup> In this sense, the interpretation of variants of uncertain significance is very difficult, causing dilemmas for clinicians and uncertainty on how to inform patients and to provide proper genetic counseling. In addition, large rearrangements and repetitive sequences are too complex to analyze by NGS and are often not properly detected. Therefore, it is important to note that, although highly effective, NGS technology is not able to diagnose all cases of genetic disease.

The gene panel proposed by our group showed high efficiency (94.3%) in the studied sample, similar to the results obtained by other researchers who used panels with a larger number of genes.<sup>10-12</sup> The selection of the 11 main genes associated with EB aimed to establish an economically feasible methodology, although other genes have been reported in the literature.<sup>2,3</sup> Although the developed gene panel fails to diagnose rare cases associated with these other genes (such as *DST*, *EXPH5*, *KLHL24*, *CD151*, *ITGA3* and *ITGA6*), the obtained efficiency demonstrated that even a smaller gene panel may be of notable relevance for EB diagnosis. . It should be noted that NGS technology does not properly detect large genetic rearrangements, which implies that even a panel containing all genes associated with EB does not guarantee an efficiency of 100%.

In addition to the immediate benefits, genetic analysis may be an essential tool for the development and application of therapies for EB. Although there is currently no treatment for EB, recent preclinical studies have suggested potential therapies for EB, and several of them are dependent on the associated pathogenic variant.<sup>16-20</sup> The advances in genetic diagnosis through NGS technology, in combination with the emergence of new molecular therapies, promise to significantly benefit patients living with EB.<sup>21</sup> Although not the current reality, there is a hope that in a not-so-distant future, patients with specific pathogenic variants will have the possibility of treatment.

#### **Cost-effectiveness of the gene panel**

Although the estimated cost for the gene panel per sample (800 BRL; 200 USD) is higher compared to IFM (500 BRL; 125 USD), it presents a considerably lower cost than TEM (3,920 BRL; 980 USD). It is important to note, however, that TEM's cost was based on prices practiced in USA laboratories, since, to our knowledge, there is no laboratory that commercially offers this method for EB diagnosis in Brazil. Although a few Brazilian universities possess electronic microscopes, the analysis for EB diagnosis is carried out in an academic context only in specific cases of scientific interest. Sanger sequencing presents an average cost of 35 BRL per analyzed gene fragment (usually an exon) per sample. Thus, the total cost of this methodology is dependent on the number of exons of the analyzed genes. Hypothetically, if a patient with dystrophic EB (associated with *COL7A1* gene) was analyzed by Sanger sequencing, an approximate value of 2,520 BRL would be invested only in this

methodology (taking into account 72 primer pairs encompassing the 118 exons, as described by Christiano et al.<sup>22</sup>).

Therefore, although the gene panel is not a low-cost method, it may achieve more informative and conclusive results than the obtained with IFM and TEM. In comparison to Sanger sequencing, the investment cost and the processing time are reduced, showing the cost-effectiveness of the gene panel for the diagnosis of EB. In addition, it is noteworthy that the cost of this methodology has been decreasing, which is likely to make the exam more accessible in the next few years.<sup>10</sup>

It should be noted, however, that the estimated cost for the EB diagnosis using the gene panel did not include the initial price of the panel (approximately 20,000 BRL) or the investment to validate it. Our proposal here is the genetic diagnosis in the public health context, aiming, in the long term, to include a large number of Brazilian patients. Thus, as more patients are analyzed, the initial cost invested in the panel, per patient, decreases until it becomes insignificant. In addition, we did not include the costs of expert analysts for results interpretation in the calculation. In our experience, conducted in an academic context, this question did not apply; however, it must be taken into account before establishing the method for public assistance.

### **An overview of Brazil: the clinical exam does not solve all EB cases**

The diagnosis of EB in Brazil is performed, in most cases, through the assessment of clinical signs. There are scarce specialized centers offering diagnostic methods for EB, which results in difficulty in correctly diagnosing and subclassifying patients and consequently in providing proper follow-up and genetic counseling.

Even when available, IFM is often associated with inconclusive results due to the lack of expert analysts, especially in poor and hard-to-reach Brazilian regions. Taking into account the injury caused by biopsy exams and that most patients will not have the appropriate conditions after this exam (including proper dressing and healthcare), some physicians have opted to not indicate IFM for EB subclassification. Consequently, the accurate diagnosis and EB type definition are dependent on a comprehensive clinical exam. However, even if performed by expert dermatologists in EB, the clinical exam is not enough to solve all cases, in view of the extremely phenotypic variability observed. Box 1 shows an example of a clinical case in which the genetic result did not match the previous clinical

hypothesis, surprising the dermatologists. This same reality is observed in other low- and middle-income countries.

In our experience in Brazil, we realized that the vast majority of cases initially did not have a precise diagnosis of the associated EB type before the genetic result, which is essential for proper genetic counseling. Additionally, some peculiarities of the country are important to note. Endogamy and consanguinity rates present higher prevalence in some Brazilian populations, especially in the Northeast region,<sup>23,24</sup> suggesting that most EB cases may include recessive inheritance. Indeed, in a previous study, we showed that 82.7% of patients with dystrophic EB subtypes were of recessive inheritance.<sup>13</sup> This is especially important for the diagnosis of DEB localized subtypes, since the dominant and recessive forms are clinically undistinguishable, impairing the correct counseling without the genetic test.

Taking into account the difficulty of correctly clinically diagnosing genodermatoses and, particularly, the complexity of classifying EB, the genetic results have proven essential for the correct determination of the associated EB type.

### **Gene panel as the first-choice method for the diagnosis of EB**

The analysis carried out in this study showed that the gene panel is an effective tool for the conclusive diagnosis of EB, presenting high efficiency, diagnostic accuracy and reduced analysis time (approximately 10 days), is economically feasible, and excludes the need for invasive exams (Figure 1). Some factors, however, are essential for the method's effectiveness. The processing of the gene panel results requires bioinformatics support, and the time for the analysis of variants depends on the researcher's experience. However, compared to IFM and TEM methods, the interpretation of the gene panel results is simpler, not requiring a team with in-depth expertise.<sup>3</sup>

In view of the greater diagnostic efficiency, the result's robustness, the similar cost to other available techniques and the potential of providing genetic counseling, prognosis and prenatal diagnosis, the present study supports the gene panel as the first method of choice for EB diagnosis in Brazil. Taking into account the continental dimensions of the Brazilian territory and the difficulty of introducing a meticulous technique such as the gene panel, the establishment of a reference center for the diagnosis of EB in the country would be highly

important. The performance of the analyses in one center eliminates the need for the creation of multiple expert teams and reduces the processing cost per sample.

The difficulty of EB diagnosis in Brazil may be attenuated with the approach proposed here. Financial resources and government support are needed to carry out the idea. It is essential that the authorities pay attention to this group of patients, who present a severe genetic disease that, although considered rare, represents a group of more than 900 Brazilian patients.

### **Conclusion**

The EB gene panel presents high diagnostic efficiency and eliminates the need for biopsy, contrasting to the mostly employed methods. The cost, per patient, of the presented methodology is comparable to that from the other techniques and tends to decrease in the next years. The identification of EB-associated variants allows for disease prognosis, permits the prenatal and preimplantation genetic diagnosis and has implications for genetic counseling. Finally, although still in preclinical stages, potential therapies for EB have shown promising results for some specific types of genetic variants. The results presented here support the gene panel combined with the clinical exam as the first method of choice for the diagnosis of EB in Brazil.

### **Acknowledgements**

Our special thanks to the patients and their families for participating in this study. In particular, we thank the Epidermolysis Bullosa associations from Brazil and its many regions: DEBRA-Brasil, APPEB-DF, ACPAPEB, APPAPEB, AAPEB-SP and AMAPEB. To the physicians who collaborated with the study, thank you very much. This study was supported by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INaGeMP/CNPq/FAPERGS), grant number 465549/2014-4, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## References

1. Has C & Fischer J. Inherited epidermolysis bullosa: New diagnostics and new clinical phenotypes. *Exp Dermatol.* 2018;1-7.
2. Has C, Bauer JW, Bodemer C, Bolling M, Bruckner-Tuderman L, Diem A *et al.* Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility. *Br J Dermatol.* 2020;[Epub ahead of print].
3. Has C, Liu L, Bolling M, Charlesworth AV, El Hachem M, Escámez MJ *et al.* Clinical Practice Guidelines for Epidermolysis Bullosa Laboratory Diagnosis. *Br J Dermatol.* 2019.
4. Fine JD. Epidemiology of Inherited Epidermolysis Bullosa Based on Incidence and Prevalence Estimates From the National Epidermolysis Bullosa Registry. *JAMA Dermatol.* 2016;152(11):1231-1238.
5. Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A *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;58(6):931-950.
6. Oliveira ZN, Périgo AM, Fukumori LM, Aoki V. Immunological mapping in hereditary epidermolysis bullosa. *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):856-61.
7. Has C, He Y. Research Techniques Made Simple: Immunofluorescence Antigen Mapping in Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol.* 2016;136(7):e65-e71.
8. Takeichi T, Liu L, Fong K, Ozoemena L, McMillan JR, Salam A *et al.* Whole-exome sequencing improves mutation detection in a diagnostic epidermolysis bullosa laboratory. *Br J Dermatol.* 2015;172(1):94-100.
9. Tenedini E, Artuso L, Bernardis I, Artusi V, Percesepe A, De Rosa L *et al.* Amplicon-based next-generation sequencing: an effective approach for the molecular diagnosis of epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol.* 2015;173(3):731-8.
10. Has C, Küsel J, Reimer A, Hoffmann J, Schauer F, Zimmer A *et al.* The position of targeted nextgeneration sequencing in epidermolysis bullosa diagnosis. *Acta Derm Venereol.* 2018;98(4):437-440.
11. Vahidnezhad H, Youssefian L, Saeidian AH, Touati A, Sotoudeh S, Abiri M *et al.* Multigene next generation sequencing panel identifies pathogenic variants in patients with unknown subtype of epidermolysis bullosa: subclassification with prognostic implications. *J Invest Dermatol.* 2017;137(12):2649-2652.
12. Lucky AW, Dagaonkar N, Lammers K, Husami A, Kissell D, Zhang K. A comprehensive nextgeneration sequencing assay for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Pediatr Dermatol.* 2018;35(2):188-197.
13. Mariath LM, Santin JT, Frantz JA, Doriqui MJR, Kiszewski AE, Schuler-Faccini L. An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants. *Clin Genet.* 2019;1-10.

14. Yiasemides E, Walton J, Marr P, Villanueva EV, Murrell DF. A comparative study between transmission electron microscopy and immunofluorescence mapping in the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Am J Dermatopathol*. 2006;28(5):387-94.
15. Saunderson RB, Vekic DA, Mallitt K, Mahon C, Robertson SJ, Wargon O. A retrospective cohort study evaluating the accuracy of clinical diagnosis compared with immunofluorescence and electron microscopy in children with inherited epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*. 2019;180(5):1258-1259.
16. Bornert O, Kühl T, Bremer J, van den Akker PC, Pasmooij AM, Nyström A. Analysis of the functional consequences of targeted exon deletion in COL7A1 reveals prospects for dystrophic epidermolysis bullosa therapy. *Mol Ther*. 2016;24(7):1302-11.
17. Chamorro C, Mencía A, Almarza D, Duarte B, Büning H, Sallach J *et al*. Gene Editing for the Efficient Correction of a Recurrent COL7A1 Mutation in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Keratinocytes. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5:e307.
18. Atanasova VS, Jiang Q, Prisco M, Gruber C, Pinon Hofbauer J, Chen M *et al*. Amlexanox enhances premature termination codon readthrough in COL7A1 and expression of full length type VII collagen: potential therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 2017;137:1842e9.
19. Woodley DT, Cogan J, Hou Y, Lyu C, Marinkovich MP, Keene D *et al*. Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Clin Invest*. 2017;127(8):3028-3038.
20. Izmiryan A, Ganier C, Bovolenta M, Schmitt A, Mavilio F, Hovnanian A. Ex Vivo COL7A1 Correction for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Using CRISPR/Cas9 and Homology-Directed Repair. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2018;12:554-67.
21. Salam A, Proudfoot LE, McGrath JA. Inherited blistering skin diseases: underlying molecular mechanisms and emerging therapies. *Ann Med*. 2014;46(2):49-61.
22. Christiano AM, Hoffman GG, Zhang X, Xu Y, Tamai Y, Greenspan DS *et al*. Strategy for identification of sequence variants in COL7A1 and a novel 2-bp deletion mutation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Mutat*. 1997;10(5):408-14.
23. Freire-Maia N. Genetic effects in Brazilian populations due to consanguineous marriages. *Am J Med Genet*. 1990; 35(1):115-117.
24. Cardoso GC, de Oliveira MZ, Paixão-Côrtes VR, *et al*. Clusters of genetic diseases in Brazil. *J Community Genet*. 2019; 10(1):121-128.
25. Toyonaga E, Nishie W, Komine M, Murata S, Shinkuma S, Natsuga K, *et al*. Skipped exon in COL7A1 determines the clinical phenotypes of dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*. 2015;172(4):1141-1144.
26. Schwieger-Briel A, Weibel L, Chmel N, Leppert J, Kernland-Lang K, Grüniger G, *et al*. A COL7A1 variant leading to in-frame skipping of exon 15 attenuates disease severity in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*. 2015;173(5):1308-1311.

## Figure Legends

### **Box 1. The clinical exam does not solve all EB cases.**

**Figure 1. The gene panel as the first-choice method for EB diagnosis: main characteristics.** The gene panel presents high efficiency and accuracy, a similar cost to the other available methods and eliminates the need for biopsy. The cost of NGS methodologies is decreasing, indicating that the gene panel is likely to be more accessible in the next few years. The detection of genetic alteration allows for disease prognosis and prenatal and preimplantation diagnosis, has implications for genetic counseling, and has importance for the development of future therapies for EB.

**Table**

**Table 1. Comparison of the main methods used for epidermolysis bullosa diagnosis**

	<b>Immunofluorescence mapping</b>	<b>Transmission electron microscopy</b>	<b>NGS EB gene panel</b>
<b>Advantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Main EB type and the most likely altered protein</li> <li>• Diagnostic accuracy</li> <li>• Rapid execution</li> <li>• Prognostic value</li> <li>• Number of laboratories</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analysis of structures specific for subtypes of EB</li> <li>• Diagnostic accuracy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identification of the genetic alteration</li> <li>• Determination of the EB type and inheritance pattern</li> <li>• No need of biopsy</li> <li>• High efficiency (94.3%)<sup>c</sup></li> <li>• Diagnostic accuracy<sup>d</sup></li> <li>• Informative and conclusive in most cases</li> <li>• Allows prenatal and preimplantation genetic diagnosis</li> <li>• Easy transport of samples</li> </ul>
<b>Disadvantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopsy</li> <li>• Dependent on the investigator's experience</li> <li>• It is not possible to accurately distinguish all EB subtypes</li> <li>• Inconclusive results are frequent</li> <li>• Possible technical artifacts</li> <li>• No information on the genetic alteration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopsy</li> <li>• High cost</li> <li>• Very few laboratories perform the technique</li> <li>• Expertise is required to the correct analysis</li> <li>• Possible technical artifacts</li> <li>• No information on the genetic alteration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High cost</li> <li>• Need for specialized laboratories</li> <li>• Expertise is required for interpretation and classification of variants</li> </ul>
<b>Cost per patient<sup>a</sup></b>	500 BRL (125 USD)	Not carried out in Brazil <sup>b</sup> (In USA: 980 USD)	800 BRL (200 USD)

<sup>a</sup> Costs are based on the estimated average of surveyed market prices.

<sup>b</sup> To the best of our knowledge, according to the survey performed in this study.

<sup>c</sup> Efficiency found in a study with the proposed gene panel.<sup>13</sup>

<sup>d</sup> It is important to note the difference between 'efficiency' and 'accuracy'. Efficiency refers to the proportion of solved cases (i.e., cases with the pathogenic mutation identified) in relation to the total analyzed patients. The term 'accuracy', in turn, refers to the precision (exactitude, correction) of results.

## Box and Figure

### Box 1. The clinical exam does not solve all EB cases.

#### Clinical Case

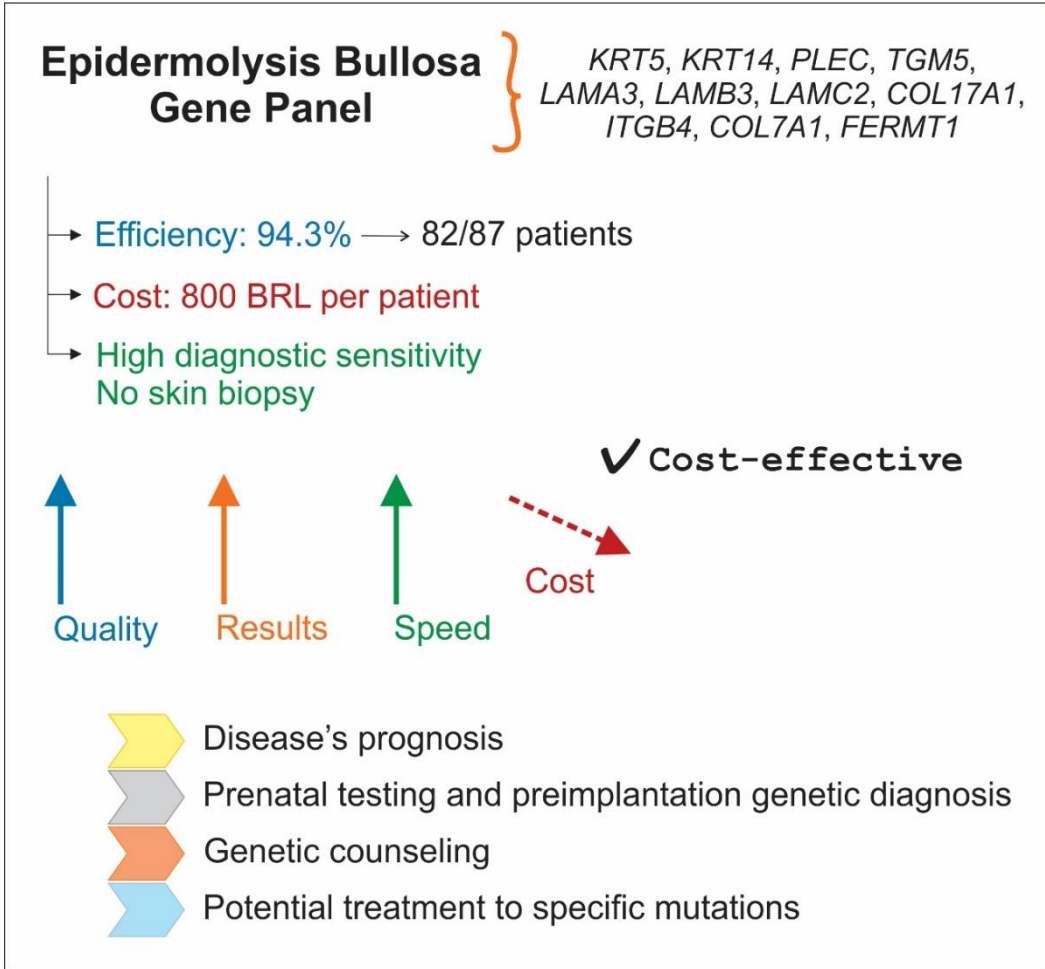
A 32-year-old female patient was late diagnosed with epidermolysis bullosa (at age of 15) due to her mild clinical phenotype. She presents only subtle signs, differing from the severe EB cases. The distribution of blisters is localized at the pretibial region, and only mild presence of blisters can be observed in the hands. Nail dystrophy is noticed only in the toenails.

The patient was subjected to a biopsy procedure, which presented an inconclusive result. The clinical exam performed by a few expert dermatologists suggested the probable type of EB: **EB simplex localized**.

The genetic analysis using the gene panel was in contrast to that expected by clinical results: two pathogenic variants in the *COL7A1* gene, revealing a case of **recessive dystrophic EB (RDEB)**.

The most common RDEB phenotype is quite severe, involving high inducibility and generalized distribution of blisters and pseudosyndactyly. Cases of mild RDEB are rare and difficult to determine by clinical evaluation. Several studies have shown that genetic alteration has an important influence on clinical presentation. Both pathogenic variants that were identified in the patient act by altering the splicing of *COL7A1*. Other mild cases of RDEB have already been associated with this same type of alteration.<sup>25,26</sup>

The case reported here is an example of the importance of genetic analysis for the correct EB type indication. Since the inheritance pattern varies among the different EB types (EBS: dominant, JEB: recessive, DEB: dominant or recessive), knowledge of its classification is essential to correct genetic counseling.



**Figure 1. The gene panel as the first-choice method for EB diagnosis: main characteristics.** The gene panel presents high efficiency and accuracy, a similar cost to the other available methods and eliminates the need for biopsy. The cost of NGS methodologies is decreasing, indicating that the gene panel is likely to be more accessible in the next few years. The detection of genetic alteration allows for disease prognosis and prenatal and preimplantation diagnosis, has implications for genetic counseling, and has importance for the development of future therapies for EB.

## **CAPÍTULO IX - DISCUSSÃO**

---

A epidermólise bolhosa (EB) é uma doença heterogênea, envolvendo múltiplos subtipos clínicos que se caracterizam por amplo espectro de gravidade, distintos padrões de herança e muitos genes causais (Fine, 2010b). Apesar dos obstáculos, avanços notáveis têm sido obtidos nas pesquisas em EB, possibilitando a compreensão de diversos componentes e mecanismos que asseguram a integridade da pele.

Variantes patogênicas em pelo menos 16 genes, que codificam proteínas essenciais para integridade e adesão das camadas da pele, já foram associadas aos distintos subtipos de EB (Has e Bruckner-Tuderman, 2014; Has *et al.*, 2019; Has *et al.*, 2020). Ainda assim, uma série de lacunas relacionadas aos mecanismos de patogenicidade da doença ainda precisam ser preenchidas, o que vem estimulando o desenvolvimento de diversos estudos e muitas descobertas ano a ano.

As análises genéticas possibilitaram importantes descobertas acerca do espectro de subtipos de EB e da maquinaria biológica encarregada pela adesão das camadas da pele. Em especial, a descoberta da associação da proteína *Kelch-like 24*, a primeira proteína não estrutural associada à EB simples, demonstrou que mecanismos antes desconhecidos estão envolvidos na doença (He *et al.*, 2016b; Lin *et al.*, 2016). Os estudos genéticos, que a cada ano utilizam tecnologias mais avançadas, possibilitarão compreender alguns dos mecanismos moleculares por detrás da EB. Em particular, a tecnologia de sequenciamento de nova geração (do inglês *next-generation sequencing*, NGS) tem se mostrado uma ferramenta útil para o rápido diagnóstico da doença, possibilitando a identificação de novos genes e variantes, além do diagnóstico de casos incomuns (Has e Bruckner-Tuderman, 2014). A expansão do uso dessa tecnologia promete revelar novos subtipos de EB, através da descoberta de novos genes e novas variantes genéticas. Para um futuro breve, espera-se entender melhor as bases genéticas que modulam os fenótipos de fragilidade da pele.

Não existem dados epidemiológicos acerca da incidência e prevalência da EB no Brasil, entretanto, a DEBRA-Brasil apresenta registro de mais de 900 pacientes brasileiros. É provável que esse número seja significativamente mais elevado, considerando o subdiagnóstico da doença e a deficiência de notificação de novos casos, especialmente em um país com dimensões continentais como o Brasil.

O presente estudo surgiu a partir da necessidade de caracterização genética dos pacientes com EB do Brasil, dada a escassez de estudos brasileiros, e do intuito de colaborar



para a compreensão das bases genéticas que moldam a EB. Dessa forma, desenvolvemos um painel de genes que apresentou alta eficiência de diagnóstico (94,3%). A partir do painel, caracterizamos uma amostra 87 casos índice do Brasil, apresentando variantes recorrentes na população estudada, bem como variantes raras até então não descritas. Ademais, investigamos as características clínicas dos pacientes e possíveis efeitos das variantes patogênicas identificadas, discutindo potenciais correlações genótipo-fenótipo. Esse foi o primeiro estudo genético de uma grande amostra brasileira e é importante para a compreensão dos aspectos moleculares envolvidos na EB e para a caracterização das peculiaridades da população estudada.

### **Eficiência do Painel de Genes para Epidermólise Bolhosa**

O objetivo principal do presente estudo foi realizar a análise genética de pacientes com EB. Para isso, desenvolvemos um painel de genes baseado em NGS, no qual incluímos os 11 principais genes associados à maior parte dos casos de EB: *KRT5*, *KRT14*, *PLEC*, *TGM5*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *COL7A1* e *FERMT1*. A escolha dos genes se deu por um dos propósitos do projeto, que foi desenvolver um método economicamente viável para o diagnóstico da doença. A inclusão de um número maior de genes acarretaria em maior custo do painel. Além disso, muitos dos genes da EB não incluídos na análise estão associados a casos bastante raros, o que significa que a sua inclusão no painel de genes acarretaria em pequeno acréscimo em relação ao número de pacientes diagnosticados. Por esses motivos, genes com conhecida associação a casos raros de EB não foram incluídos na análise. Cabe destacar que no momento do planejamento do painel, a associação do gene *KLHL24* à EBS ainda não havia sido estabelecida. Uma vez que estudos recentes têm demonstrado que variantes patogênicas nesse gene representariam cerca de 5% dos casos de EBS (Lee *et al.*, 2017; Has e Fischer, 2019; El Hachem *et al.*, 2019), a inclusão de *KLHL24* no painel poderia ser interessante por significar a resolução de um número adicional de casos.

A eficiência do painel de genes foi de 94,3%, possibilitando a detecção da(s) variante(s) patogênica(s) de 82 de um total de 87 casos índice analisados. Esse resultado foi considerado bastante satisfatório, especialmente considerando que genes sabidamente associados à EB não foram analisados e, principalmente, comparando essa eficiência à encontrada em outros estudos internacionais. Entre eles, destacam-se três estudos que

utilizaram abordagem similar através de painel de genes de NGS para diagnóstico genético de EB. Vahidnezhad e colaboradores (2017a) detectaram a variante causal de 76 indivíduos de um total de 91 (83,5%), através de um painel de 21 genes. Desses 76 casos resolvidos, apenas um carregava variante patogênica em gene não incluído no painel aqui apresentado (gene *EXPH5*). Has e colaboradores (2018a) desenvolveram um amplo painel incluindo 49 genes (19 associados à EB e outros 30 relacionados à adesão da epiderme ou potenciais modificadores genéticos). A variante causal foi identificada em 36 dos 40 pacientes analisados (90%) naquele estudo; apenas dois casos carregavam variantes em genes não inclusos no painel aqui apresentado (*KLHL24* e *PKP1*). O terceiro estudo, de Lucky e colaboradores (2018), utilizando um painel de 21 genes, resolveram 42 dos 43 casos analisados (97,7%), entretanto, todos os pacientes carregavam variantes em apenas cinco genes principais da EB (*KRT5*, *KRT14*, *LAMB3*, *COL17A1* e *COL7A1*). Essa contextualização reforça que a estratégia de selecionar os principais genes da EB, visando desenvolver um método acessível e eficaz, se mostrou efetiva. É indiscutível que um painel abrangente, incluindo todos os genes da EB, tem o potencial de diagnosticar um número maior de casos. Entretanto, considerando a realidade brasileira e o objetivo de incluir um grande número de pacientes na análise, a presente abordagem apresentou boas provas da importância do método.

### **Caracterização Genética de Pacientes com Epidermólise Bolhosa do Brasil**

A análise genética através do painel de genes foi realizada para um total de 109 pacientes com EB, sendo 87 casos índice e outros 22 familiares afetados. Como um dos objetivos principais da presente pesquisa foi investigar a prevalência das variantes patogênicas da população brasileira, para fins de cálculo foram considerados apenas os casos índice. Nos Apêndice 1 e 2 são apresentados esquemas acerca da organização da amostra incluída no projeto e nos diferentes estudos realizados, bem como os locais de origem dos pacientes.

A população brasileira apresenta um *background* genético único, construído a partir de gerações de miscigenação, que incluíram padrões próprios de imigração e povoamento e que proporcionaram a diversidade genética hoje observada. Dessa forma, esperava-se da análise genética dos pacientes com EB uma multiplicidade de variantes patogênicas, mas, ao mesmo tempo, peculiaridades próprias da população brasileira. Como o previsto, ao todo,

72 variantes patogênicas distintas foram identificadas, 32 delas (44,4%) não descritas anteriormente. Uma vez que a maior parte dos casos índice eram da forma distrófica de EB (58 pacientes), uma diversidade maior de variantes foi identificada em *COL7A1*, o que possibilitou maiores considerações acerca da sua prevalência.

Em especial, o estudo permitiu destacar quatro alterações em *COL7A1* (p.Arg1683Ter, c.325\_326insCG, c.7380+2T>C e c.1758del), que juntas representaram 34,9% dos alelos identificados. Curiosamente, nenhuma das quatro variantes havia sido até então considerada recorrente entre pacientes com EB, tendo sido citadas previamente em casos isolados (Hovnanian *et al.*, 1997; Sawamura *et al.*, 2005; Escamez *et al.*, 2010; van den Akker *et al.*, 2011). Entre elas, destaca-se a variante c.1758del, identificada pela primeira vez no presente estudo em um total de sete alelos. Chamou a atenção, também, a distribuição dos alelos com a variante c.7380+2T>C, todos na região Sul do Brasil, o que levantou a hipótese de um possível efeito fundador. Tendo em vista a maior frequência dessas variantes na população brasileira, análises de haplótipos seriam interessantes para verificar se os alelos identificados têm uma origem comum.

A identificação das variantes de EB da população brasileira é importante não apenas para a caracterização do perfil genético dos pacientes, mas também traz implicações para diagnósticos futuros. O conhecimento acerca das variantes mais frequentes no país permite que estas sejam priorizadas em análises próximas, como uma forma de triagem antes de uma investigação genética mais abrangente, o que economizaria tempo e custos. Levando-se em consideração que os métodos baseados em NGS podem tardar até serem estabelecidos como exame de rotina no país, pode-se propor, para os novos casos de EB, a análise prévia das variantes recorrentes da população brasileira através do método de sequenciamento de Sanger. O presente estudo foi o primeiro a investigar a prevalência de variantes patogênicas da EB no Brasil. Estudos futuros, com outras amostras brasileiras, serão importantes para confirmar as alterações genéticas mais frequentes dos pacientes com EB do Brasil.

### **Epidermólise Bolhosa com Ausência Congênita de Pele: Correlações Genótipo-Fenótipo**

Os sinais clínicos da EB envolvem manifestações cutâneas e extracutâneas em diferentes níveis gravidade; alguns característicos de subtipos específicos, enquanto outros são comuns a todos eles (Fine *et al.*, 2014). Nesse contexto, a ausência congênita de pele é

um sinal clínico já associado a todos os principais tipos de EB, usualmente descrita como uma condição rara (Chiaverini *et al.*, 2014; Alfayez *et al.*, 2017; Kayki *et al.*, 2017; Lalor *et al.*, 2019). Ainda que considerada incomum, alguns estudos a descreveram em um número considerável de pacientes (Christiano *et al.*, 1996; Jerábková *et al.*, 2010; van den Akker *et al.*, 2011; Chiaverini *et al.*, 2014), o que leva ao questionamento se de fato trata-se de uma condição rara ou se ocorre uma subnotificação de casos, tendo em vista a transitoriedade da condição, que é observada apenas ao nascimento e logo após. No presente projeto essa condição foi recorrente, estando presente em um total de 26 pacientes, o que instigou a busca por possíveis influências genéticas.

Por muito tempo, a única explicação aceita era de que a ausência de pele nesses pacientes é decorrente de trauma intrauterino causado pelo atrito de pés e pernas do feto com fragilidade cutânea devido à EB (Smith e Cram, 1978; Duran-McKinster *et al.*, 2000; Chiaverini *et al.*, 2014). Ainda que correta, essa explicação não responde por que essa condição é recorrente dentro de algumas famílias e por que alguns pacientes são mais suscetíveis que outros. Chiaverini e colaboradores (2014) investigaram, pela primeira vez, uma potencial correlação entre variantes genéticas e a ocorrência de aplasia cutis congênita em pacientes com EB distrófica (EBD). Interessantemente, os autores sugeriram uma possível associação de variantes *missense* que ocorrem próximas às interrupções do domínio de tripla hélice (*triple-helix domain*, THD) do colágeno tipo VII. A amostra analisada naquele estudo era composta de 22 pacientes, sendo que 11 deles carregavam variantes próximas a essas regiões. O pequeno número amostral e a ausência de estudos posteriores para comprovar ou contestar essa hipótese impossibilitou que a discussão fosse mais aprofundada.

Dessa forma, visando suprir essa demanda, realizamos a caracterização clínica e genética de 23 pacientes com epidermólise bolhosa com ausência congênita de pele identificados na amostra estudada. Além disso, realizamos uma revisão abrangente sobre os casos já descritos na literatura de EB com ausência congênita de pele, que incluiu uma amostragem total de 171 pacientes (49 EBS, 23 EBJ e 99 EBD). Análises de correlações genótipo-fenótipo foram realizadas para todos os tipos de EB associados. Na EBS, a ausência congênita de pele é um sinal clínico frequente em pacientes com o subtipo EBS com atresia pilórica e em pacientes com variantes patogênicas em *KLHL24*. Na EBJ com atresia pilórica, a ausência congênita de pele é um sinal recorrente em pacientes com variantes patogênicas

de códon de parada prematura e/ou variantes de substituição de aminoácidos no domínio extracelular dos genes da integrina  $\alpha 6\beta 4$ . Por fim, com relação à EBD, o presente estudo corroborou a hipótese prévia de Chiaverini e colaboradores (2014), uma vez que 86.7% dos casos de EBD identificados causados por variantes *missense* carregavam ao menos uma das variantes localizadas próximas às interrupções do domínio THD do colágeno VII. A explicação para essa correlação estaria relacionada à formação de uma proteína termossensível de menor estabilidade (Chiaverini *et al.*, 2010; Chiaverini *et al.*, 2014). Estudos adicionais serão importantes para melhor compreender os mecanismos envolvidos nesse fenótipo. Ao que sabemos, essa foi a maior revisão de casos de EB com ausência congênita de pele e possibilitou expandir o espectro de variantes patogênicas conhecidas.

### **O Resultado Genético Como Ferramenta de Diagnóstico e as Variantes de *Splicing* Modulando Formas Leves de Epidermólise Bolhosa**

O diagnóstico de EB baseado apenas na avaliação clínica pode ser bastante difícil, considerando a diversidade de subtipos da doença, os quais incluem múltiplos sinais clínicos com grande espectro de gravidade. A fim de se estimar a importância do resultado genético para o correto diagnóstico, foi realizada uma comparação entre a hipótese clínica inicial e o resultado genético definitivo dos pacientes incluídos no presente projeto. A amostra analisada incluiu 76 casos índice que cumpriram o requisito de apresentar ambos: (a) o subtipo clínico sugerido por dermatologista e (b) o resultado da análise genética. Cabe destacar que no presente projeto o exame clínico foi realizado por profissionais especialistas em EB, o que contrasta com a realidade da maior parte dos centros de atendimento brasileiros. Mesmo com esse viés, em 42,1% (32/76) dos casos o resultado genético foi essencial para a determinação do subtipo de EB associado. Esse resultado comprova que o exame clínico não consegue sozinho resolver todos os casos de EB.

Ao analisar-se em detalhe os casos cujo resultado genético se mostrou essencial para o diagnóstico, achados interessantes foram observados. Em primeiro lugar, chamou a atenção o número considerável de pacientes que apresentavam o subtipo EB distrófica recessiva localizada (EBDR-loc), visto que é uma forma considerada rara da doença. É possível que esse subtipo seja mais frequente do que antes pressuposto, ao menos na população brasileira. Estudos futuros serão importantes para definir se essa foi uma peculiaridade da amostra estudada ou se é um achado recorrente em outras amostras do

Brasil. Por se tratar de um subtipo pouco usual, que se manifesta com sinais clínicos similares às formas mais leves dos demais subtipos de EB, o diagnóstico apenas por avaliação clínica pode ser enganoso, o que reforça a importância do exame genético.

Um segundo achado interessante foi a elevada prevalência de variantes de sítio de *splice* entre os pacientes com EBDR-loc: 12 dos 15 pacientes (80%) carregavam ao menos uma variante de *splice*. Estudos prévios demonstraram que variantes que resultam em *in-frame exon-skipping*, ou seja, que causam a exclusão de um éxon sem alteração da fase de leitura, usualmente estão associadas a fenótipos mais brandos (Caminsky *et al.*, 2014; Toyonaga *et al.*, 2015). Esse mecanismo já foi descrito em casos isolados de EBDR-loc (Gardella *et al.*, 1996; Terracina *et al.*, 1998; Toyonaga *et al.*, 2015; Masunaga *et al.*, 2018). A hipótese proposta no presente estudo foi que as variantes de *splice* identificadas possam resultar em *in-frame exon-skipping*, o que explicaria o fenótipo atenuado de EBDR-loc. Nesse caso, seria possível demonstrar que esse mecanismo, até então descrito como raro na EB, pode ocorrer mais frequentemente do que antes esperado. Para comprovação das hipóteses sugeridas, estudos adicionais sobre o efeito das variantes são essenciais.

A partir da observação de que variantes de *exon-skipping* resultam em fenótipos mais atenuados da EB, alguns grupos de pesquisa estão desenvolvendo propostas de terapias através dessa abordagem, que é conhecida como *exon-skipping* mediado por oligonucleotídeos *antisense* (do inglês *antisense oligonucleotide* - AON). A abordagem é voltada para os casos graves de EB e se baseia no *skipping* de éxons que carregam mutações nulas. Simplificadamente, nessa metodologia, pequenas moléculas de RNA modificadas (os AON) são desenhadas para modular o *splicing* de pré-mRNA de éxons *in-frame* específicos que carregam a mutação causadora da doença (Bremer *et al.*, 2016). Através da ligação por complementaridade dos AON ao éxon alvo, o éxon é “ocultado” da maquinaria de *splicing* e removido juntamente com seus íntrons adjacentes, evitando a transcrição da mutação nula e permitindo a formação de uma proteína funcional, ainda que com uma deleção interna (Bremer *et al.*, 2016). A excisão desses éxons, em teoria, resulta em um fenótipo mais atenuado. Resultados promissores utilizando essa abordagem vêm sendo demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo* para a forma EBDR-generalizada grave (Turczynski *et al.*, 2012; Bornert *et al.*, 2016; Bremer *et al.*, 2016; Turczynski *et al.*, 2016; Bremer *et al.*, 2019).

Turczynski *et al.* (2016) comprovaram a recuperação da expressão do colágeno VII e da montagem das fibrilas de ancoragem em um enxerto de pele humana inserida em modelo animal, após injeções com AON específicos para os éxons 73, 74 e 80. Bornert *et al.* (2016), por sua vez, provaram que o *skipping* dos éxons 13 e 105 leva à produção de variantes do colágeno VII que mantém sua funcionalidade *in vivo*. Em um recente estudo, Bremer e colaboradores (2019) revisaram variantes de *COL7A1* que levam ao *skipping* de éxons e estão associadas a casos leves de EBD. A variante de exon-*skipping* c.1907G>T no éxon 15 de *COL7A1*, por exemplo, mostrou atenuar o efeito da variante nula c.2005C>T no mesmo éxon, uma vez que levava à exclusão do éxon 15 inteiro e, conseqüentemente, a um fenótipo resultante mais leve que o esperado para EBDR-generalizada intermediária (Schwieger-Briel, 2015). Ainda que em estágios iniciais, a abordagem de *exon-skipping* mediado por oligonucleotídeos *antisense* promete importantes perspectivas como terapia para formas graves de EB. Estudos acerca das variantes naturalmente associadas a exon-*skipping* são essenciais para o desenvolvimento dessas abordagens.

### **O Painel de Genes como Primeira Escolha para o Diagnóstico de Epidermólise Bolhosa**

O diagnóstico de EB inicia-se com a avaliação clínica do paciente e subsequente indicação da suspeita da doença. A partir de então, o diagnóstico pode ser confirmado através de mapeamento por imunofluorescência (MIF), microscopia eletrônica de transmissão (MET) ou análise genética. Em alguns casos, quando disponíveis, os três métodos podem ser realizados, uma vez que podem fornecer informações complementares (Fine *et al.*, 2008; Has *et al.*, 2019). Entretanto, o teste genético é sempre recomendado para o diagnóstico, por fornecer um resultado definitivo e mais informativo, que possibilitará indicar o prognóstico do paciente, realizar o aconselhamento genético da família, bem como o diagnóstico genético pré-natal e pré-implantacional de gestações futuras (Has *et al.*, 2019).

A realidade brasileira, entretanto, não permite que o fluxograma para o diagnóstico de EB, sugerido em estudos internacionais, seja aqui aplicado. As orientações sugerem que análises em sequência sejam realizadas a fim de se obter as informações acerca do subtipo de EB, modo de herança, proteína alvo e sua expressão relativa, gene envolvido e variante patogênica causal (Fine *et al.*, 2014; Has *et al.*, 2019). Em vez disso, a maior parte dos pacientes com EB do Brasil têm apenas o exame clínico como evidência de EB. A principal

problemática de se ter a avaliação clínica como única ferramenta de diagnóstico se refere à grande complexidade dos espectros fenotípicos dos subtipos de EB. Ainda que os fenótipos mais graves sejam bastante característicos, o mesmo não se pode dizer acerca dos fenótipos leves e intermediários, que se distribuem em uma escala contínua de gravidade, na qual distintos subtipos podem se sobrepor (van den Akker *et al.*, 2009; Fine *et al.*, 2014). Conseqüentemente, uma grande parcela dos pacientes brasileiros não é corretamente diagnosticada quanto ao subtipo de EB associado. Considerando os distintos padrões de herança envolvidos na doença, um diagnóstico equivocado pode ter significativas implicações, especialmente para o aconselhamento genético da família.

Em alguns centros brasileiros mais especializados, o exame de MIF, conhecido como imunomapeamento, é disponibilizado para apoiar o diagnóstico de EB. Entretanto, por uma série de limitações intrínsecas da técnica (Fine *et al.*, 2008; Has *et al.*, 2019) e também pelo déficit de analistas experientes no Brasil, muitos resultados dos exames de MIF são inconclusivos. A repetição do exame é necessária em diversos casos, o que exige nova biópsia de pele. A fragilidade cutânea é uma característica comum aos pacientes com EB, sendo extrema em alguns casos. Dessa forma, a realização de biópsia, que por si só já é invasiva, causa ainda mais complicações nesse grupo de pacientes. A partir da presente pesquisa, alguns profissionais de saúde brasileiros, especialmente de regiões de maior deficiência de especialistas em genodermatoses, relataram que já não solicitam o exame de MIF para EB, mesmo quando disponível, por considerar que as dificuldades causadas pela realização da biópsia não compensam o resultado do MIF, que na maior parte dos casos é inconclusivo (Doriqui, MJ – comunicação pessoal).

O presente estudo expôs as dificuldades inerentes dos métodos de diagnóstico de EB, evidenciando, também, peculiaridades do cenário brasileiro. As tecnologias de NGS, antes consideradas de custo excessivamente elevado, têm se mostrado mais acessíveis a cada ano (Has e Fischer, 2019). Um dos objetivos desse trabalho foi demonstrar que, ainda que o painel de genes por NGS não seja atualmente uma realidade de diagnóstico para o sistema público brasileiro, ele tem um grande potencial para um futuro breve. A discussão sobre ferramentas de diagnóstico para EB no Brasil é imperativa, tendo em vista o número de pacientes brasileiros e a dificuldade de classificação apenas com o exame clínico. Nesse sentido, o presente projeto apresentou uma abordagem viável e eficiente para o diagnóstico de EB, que pode, num futuro próximo, ser considerada para o sistema de saúde brasileiro.



## Genética da Epidermólise Bolhosa: Avanços e Perspectivas

As bases clínicas e moleculares da EB vêm sendo reveladas pouco a pouco através de estudos que iniciaram há muitas décadas. O termo ‘epidermólise bolhosa’ foi descrito pela primeira vez em 1886 (Köbner, 1986; Fine *et al.*, 2008) e, desde lá, uma multiplicidade de genes foram descobertos associados aos fenótipos da EB. Aos poucos, as sequências e estruturas dos genes foram sendo desvendadas, bem como suas interações e alguns de seus mecanismos de patogenicidade por detrás da EB (Bonifas *et al.*, 1991; Coulombe *et al.*, 1991; Christiano *et al.*, 1994b; Franzke *et al.*, 2005; Bruckner-Tuderman *et al.*, 2013; Fine *et al.*, 2014). A descoberta das variantes patogênicas que resultam na EB possibilitou estabelecer correlações genótipo-fenótipo e conhecer alterações frequentes associadas a cada subtipo da doença.

À medida que mais componentes e mecanismos foram desvendados na EB, mais se compreendeu acerca da complexidade existente e do universo ainda a se descobrir. A EB, inicialmente considerada como uma única condição, demonstrou compreender um grupo de doenças, com uma base molecular comum que envolve a fragilidade da pele. Os subsequentes estudos foram apresentando novas formas da doença e, conseqüentemente, novos subtipos, que passaram a ser consensualmente classificados a fim de se traduzir e organizar em uma única linguagem todas as descobertas de anos (Bruckner-Tuderman *et al.*, 2013; Fine *et al.*, 2014).

As bases moleculares da EB são, atualmente, melhor compreendidas, incluindo ao menos 16 genes conhecidos, variantes patogênicas cujo efeito pode ser demonstrado e diferentes mecanismos já elucidados (Has *et al.*, 2019). Apesar dos muitos avanços e do melhor entendimento acerca do *background* molecular dessa doença, um longo caminho há pela frente. Cada estudo que traz algo novo mostra, por outro lado, uma nova lacuna a se preencher. As recentes descobertas de novos genes associados à EB são uma prova disso e são uma amostra do que ainda está por vir (McGrath, 2015; Has, 2017; Bolling e Jonkman, 2019; Vahidnezhad *et al.*, 2019b; Has *et al.*, 2020).

Muitas perguntas seguem a ser respondidas, como por exemplo, o que explica a considerável variabilidade intra e interfamiliar observada na EB? Por que existem tantas exceções que não seguem as correlações genótipo-fenótipo estabelecidas? O que explica a maior suscetibilidade de alguns pacientes para alguns sinais clínicos específicos? Por que

mesmo após análises genéticas globais alguns pacientes permanecem sem o diagnóstico genético? Quais genes modificadores poderiam exercer influência nos fenótipos da EB? No presente estudo, caracterizamos uma amostra de pacientes com EB do Brasil, apresentando variantes novas e recorrentes, correlacionamos a genética com sinais clínicos específicos da EB, e desenvolvemos um método de análise genética viável e eficiente para o diagnóstico de EB, propondo sua utilização no sistema de saúde brasileiro. Ademais, o presente projeto colaborou para a melhor compreensão da rede molecular existente por detrás da EB, ajudando a completar algumas pequenas peças desse complexo quebra-cabeças.

## **CAPÍTULO X – CONCLUSÕES**

---

No presente estudo foi realizada uma caracterização genética e clínica de uma amostra de pacientes com epidermólise bolhosa (EB) do Brasil. Um série de descobertas foram apresentadas e serão importantes para a melhor compreensão do background clínico e molecular dessa doença. Entre os principais achados, destaca-se:

- ➔ Em uma amostra de 87 casos índice estudados, foram identificadas 72 variantes patogênicas diferentes, sendo 32 delas descritas pela primeira vez nesse estudo.
- ➔ Algumas variantes patogênicas identificadas apresentaram uma frequência elevada na amostra estudada. Entre os pacientes com EB simples, duas variantes que afetam o resíduo 125 da queratina 14 (p.Arg125Cys e p.Arg125His) mostram alta recorrência. Entre os pacientes com EB distrófica quatro variantes do colágeno tipo VII (p.Arg1683Ter, c.325\_326insCG, c.7380+2T>C, c.1758delC) apresentaram maior frequência. A determinação de variantes recorrentes tem importante implicação para definição de prioridades em testes genéticos futuros.
- ➔ O painel de genes desenvolvido apresentou ótima eficiência de diagnóstico (94.3%) e demonstrou ser um método viável, definitivo e pouco invasivo para o diagnóstico de EB. Os resultados apresentados apoiam o painel de genes como primeira escolha para o diagnóstico de EB no Brasil.
- ➔ Uma descrição clínica e genética de 23 novos casos de EB com ausência congênita de pele foi apresentada. Além disso, uma extensa revisão de literatura foi realizada, caracterizando, ao que sabemos, o maior estudo acerca dessa condição na EB. Através de análises de correlações genótipo-fenótipo, a investigação apontou potencial influência de variantes *missense* próximas às interrupções do domínio de tripla hélice do colágeno VII à ausência congênita de pele em EB distrófica.
- ➔ O resultado genético se mostrou essencial para o correto diagnóstico do subtipo de EB em 42,1% dos pacientes, comprovando que a avaliação clínica, mesmo quando realizada por especialistas, não consegue resolver sozinha todos os casos da doença. Isso se deve à significativa sobreposição clínica que existe entre os subtipos de EB, especialmente aqueles que envolvem apresentações clínicas mais atenuadas.
- ➔ Uma alta frequência de variantes de *splicing* foram observadas associadas à EB distrófica recessiva localizada, uma forma clínica leve e considerada rara da doença. O estudo propôs que o mecanismo de *in-frame exon skipping* pode estar modulando o efeito das variantes observadas. Estudos adicionais serão importantes para verificar

se esse tipo de alteração genética é mais comum no Brasil e para investigar as potenciais implicações dessas variantes genéticas como terapia para casos graves da doença.

Em conclusão, no presente estudo foi realizada a caracterização genética e clínica de uma amostra brasileira com EB. Esse estudo possibilitou a identificação de variantes genéticas recorrentes e raras na população estudada, a correlação genótipo-fenótipo com características e subtipos clínicos específicos, além do desenvolvimento de um método de análise genética viável e eficiente para o diagnóstico de EB. Os resultados aqui apresentados permitem não apenas o entendimento das bases genéticas e clínicas da doença, como também têm implicações para estudos futuros visando o desenvolvimento de terapias moleculares para EB.

## **CAPÍTULO XI – PERSPECTIVAS**

---

O presente trabalho permitiu preencher algumas lacunas sobre o entendimento das bases moleculares que influenciam a epidermólise bolhosa (EB) e seus múltiplos sinais clínicos. Os próximos passos desse projeto são destacados abaixo.

- ➔ Identificar as variantes patogênicas dos pacientes que não tiveram o diagnóstico genético, empregando a metodologia de sequenciamento do exoma através de colaboração com outro grupo de pesquisa.
- ➔ Investigar em novos casos de EB a presença das variantes mais frequentes identificadas no presente estudo.
- ➔ Explorar, através da técnica de minigene, o efeito das variantes patogênicas em sítios de *splice*, buscando correlacionar esse efeito à gravidade do fenótipo apresentado.
- ➔ Realizar estudo *in silico* e *in vitro* a fim de se investigar o potencial da metodologia de *exon-skipping* mediado por oligonucleotídeos *antisense* como abordagem terapêutica para pacientes com EB.

## **CAPÍTULO XII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



- Abdallah F, Mijouin L, Pichon C (2017) Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators Inflamm* 2017:5095293.
- Alfayez Y, Alsharif S, Santli A (2017) A Case of Aplasia Cutis Congenita Type VI: Bart Syndrome. *Case Rep Dermatol. Switzerland*. p. 112-118.
- Alkhalifah A, Chiaverini C, Charlesworth A, Has C, Lacour JP (2018) Burnlike scars: A sign suggestive of KLHL24-related epidermolysis bullosa simplex. *Pediatr Dermatol* 35(3):e193-e195.
- Almaani N, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Lai-Cheong JE, Wong A, Nanda A, Moss C, Martinez AE, Mellerio JE, McGrath JA (2011) Identical glycine substitution mutations in type VII collagen may underlie both dominant and recessive forms of dystrophic epidermolysis bullosa. *Acta Derm Venereol* 91(3):262-6.
- Arin MJ (2009) The molecular basis of human keratin disorders. *Hum Genet* 125(4):355-73.
- Arin MJ, Grimberg G, Schumann H, De Almeida H, Jr., Chang YR, Tadini G, Kohlhase J, Krieg T, Bruckner-Tuderman L, Has C (2010) Identification of novel and known *KRT5* and *KRT14* mutations in 53 patients with epidermolysis bullosa simplex: correlation between genotype and phenotype. *Br J Dermatol* 162(6):1365-9.
- Atanasova VS, Jiang Q, Prisco M, Gruber C, Pinon Hofbauer J, Chen M, Has C, Bruckner-Tuderman L, McGrath JA, Uitto J et al. (2017) Amlexanox Enhances Premature Termination Codon Read-Through in *COL7A1* and Expression of Full Length Type VII Collagen: Potential Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 137(9):1842-1849.
- Aumailley M, El Khal A, Knoss N, Tunggal L (2003) Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix Biol* 22(1):49-54.
- Bart BJ (1970) Epidermolysis bullosa and congenital localized absence of skin. *Arch Dermatol* 101(1):78-81.
- Behrens DT, Villone D, Koch M, Brunner G, Sorokin L, Robenek H, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P, Hansen U (2012) The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens. *J Biol Chem* 287(22):18700-9.
- Bolling MC, Lemmink HH, Jansen GH, Jonkman MF (2011) Mutations in *KRT5* and *KRT14* cause epidermolysis bullosa simplex in 75% of the patients. *Br J Dermatol* 164(3):637-44.
- Bolling MC, Jongbloed JDH, Boven LG, Diercks GFH, Smith FJD, Irwin McLean WH, Jonkman MF (2014) Plectin mutations underlie epidermolysis bullosa simplex in 8% of patients. *J Invest Dermatol* 134(1):273-276.
- Bolling MC, Jonkman MF (2019) KLHL24: Beyond Skin Fragility. *J Invest Dermatol* 139(1):22-24.
- Bonifas JM, Rothman AL, Epstein EH, Jr (1991) Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science* 254(5035):1202-5.
- Bornert O, Kuhl T, Bremer J, van den Akker PC, Pasmooij AM, Nystrom A (2016) Analysis of the functional consequences of targeted exon deletion in *COL7A1* reveals prospects for dystrophic epidermolysis bullosa therapy. *Mol Ther* 24(7):1302-11.
- Bremer J, Bornert O, Nystrom A, Gostynski A, Jonkman MF, Aartsma-Rus A, van den Akker PC, Pasmooij AM (2016) Antisense Oligonucleotide-mediated Exon Skipping as a Systemic

- Therapeutic Approach for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther Nucleic Acids* 5(10):e379.
- Bremer J, van der Heijden EH, Eichhorn DS, Meijer R, Lemmink HH, Scheffer H, Sinke RJ, Jonkman MF, Pasmooij AMG, Van den Akker PC (2019) Natural Exon Skipping Sets the Stage for Exon Skipping as Therapy for Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol Ther Nucleic Acids* 18:465-475.
- Bruckner-Tuderman L, Has C (2012) Molecular heterogeneity of blistering disorders: the paradigm of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 132(E1):E2-5.
- Bruckner-Tuderman L, McGrath JA, Robinson EC, Uitto J (2013) Progress in Epidermolysis bullosa research: summary of DEBRA International Research Conference 2012. *J Invest Dermatol*. United States. p. 2121-6.
- Burgeson RE (1993) Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 101(3):252-5.
- Caminsky N, Mucaki EJ, Rogan PK (2014) Interpretation of mRNA splicing mutations in genetic disease: review of the literature and guidelines for information-theoretical analysis. *F1000Res* 3:282.
- Castanon MJ, Walko G, Winter L, Wiche G (2013) Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochem Cell Biol* 140(1):33-53.
- Charlesworth A, Gagnoux-Palacios L, Bonduelle M, Ortonne JP, De Raeve L, Meneguzzi G (2003) Identification of a lethal form of epidermolysis bullosa simplex associated with a homozygous genetic mutation in Plectin. *J Invest Dermatol* 121(6):1344-8.
- Chiaverini C, Charlesworth AV, Youssef M, Cuny JF, Rabia SH, Lacour JP, Meneguzzi G (2010) Inversa dystrophic epidermolysis bullosa is caused by missense mutations at specific positions of the collagenic domain of collagen type VII. *J Invest Dermatol* 130(10):2508-11.
- Chiaverini C, Charlesworth A, Fernandez A, Barbarot S, Bessis D, Bodemer C, Bursztejn AC, Cobo AM, Del Rio M, D'Incan M et al. (2014) Aplasia cutis congenita with dystrophic epidermolysis bullosa: clinical and mutational study. *Br J Dermatol* 170(4):901-6.
- Chmel N, Danescu S, Gruler A, Kiritsi D, Bruckner-Tuderman L, Kreuter A, Kohlhase J, Has C (2015) A Deep-Intronic *FERMT1* Mutation Causes Kindler Syndrome: An Explanation for Genetically Unsolved Cases. *J Invest Dermatol* 135(11):2876-2879.
- Christiano AM, Anhalt G, Gibbons S, Bauer EA, Uitto J (1994a) Premature termination codons in the type VII collagen gene (*COL7A1*) underlie severe, mutilating recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Genomics* 21(1):160-8.
- Christiano AM, Greenspan DS, Lee S, Uitto J (1994b) Cloning of human type VII collagen. Complete primary sequence of the alpha 1(VII) chain and identification of intragenic polymorphisms. *J Biol Chem* 269(32):20256-62.
- Christiano AM, Bart BJ, Epstein EH, Uitto J (1996) Genetic basis of Bart's syndrome: a glycine substitution mutation in the type VII collagen gene. *J Invest Dermatol* 106(6):1340-2.
- Chung HJ, Uitto J (2010) Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 28(1):93-105.
- Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, Hebert A, Paller AS, Fuchs E (1991) Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* 66(6):1301-11.

- Coulombe PA, Kerns ML, Fuchs E (2009) Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility. *J Clin Invest* 119(7):1784-93.
- Dang N, Murrell DF (2008) Mutation analysis and characterization of *COL7A1* mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* 17(7):553-68.
- de Pereda JM, Ortega E, Alonso-Garcia N, Gomez-Hernandez M, Sonnenberg A (2009a) Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. *Cell Adh Migr* 3(4):361-4.
- de Pereda JM, Lillo MP, Sonnenberg A (2009b) Structural basis of the interaction between integrin alpha6beta4 and Plectin at the hemidesmosomes. *Embo j* 28(8):1180-90.
- Diociaiuti A, Castiglia D, Giancristoforo S, Guerra L, Proto V, Dotta A, Boldrini R, Zambruno G, El Hachem M (2016) Frequent Occurrence of Aplasia Cutis Congenita in Bullous Dermolysis of the Newborn. *Acta Derm Venereol* 96(6):784-7.
- Dănescu S, Has C, Senila S, Ungureanu L, Cosgarea R (2015) Epidemiology of inherited epidermolysis bullosa in Romania and genotype-phenotype correlations in patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 29(5):899-903.
- Duran-McKinster C, Rivera-Franco A, Tamayo L, de la Luz Orozco-Covarrubias M, Ruiz-Maldonado R (2000) Bart syndrome: the congenital localized absence of skin may follow the lines of Blaschko. Report of six cases. *Pediatr Dermatol* 17(3):179-82.
- El Hachem M, Barresi S, Diociaiuti A, Boldrini R, Condorelli AG, Capoluongo E, Proto V, Scuvera G, Has C, Tartaglia M et al. (2019) Phenotypic Features of Epidermolysis Bullosa Simplex due to KLHL24 Mutations in 3 Italian Cases. *Acta Derm Venereol* 99(2):238-239.
- Escamez MJ, Garcia M, Cuadrado-Corrales N, Llamas SG, Charlesworth A, De Luca N, Illera N, Sanchez-Jimeno C, Holguin A, Duarte B et al. (2010) The first *COL7A1* mutation survey in a large Spanish dystrophic epidermolysis bullosa cohort: c.6527insC disclosed as an unusually recurrent mutation. *Br J Dermatol* 163(1):155-61.
- Fine JD, Bauer EA, Briggaman RA, Carter DM, Eady RA, Esterly NB, Holbrook KA, Hurwitz S, Johnson L, Lin A et al. (1991) Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. *J Am Acad Dermatol* 24(1):119-35.
- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Briggaman RA, Bruckner-Tuderman L, Christiano A, Heagerty A, Hintner H, Jonkman MF, McGrath J et al. (2000) Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the Second International Consensus Meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol* 42(6):1051-66.
- Fine JD (2010a) Inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet J Rare Dis* 5:12.
- Fine JD (2010b) Inherited epidermolysis bullosa: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci* 1194:213-22.
- Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I et al. (2008) The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol* 58(6):931-50.
- Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF et al. (2014) Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol* 70(6):1103-26.

- Fine JD (2016) Epidemiology of Inherited Epidermolysis Bullosa Based on Incidence and Prevalence Estimates From the National Epidermolysis Bullosa Registry. *JAMA Dermatol* 152(11):1231-1238.
- Franzke CW, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L (2005) Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *J Biol Chem* 280(6):4005-8.
- Fuchs E (2007) Scratching the surface of skin development. *Nature* 445(7130):834-42.
- Gache Y, Chavanas S, Lacour JP, Wiche G, Owaribe K, Meneguzzi G, Ortonne JP (1996) Defective expression of Plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J Clin Invest* 97(10):2289-98.
- Gardella R, Belletti L, Zoppi N, Marini D, Barlati S, Colombi M (1996) Identification of two splicing mutations in the collagen type VII gene (*COL7A1*) of a patient affected by the localisata variant of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* 59(2):292-300.
- Gardella R, Castiglia D, Posteraro P, Bernardini S, Zoppi N, Paradisi M, Tadini G, Barlati S, McGrath JA, Zambruno G et al. (2002) Genotype-phenotype correlation in italian patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 119(6):1456-62.
- Goult BT, Bouaouina M, Harburger DS, Bate N, Patel B, Anthis NJ, Campbell ID, Calderwood DA, Barsukov IL, Roberts GC et al. (2009) The structure of the N-terminus of kindlin-1: a domain important for alpha3beta1 integrin activation. *J Mol Biol* 394(5):944-56.
- Guerrero-Aspizua S, Conti CJ, Escamez MJ, Castiglia D, Zambruno G, Youssefian L, Vahidnezhad H, Requena L, Itin P, Tadini G et al. (2019) Assessment of the risk and characterization of non-melanoma skin cancer in Kindler syndrome: study of a series of 91 patients. *Orphanet J Rare Dis* 14(1):183.
- Hammami-Hauasli N, Schumann H, Raghunath M, Kilgus O, Luthi U, Luger T, Bruckner-Tuderman L (1998) Some, but not all, glycine substitution mutations in *COL7A1* result in intracellular accumulation of collagen VII, loss of anchoring fibrils, and skin blistering. *J Biol Chem* 273(30):19228-34.
- Hammersen J, Has C, Naumann-Bartsch N, Stachel D, Kiritsi D, Soder S, Tardieu M, Metzler M, Bruckner-Tuderman L, Schneider H (2016) Genotype, Clinical Course, and Therapeutic Decision Making in 76 Infants with Severe Generalized Junctional Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 136(11):2150-2157.
- Harburger DS, Calderwood DA (2009) Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* 122(Pt 2):159-63.
- Has C, Castiglia D, del Rio M, Diez MG, Piccinni E, Kiritsi D, Kohlhase J, Itin P, Martin L, Fischer J et al. (2011) Kindler syndrome: extension of *FERMT1* mutational spectrum and natural history. *Hum Mutat* 32(11):1204-12.
- Has C, Sparta G, Kiritsi D, Weibel L, Moeller A, Vega-Warner V, Waters A, He Y, Anikster Y, Esser P et al. (2012) Integrin alpha3 mutations with kidney, lung, and skin disease. *N Engl J Med* 366(16):1508-14.
- Has C, Bruckner-Tuderman L (2014) The genetics of skin fragility. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 15:245-68.
- Has C, He Y (2016) Research Techniques Made Simple: Immunofluorescence Antigen Mapping in Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 136(7):e65-e71.
- Has C (2017) The "Kelch" Surprise: KLHL24, a New Player in the Pathogenesis of Skin Fragility. *J Invest Dermatol* 137(6):1211-1212.

- Has C, Kusel J, Reimer A, Hoffmann J, Schauer F, Zimmer A, Fischer J (2018a) The Position of Targeted Next-generation Sequencing in Epidermolysis Bullosa Diagnosis. *Acta Derm Venereol* 98(4):437-440.
- Has C, Nystrom A, Saeidian AH, Bruckner-Tuderman L, Uitto J (2018b) Epidermolysis bullosa: Molecular pathology of connective tissue components in the cutaneous basement membrane zone. *Matrix Biol* 71-72:313-329.
- Has C, Fischer J (2019) Inherited epidermolysis bullosa: New diagnostics and new clinical phenotypes. *Exp Dermatol* 28(10):1146-1152.
- Has C, Liu L, Bolling MC, Charlesworth AV, El Hachem M, Escamez MJ, Fuentes I, Buchel S, Hiremagalore R, Pohla-Gubo G et al. (2019) Clinical practice guidelines for laboratory diagnosis of epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*.
- Has C, Bauer JW, Bodemer C, Bolling MC, Bruckner-Tuderman L, Diem A, Fine JD, Heagerty A, Hovnanian A, Marinkovich MP, et al. (2020) Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility. *Br J Dermatol*. doi: 10.1111/bjd.18921.
- Hassan ME, Al Ali K, Khalaf M, Taryam L (2013) Pyloric atresia epidermolysis bullosa aplasia cutis syndrome: a case report and literature review *Annals of Pediatric Surgery* 9(2):84-86.
- He Y, Balasubramanian M, Humphreys N, Waruiru C, Brauner M, Kohlhase J, O'Reilly R, Has C (2016a) Intronic ITGA3 Mutation Impacts Splicing Regulation and Causes Interstitial Lung Disease, Nephrotic Syndrome, and Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 136(5):1056-1059.
- He Y, Maier K, Leppert J, Hausser I, Schwieger-Briel A, Weibel L, Theiler M, Kiritsi D, Busch H, Boerries M et al. (2016b) Monoallelic Mutations in the Translation Initiation Codon of KLHL24 Cause Skin Fragility. *Am J Hum Genet* 99(6):1395-1404.
- Herz C, Aumailley M, Schulte C, Schlotzer-Schrehardt U, Bruckner-Tuderman L, Has C (2006) Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 281(47):36082-90.
- Hoffmann J, Casetti F, Reimer A, Leppert J, Gruninger G, Has C (2019) A Silent *COL17A1* Variant Alters Splicing and Causes Junctional Epidermolysis Bullosa. *Acta Derm Venereol* 99(4):460-461.
- Hovnanian A, Rochat A, Bodemer C, Petit E, Rivers CA, Prost C, Fraitag S, Christiano AM, Uitto J, Lathrop M et al. (1997) Characterization of 18 new mutations in *COL7A1* in recessive dystrophic epidermolysis bullosa provides evidence for distinct molecular mechanisms underlying defective anchoring fibril formation. *Am J Hum Genet* 61(3):599-610.
- Intong LR, Murrell DF (2012) Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostic criteria and classification. *Clin Dermatol* 30(1):70-7.
- Irvine AD, McLean WH (1999) Human keratin diseases: the increasing spectrum of disease and subtlety of the phenotype-genotype correlation. *Br J Dermatol* 140(5):815-28.
- Izmiryan A, Ganier C, Bovolenta M, Schmitt A, Mavilio F, Hovnanian A (2018) Ex Vivo *COL7A1* Correction for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Using CRISPR/Cas9 and Homology-Directed Repair. *Mol Ther Nucleic Acids* 12:554-567.
- Jarvikallio A, Pulkkinen L, Uitto J (1997) Molecular basis of dystrophic epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen gene (*COL7A1*). *Hum Mutat* 10(5):338-47.

- Jerábková B, Kopecková L, Bucková H, Veselý K, Valícková J, Fajkusová L (2010) Analysis of the *COL7A1* gene in Czech patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals novel and recurrent mutations. *J Dermatol Sci* 59(2):136-40.
- Jobard F, Bouadjar B, Caux F, Hadj-Rabia S, Has C, Matsuda F, Weissenbach J, Lathrop M, Prud'homme JF, Fischer J (2003) Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome. *Hum Mol Genet* 12(8):925-35.
- Kayki G, Bozkaya D, Ozaltin F, Orhan D, Kaymaz F, Korkmaz E, Yigit S (2017) Epidermolysis Bullosa with Pyloric Atresia and Aplasia Cutis in a Newborn Due to Homozygous Mutation in *ITGB4*. *Fetal Pediatr Pathol* 36(4):332-339.
- Kern JS, Kohlhase J, Bruckner-Tuderman L, Has C (2006) Expanding the *COL7A1* mutation database: novel and recurrent mutations and unusual genotype-phenotype constellations in 41 patients with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 126(5):1006-12.
- Khani P, Ghazi F, Zekri A, Nasri F, Behrangi E, Aghdam AM, Mirzaei H (2018) Keratins and epidermolysis bullosa simplex. *J Cell Physiol* 234(1):289-297.
- Kim EN, Harris AG, Bingham LJ, Yan W, Su JC, Murrell DF (2017) A Review of 52 Pedigrees with Epidermolysis Bullosa Simplex Identifying Ten Novel Mutations in *KRT5* and *KRT14* in Australia. *Acta Derm Venereol* 97(9):1114-1119.
- Kiritsi D, Kern JS, Schumann H, Kohlhase J, Has C, Bruckner-Tuderman L (2011) Molecular mechanisms of phenotypic variability in junctional epidermolysis bullosa. *J Med Genet* 48(7):450-7.
- Kiritsi D, Has C, Bruckner-Tuderman L (2013a) Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adh Migr* 7(1):135-41.
- Kiritsi D, Pigors M, Tantcheva-Poor I, Wessel C, Arin MJ, Kohlhase J, Bruckner-Tuderman L, Has C (2013b) Epidermolysis bullosa simplex ogna revisited. *J Invest Dermatol*. United States. p. 270-3.
- Köbner H (1986) Hereditäre Anlage zur Blasenbildung. (Epidermolysis bullosa hereditaria). *Dtsch Med Wochenschr* 12:21-22.
- Koss-Harnes D, Hoyheim B, Anton-Lamprecht I, Gjesti A, Jorgensen RS, Jahnsen FL, Olaisen B, Wiche G, Gedde-Dahl T, Jr (2002) A site-specific plectin mutation causes dominant epidermolysis bullosa simplex Ogna: two identical de novo mutations. *J Invest Dermatol* 118(1):87-93.
- Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A (2003) Analysis of the interactions between BP180, BP230, Plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci* 116(Pt 2):387-99.
- Kridin K, Kneiber D, Kowalski EH, Valdebran M, Amber KT (2019) Epidermolysis bullosa acquisita: A comprehensive review. *Autoimmun Rev* 18(8):786-795.
- Laimer M, Lanschuetzer CM, Diem A, Bauer JW (2010) Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 28(1):55-60.
- Lalor L, Titeux M, Palisson F, Fuentes I, Yubero MJ, Tasanen K, Huilaja L, Has C, Tadini G, Haggstrom AN et al. (2019) Epidermolysis bullosa simplex-generalized severe type due to keratin 5 p.Glu477Lys mutation: Genotype-phenotype correlation and in silico modeling analysis. *Pediatr Dermatol* 36(1):132-138.

- Lee JYW, Liu L, Hsu CK, Aristodemou S, Ozoemena L, Ogboli M, Moss C, Martinez AE, Mellerio JE, McGrath JA (2017) Mutations in *KLHL24* Add to the Molecular Heterogeneity of Epidermolysis Bullosa Simplex. *J Invest Dermatol* 137(6):1378-1380.
- Lin Z, Li S, Feng C, Yang S, Wang H, Ma D, Zhang J, Gou M, Bu D, Zhang T et al. (2016) Stabilizing mutations of *KLHL24* ubiquitin ligase cause loss of keratin 14 and human skin fragility. *Nat Genet* 48(12):1508-1516.
- Losquadro WD (2017) Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am* 25(3):283-289.
- Lucky AW, Dagaonkar N, Lammers K, Husami A, Kissell D, Zhang K (2018) A comprehensive next-generation sequencing assay for the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Pediatr Dermatol* 35(2):188-197.
- Mariath LM, Santin JT, Frantz JA, Doriqui MJR, Kiszewski AE, Schuler-Faccini L (2019) An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants. *Clin Genet* 96(3):189-198.
- Masunaga T, Kubo A, Ishiko A (2018) Splice site mutation in *COL7A1* resulting in aberrant in-frame transcripts identified in a case of recessive dystrophic epidermolysis bullosa, pretibial. *J Dermatol* 45(6):742-745.
- McGrath JA, Ishida-Yamamoto A, O'Grady A, Leigh IM, Eady RA (1993) Structural variations in anchoring fibrils in dystrophic epidermolysis bullosa: correlation with type VII collagen expression. *J Invest Dermatol* 100(4):366-72.
- McGrath JA, Schofield OM, Eady RA (1994) Epidermolysis bullosa pruriginosa: dystrophic epidermolysis bullosa with distinctive clinicopathological features. *Br J Dermatol* 130(5):617-25.
- McGrath J, Uitto J (2010) Anatomy and Organization of Human Skin. In: Wiley-Blackwell, editor. *Rook's Textbook of Dermatology*. p. 53-107.
- McGrath JA (2015) Recently Identified Forms of Epidermolysis Bullosa. *Ann Dermatol* 27(6):658-66.
- McMillan JR, Matsumura T, Hashimoto T, Schumann H, Bruckner-Tuderman L, Shimizu H (2003) Immunomapping of EBA sera to multiple epitopes on collagen VII: further evidence that anchoring fibrils originate and terminate in the lamina densa. *Exp Dermatol* 12(3):261-7.
- Mencia A, Garcia M, Garcia E, Llamas S, Charlesworth A, de Lucas R, Vicente A, Trujillo-Tiebas MJ, Coto P, Costa M et al. (2016) Identification of two rare and novel large deletions in *ITGB4* gene causing epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Exp Dermatol* 25(4):269-74.
- Moser M, Legate KR, Zent R, Fassler R (2009) The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324(5929):895-9.
- Muller FB, Kuster W, Wodecki K, Almeida H, Jr., Bruckner-Tuderman L, Krieg T, Korge BP, Arin MJ (2006) Novel and recurrent mutations in keratin *KRT5* and *KRT14* genes in epidermolysis bullosa simplex: implications for disease phenotype and keratin filament assembly. *Hum Mutat* 27(7):719-20.
- Myllyharju J, Kivirikko KI (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20(1):33-43.
- Nagai M, Nagai H, Tominaga C, Sakaguchi Y, Jitsukawa O, Ohgo N, Nishigori C, Yamanishi K (2015) Localised Dominant Dystrophic Epidermolysis Bullosa with a Novel de Novo

- Mutation in *COL7A1* Diagnosed by Next-generation Sequencing. *Acta Derm Venereol* 95(5):629-31.
- Nakano A, Chao SC, Pulkkinen L, Murrell D, Bruckner-Tuderman L, Pfindner E, Uitto J (2002a) Laminin 5 mutations in junctional epidermolysis bullosa: molecular basis of Herlitz vs. non-Herlitz phenotypes. *Hum Genet* 110(1):41-51.
- Nakano A, Lestringant GG, Paperna T, Bergman R, Gershoni R, Frossard P, Kanaan M, Meneguzzi G, Richard G, Pfindner E et al. (2002b) Junctional epidermolysis bullosa in the Middle East: clinical and genetic studies in a series of consanguineous families. *J Am Acad Dermatol* 46(4):510-6.
- Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Nakamura H, Arita K, Yoneda K, Kusaka T, Yanagihara T, Kosaki R, Sago H et al. (2011) A founder effect of c.1938delC in *ITGB4* underlies junctional epidermolysis bullosa and its application for prenatal testing. *Exp Dermatol* 20(1):74-6.
- Natsuga K (2013) Epidermolysis Bullosa Simplex. In: Naoki Oiso I, editor. *Current Genetics in Dermatology*.
- Natsuga K (2015) Plectin-related skin diseases. *J Dermatol Sci* 77(3):139-45.
- Pasmooij AM, Pas HH, Jansen GH, Lemmink HH, Jonkman MF (2007) Localized and generalized forms of blistering in junctional epidermolysis bullosa due to *COL17A1* mutations in the Netherlands. *Br J Dermatol* 156(5):861-70.
- Pfindner E, Uitto J (2005) Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Invest Dermatol* 124(1):111-5.
- Porter RM, Lane EB (2003) Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function. *Trends Genet* 19(5):278-85.
- Rezniczek GA, Walko G, Wiche G (2010) Plectin gene defects lead to various forms of epidermolysis bullosa simplex. *Dermatol Clin* 28(1):33-41.
- Saeidian AH, Youssefian L, Moreno Trevino MG, Fortuna G, Vahidnezhad H, Atanasova VS, Uitto J, Salas-Alanis JC, South AP (2018) Seven novel *COL7A1* mutations identified in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa from Mexico. *Clin Exp Dermatol* 43(5):579-584.
- Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE (1986) Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 103(4):1577-86.
- Sakuntabhai A, Hammami-Hauasli N, Bodemer C, Rochat A, Prost C, Barrandon Y, de Prost Y, Lathrop M, Wojnarowska F, Bruckner-Tuderman L et al. (1998) Deletions within *COL7A1* exons distant from consensus splice sites alter splicing and produce shortened polypeptides in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* 63(3):737-48.
- Sawamura D, Goto M, Yasukawa K, Sato-Matsumura K, Nakamura H, Ito K, Tomita Y, Shimizu H (2005) Genetic studies of 20 Japanese families of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Hum Genet* 50(10):543-6.
- Schneider H, Muhle C, Pacho F (2007) Biological function of laminin-5 and pathogenic impact of its deficiency. *Eur J Cell Biol* 86(11-12):701-17.
- Schwieger-Briel A, Weibel L, Chmel N, Leppert J, Kernland-Lang K, Gruninger G, Has C (2015) A *COL7A1* variant leading to in-frame skipping of exon 15 attenuates disease severity in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* 173(5):1308-11.



- Schwieger-Briel A, Fuentes I, Castiglia D, Barbato A, Greutmann M, Leppert J, Duchatelet S, Hovnanian A, Burattini S, Yubero MJ et al. (2019) Epidermolysis Bullosa Simplex with KLHL24 Mutations Is Associated with Dilated Cardiomyopathy. *J Invest Dermatol* 139(1):244-249.
- Segre JA (2006) Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest* 116(5):1150-8.
- Smith SZ, Cram DL (1978) A mechanobullous disease of the newborn. Bart's syndrome. *Arch Dermatol* 114(1):81-4.
- Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, Daams H, van der Raaij-Helmer LM, Falcioni R, Kennel SJ, Aplin JD, Baker J, Loizidou M et al. (1991) Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol* 113(4):907-17.
- Stawczyk-Macieja M, Wertheim-Tysarowska K, Jakubowski R, Szczerkowska-Dobosz A, Krygier M, Wilkowska A, Sawicka J, Nowak W, Bal J, Nowicki R (2019) A novel de novo mutation p.Ala428Asp in *KRT5* gene as a cause of localized epidermolysis bullosa simplex. *Exp Dermatol* 28(10):1131-1134.
- Terracina M, Posteraro P, Schubert M, Sonogo G, Atzori F, Zambruno G, Bruckner-Tuderman L, Castiglia D (1998) Compound heterozygosity for a recessive glycine substitution and a splice site mutation in the *COL7A1* gene causes an unusually mild form of localized recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 111(5):744-50.
- Toyonaga E, Nishie W, Komine M, Murata S, Shinkuma S, Natsuga K, Nakamura H, Ohtsuki M, Shimizu H (2015) Skipped exon in *COL7A1* determines the clinical phenotypes of dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* 172(4):1141-4.
- Turcan I, Pasmooij AM, van den Akker PC, Lemmink H, Halmos GB, Sinke RJ, Jonkman MF (2016) Heterozygosity for a Novel Missense Mutation in the *ITGB4* Gene Associated With Autosomal Dominant Epidermolysis Bullosa. *JAMA Dermatol* 152(5):558-62.
- Turczynski S, Titeux M, Pironon N, Hovnanian A (2012) Antisense-mediated exon skipping to reframe transcripts. *Methods Mol Biol* 867:221-38.
- Turczynski S, Titeux M, Tonasso L, Decha A, Ishida-Yamamoto A, Hovnanian A (2016) Targeted Exon Skipping Restores Type VII Collagen Expression and Anchoring Fibril Formation in an In Vivo RDEB Model. *J Invest Dermatol* 136(12):2387-2395.
- Uitto J, Christiano AM (1992) Molecular genetics of the cutaneous basement membrane zone. Perspectives on epidermolysis bullosa and other blistering skin diseases. *J Clin Invest* 90(3):687-92.
- Vahidnezhad H, Youssefian L, Saeidian AH, Touati A, Sotoudeh S, Abiri M, Barzegar M, Aghazadeh N, Mahmoudi H, Norouz-Zadeh S et al. (2017a) Multigene Next-Generation Sequencing Panel Identifies Pathogenic Variants in Patients with Unknown Subtype of Epidermolysis Bullosa: Subclassification with Prognostic Implications. *J Invest Dermatol* 137(12):2649-2652.
- Vahidnezhad H, Youssefian L, Zeinali S, Saeidian AH, Sotoudeh S, Mozafari N, Abiri M, Kajbafzadeh AM, Barzegar M, Ertel A et al. (2017b) Dystrophic Epidermolysis Bullosa: *COL7A1* Mutation Landscape in a Multi-Ethnic Cohort of 152 Extended Families with High Degree of Customary Consanguineous Marriages. *J Invest Dermatol* 137(3):660-669.

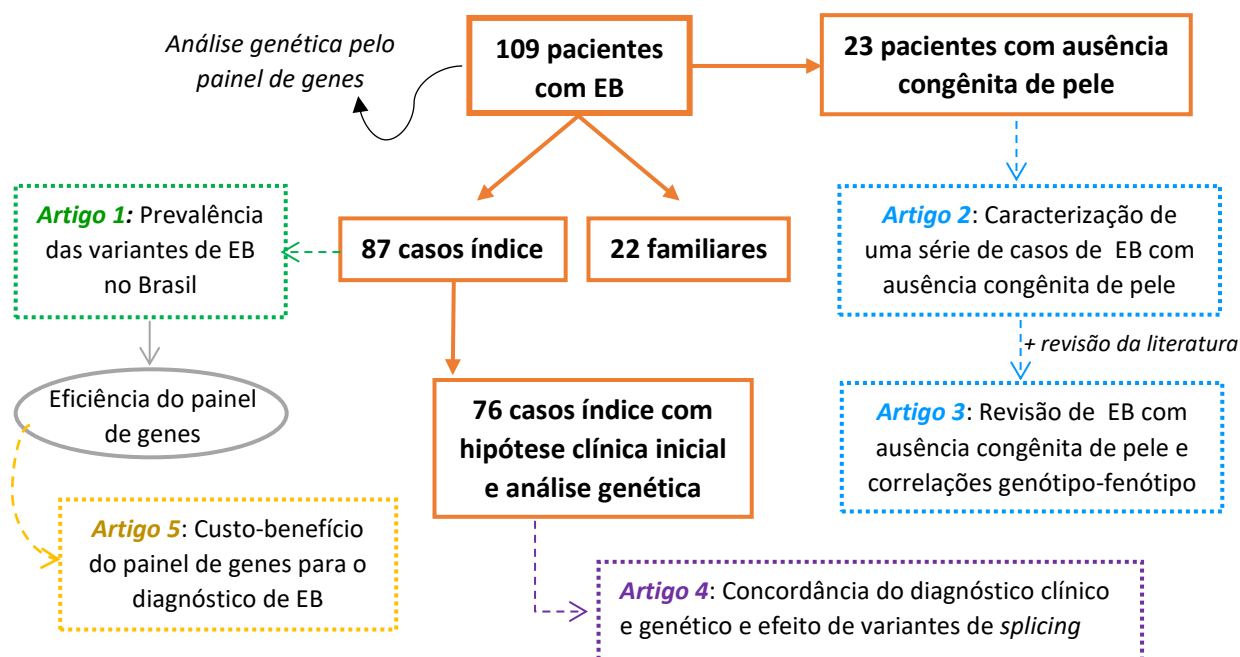
- Vahidnezhad H, Youssefian L, Saeidian AH, Uitto J (2019a) Phenotypic Spectrum of Epidermolysis Bullosa: The Paradigm of Syndromic versus Non-Syndromic Skin Fragility Disorders. *J Invest Dermatol* 139(3):522-527.
- Vahidnezhad H, Youssefian L, Saeidian AH, Touati A, Pajouhanfar S, Baghdadi T, Shadmehri AA, Giunta C, Kraenzlin M, Syx D et al. (2019b) Mutations in PLOD3, encoding lysyl hydroxylase 3, cause a complex connective tissue disorder including recessive dystrophic epidermolysis bullosa-like blistering phenotype with abnormal anchoring fibrils and type VII collagen deficiency. *Matrix Biol* 81:91-106.
- Van Agtmael T, Bruckner-Tuderman L (2010) Basement membranes and human disease. *Cell Tissue Res* 339(1):167-88.
- van den Akker PC, van Essen AJ, Kraak MM, Meijer R, Nijenhuis M, Meijer G, Hofstra RM, Pas HH, Scheffer H, Jonkman MF (2009) Long-term follow-up of patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa in the Netherlands: expansion of the mutation database and unusual phenotype-genotype correlations. *J Dermatol Sci* 56(1):9-18.
- van den Akker PC, Mellerio JE, Martinez AE, Liu L, Meijer R, Dopping-Hepenstal PJ, van Essen AJ, Scheffer H, Hofstra RM, McGrath JA et al. (2011) The inversa type of recessive dystrophic epidermolysis bullosa is caused by specific arginine and glycine substitutions in type VII collagen. *J Med Genet* 48(3):160-7.
- Varki R, Sadowski S, Pfindner E, Uitto J (2006) Epidermolysis bullosa. I. Molecular genetics of the junctional and hemidesmosomal variants. *J Med Genet* 43(8):641-52.
- Varki R, Sadowski S, Uitto J, Pfindner E (2007) Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. *J Med Genet* 44(3):181-92.
- Villone D, Fritsch A, Koch M, Bruckner-Tuderman L, Hansen U, Bruckner P (2008) Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *J Biol Chem* 283(36):24506-13.
- Whitlock NV, Ashton GH, Mohammedi R, Mellerio JE, Mathew CG, Abbs SJ, Eady RA, McGrath JA (1999) Comparative mutation detection screening of the type VII collagen gene (*COL7A1*) using the protein truncation test, fluorescent chemical cleavage of mismatch, and conformation sensitive gel electrophoresis. *J Invest Dermatol* 113(4):673-86.
- Winter L, Wiche G (2013) The many faces of plectin and plectinopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 125(1):77-93.
- Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK (2016) The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol* 25(2):92-8.
- Woodley DT, Cogan J, Hou Y, Lyu C, Marinkovich MP, Keene D, Chen M (2017) Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J Clin Invest* 127(8):3028-3038.
- Yancey KB, Hintner H (2010) Non-herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin* 28(1):67-77.
- Yenamandra VK, Vellarikkal SK, Kumar M, Chowdhury MR, Jayarajan R, Verma A, Scaria V, Sivasubbu S, Ray SB, Dinda AK et al. (2017) Application of whole exome sequencing in elucidating the phenotype and genotype spectrum of junctional epidermolysis bullosa: A preliminary experience of a tertiary care centre in India. *J Dermatol Sci* 86(1):30-36.

- Yenamandra VK, van den Akker PC, Lemmink HH, Jan SZ, Diercks GFH, Vermeer M, van den Berg MP, van der Meer P, Pasmooij AMG, Sinke RJ et al. (2018a) Cardiomyopathy in patients with epidermolysis bullosa simplex with mutations in KLHL24. *Br J Dermatol* 179(5):1181-1183.
- Yenamandra VK, Vellarikkal SK, Chowdhury MR, Jayarajan R, Verma A, Scaria V, Sivasubbu S, Ray SB, Dinda AK, Kabra M et al. (2018b) Genotype-Phenotype Correlations of Dystrophic Epidermolysis Bullosa in India: Experience from a Tertiary Care Centre. *Acta Derm Venereol* 98(9):873-879.
- Yiasemides E, Walton J, Marr P, Villanueva EV, Murrell DF (2006) A comparative study between transmission electron microscopy and immunofluorescence mapping in the diagnosis of epidermolysis bullosa. *Am J Dermatopathol* 28(5):387-94.
- Youssefian L, Vahidnezhad H, Barzegar M, Li Q, Sotoudeh S, Yazdanfar A, Ehsani AH, Kajbafzadeh AM, Mozafari N, Ebrahimi Daryani N et al. (2015) The Kindler syndrome: a spectrum of *FERMT1* mutations in Iranian families. *J Invest Dermatol* 135(5):1447-1450.
- Youssefian L, Vahidnezhad H, Uitto J (2016) [Updated 2016 Dec 1] Kindler Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK349072/>
- Yuen WY, Lemmink HH, van Dijk-Bos KK, Sinke RJ, Jonkman MF (2011) Herlitz junctional epidermolysis bullosa: diagnostic features, mutational profile, incidence and population carrier frequency in the Netherlands. *Br J Dermatol* 165(6):1314-22.

## **CAPÍTULO XIII - APÊNDICES**

---

## APÊNDICE 1 – Representação Esquemática das Amostras Incluídas nos Estudos



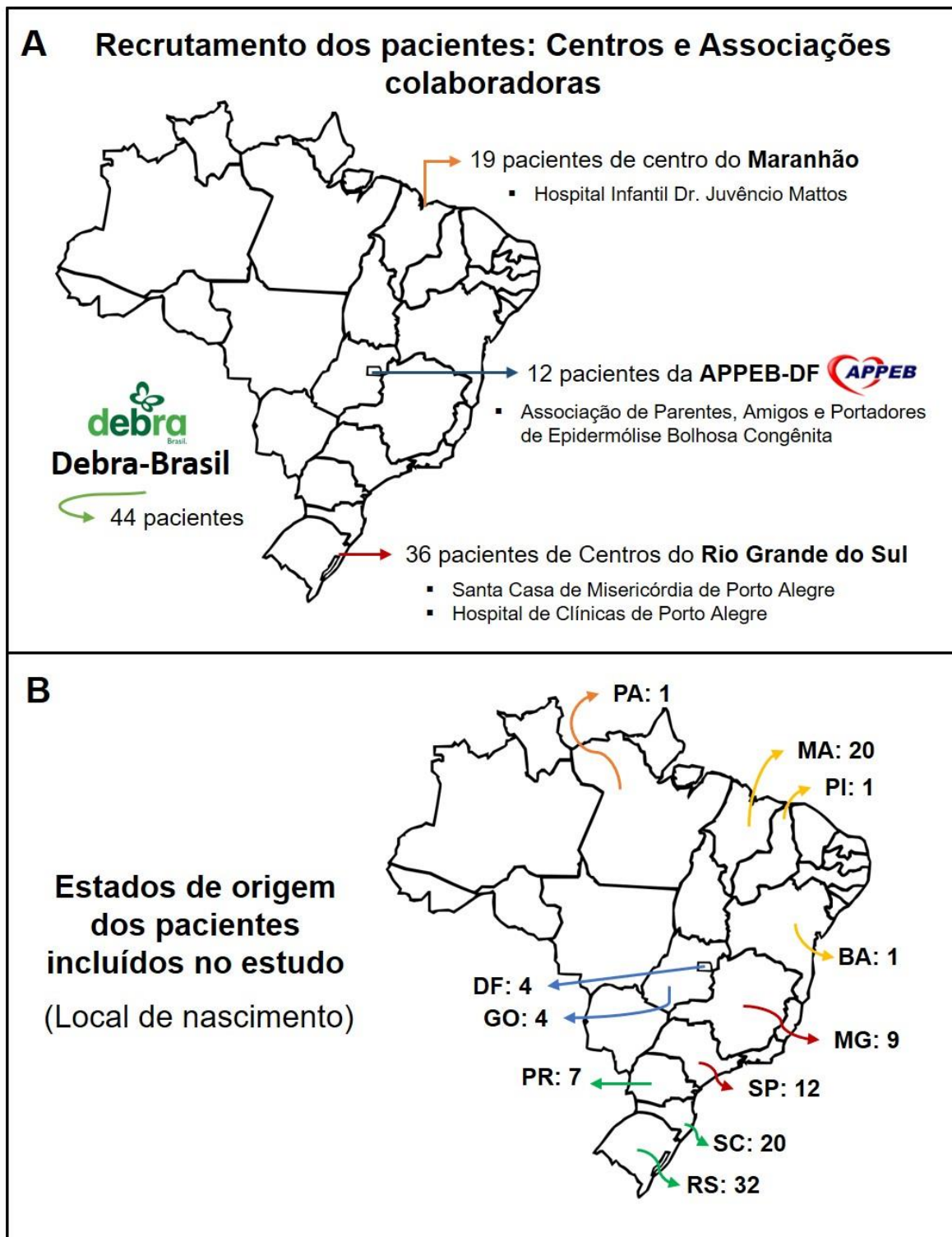
### Esquema da distribuição da amostra de pacientes com epidermólise bolhosa (EB) nos estudos realizados no presente projeto.

Um total de 109 pacientes com EB foram incluídos na análise pelo painel de genes, sendo 87 casos índice e outros 22 familiares afetados.

O estudo 1 teve como objetivo caracterizar e analisar a prevalência das variantes patogênicas da EB no Brasil e, por isso, apenas os casos índice foram incluídos. O estudo 2 descreveu as características clínicas e genéticas de 23 pacientes com EB e ausência congênita de pele identificados na amostra. No estudo 3 foi realizada uma revisão de literatura e a investigação de potenciais correlações genótipo-fenótipo para essa condição.

O estudo 4, ainda em preparação, tem como objetivo investigar a concordância entre a avaliação clínica inicial e o resultado genético e estudar as variantes de *splicing* associadas aos fenótipos leves da doença. Foram incluídos 76 dos 87 casos índice, uma vez que pacientes sem hipótese clínica prévia ou sem o diagnóstico molecular foram excluídos da análise. O estudo 5 surgiu a partir da observação da alta eficiência do painel de genes (demonstrada no estudo 1) e objetivou comparar o custo-benefício do painel de genes para o diagnóstico de EB em relação aos outros métodos de diagnóstico.

**APÊNDICE 2 – Representação Esquemática dos Centros Colaborativos e dos Locais de Origem dos Pacientes Incluídos no Estudo**



(A) Representação dos centros participantes do estudo. O número de pacientes recrutados a partir dos centros médicos ou das associações de pacientes está indicado. A partir da Debra-Brasil foram recrutados pacientes de diversas regiões. (B) Representação dos locais de origem dos pacientes considerando-se o local de nascimento. Os números se referem ao número de pacientes aqui estudados provenientes dos diferentes estados do Brasil.

## **CAPÍTULO XIV – ANEXOS**

---



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Investigação Molecular de Indivíduos com Epidermólise Bolhosa

**Pesquisador:** LAVINIA SCHULER FACCINI

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 2

**CAAE:** 59157016.6.0000.5347

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.956.299

#### **Apresentação do Projeto:**

O projeto visa a fazer a análise, por sequenciamento de nova geração, dos genes causadores de Epidermólise Bolhosa. A presente análise corresponde ao retorno das primeiras diligências. Os pesquisadores responderam de forma satisfatória às mesmas, e o projeto tem condições de ser aprovado.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Investigar os genes causadores, e suas variantes patogênicas, de Epidermólise Bolhosa, em indivíduos afetados por esta doença. Para tanto, será necessária a coleta de sangue de uma amostra desses indivíduos, os quais serão recrutados no Serviço de Dermatologia do Hospital Santa Casa de Porto Alegre ou por contato com dermatologistas de outros centros.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Estão descritos de forma adequada no projeto.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante também do ponto de vista assistencial.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os TCLEs foram adequados às normas atuais, assim como o HCPA foi incluído como instituição

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3738

**Fax:** (51)3308-4085

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br





Continuação do Parecer: 1.956.299

co-partícipe.

**Recomendações:**

Projeto em condições de ser aprovado.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto em condições de ser aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_716598.pdf	23/01/2017 16:26:27		Aceito
Outros	Respostas_Pendencias_Parecer_CEP_EB.pdf	23/01/2017 16:26:04	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Crianca_modificado.pdf	23/01/2017 13:24:22	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adulto_modificado.pdf	23/01/2017 13:23:11	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_EB_PB_modificado.pdf	23/01/2017 13:21:57	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
Outros	COMPESQ_Proj_31608.pdf	25/08/2016 13:05:52	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
Folha de Rosto	Lavinia_Schuler_Faccini.pdf	16/08/2016 09:37:39	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3738

**Fax:** (51)3308-4085

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE  
PESQUISA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer: 1.956.299

PORTO ALEGRE, 09 de Março de 2017

---

**Assinado por:**  
**José Artur Bogo Chies**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3738

**Fax:** (51)3308-4085

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** Investigação Molecular de Indivíduos com Epidermólise Bolhosa

**Pesquisador:** LAVINIA SCHULER FACCINI

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 3

**CAAE:** 59157016.6.0000.5347

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.481.885

**Apresentação do Projeto:**

Está sendo solicitada emenda a projeto aprovado por este CEP em 09 de marco de 2017. O projeto foi aprovado como tendo a UFRGS como centro coordenador, e a UFCSPA como co-participe.

**Objetivo da Pesquisa:**

Caracterizar do ponto de vista genético indivíduos com epidermólise bolhosa. A emenda visa a solicitar aumento do tamanho amostral (de 70 para 120), e a incluir dois pesquisadores (um medico geneticista e uma medica dermatologista) na equipe de pesquisa.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

adequados

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

adequados

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foi encaminhada para analise somente a folha da CONEP, na qual a justificativa para a emenda é apresentada, assim como o nome dos novos pesquisadores.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

APROVADO.

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

**Bairro:** Farroupilha

**CEP:** 90.040-060

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3308-3738

**Fax:** (51)3308-4085

**E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 2.481.885

**Considerações Finais a critério do CEP:**

APROVADO.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1005066_E1.pdf	05/12/2017 13:51:27		Aceito
Outros	Respostas_Pendencias_Parecer_CEP_EB.pdf	23/01/2017 16:26:04	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Crianca_modificado.pdf	23/01/2017 13:24:22	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Adulto_modificado.pdf	23/01/2017 13:23:11	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_EB_PB_modificado.pdf	23/01/2017 13:21:57	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
Outros	COMPESQ_Proj_31608.pdf	25/08/2016 13:05:52	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito
Folha de Rosto	Lavinia_Schuler_Faccini.pdf	16/08/2016 09:37:39	Luiza Monteavaro Mariath	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 01 de Fevereiro de 2018

---

**Assinado por:**  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Título do Projeto: Investigação Molecular de Pacientes com Epidermólise Bolhosa

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é identificar e avaliar as alterações genéticas de indivíduos com Epidermólise Bolhosa. A Epidermólise Bolhosa é uma doença genética da pele caracterizada especialmente pela ocorrência de bolhas na pele. Em todo o mundo já foram identificadas mais de 1000 diferentes alterações no DNA de pacientes com essa doença. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

- Uma avaliação dermatológica será realizada para coleta de dados sobre a gestação, parto, história familiar, crescimento e desenvolvimento, e para realização de exame físico detalhado;
- Será realizada uma consulta ao seu prontuário para verificação de resultados de exames e avaliações realizadas anteriormente;
- Com a sua permissão, serão feitas fotos para comparação das características físicas com a utilização de programas de computador específicos para doenças genéticas;
- Será realizada a coleta de uma amostra de saliva, que será utilizada para análise de alterações nos genes relacionados à Epidermólise Bolhosa. No caso de impossibilidade de coleta de saliva, será realizada a coleta de amostra de sangue.

Os possíveis desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são a possível dificuldade para coleta de saliva que alguns indivíduos apresentam, o tempo para responder o questionário clínico e, no caso de coleta de amostra de sangue, o desconforto com a “picada” da agulha e possíveis hematomas (manchas roxas que podem surgir após a “picada”).

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa incluem, primeiramente, a possibilidade de ter identificada a alteração genética causadora da Epidermólise Bolhosa. Além disso, será fornecido aos pacientes e familiares participantes o aconselhamento genético, que é uma avaliação feita por um profissional especializado em genética para orientar as famílias quanto ao risco de recorrência da doença nas próximas gerações. Por fim, a participação na pesquisa

contribuirá para o aumento do conhecimento sobre a Epidermólise Bolhosa e poderá beneficiar, também, futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo a você. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você também não terá nenhum custo em relação aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

A amostra de DNA extraída ficará armazenada no Laboratório de Genética Médica da UFRGS, sob a responsabilidade dos pesquisadores, com a possibilidade de ser utilizado em estudos futuros relacionados a essa doença apenas após um novo consentimento. Tais estudos serão previamente aprovados por Comitê de Ética.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Lavínia Schüler Faccini, ou com a pesquisadora Luiza Monteavaro Mariath, telefone (51)3308-9819, ou ainda com Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, telefone (51) 3308-3738.

- ( ) Eu concordo em armazenar amostra de DNA para estudos futuros.  
 ( ) Eu NÃO concordo em armazenar amostra de DNA para estudos futuros.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do participante da pesquisa

Nome do pesquisador que aplicou o Termo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do pesquisador que aplicou o Termo

Local e Data: \_\_\_\_\_

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Responsáveis**

Título do Projeto: Investigação Molecular de Pacientes com Epidermólise Bolhosa

A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidada a participar uma pesquisa cujo objetivo é identificar e avaliar as alterações genéticas de indivíduos com Epidermólise Bolhosa. A Epidermólise Bolhosa é uma doença genética da pele caracterizada especialmente pela ocorrência de bolhas na pele. Em todo o mundo já foram identificadas mais de 1000 diferentes alterações no DNA de pacientes com essa doença. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes:

- Uma avaliação dermatológica será realizada para coleta de dados sobre a gestação, parto, história familiar, crescimento e desenvolvimento, e para realização de exame físico detalhado;
- Será realizada uma consulta ao prontuário para verificação de resultados de exames e avaliações realizadas anteriormente;
- Com a sua permissão, serão feitas fotos para comparação das características físicas com a utilização de programas de computador específicos para doenças genéticas;
- Será realizada a coleta de uma amostra de saliva, que será utilizada para análise de alterações nos genes relacionados à Epidermólise Bolhosa. No caso de impossibilidade de coleta de saliva, será realizada a coleta de amostra de sangue.

Os possíveis desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são a possível dificuldade para coleta de saliva que alguns indivíduos apresentam, o tempo para responder o questionário clínico e, no caso de coleta de amostra de sangue, o desconforto com a “picada” da agulha e possíveis hematomas (manchas roxas que podem surgir após a “picada”).

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa incluem, primeiramente, a possibilidade de ter identificada a alteração genética causadora da Epidermólise Bolhosa. Além disso, será fornecido aos pacientes e familiares participantes o aconselhamento genético, que é uma avaliação feita por um profissional especializado em genética para orientar as famílias quanto ao risco de recorrência da doença nas próximas gerações. Por fim, a participação na pesquisa contribuirá para o aumento do conhecimento sobre a Epidermólise Bolhosa e poderá beneficiar, também, futuros pacientes.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao participante da pesquisa. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo em relação aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

A amostra de DNA extraída ficará armazenada no Laboratório de Genética Médica da UFRGS, sob a responsabilidade dos pesquisadores, com a possibilidade de ser utilizado em estudos futuros relacionados a essa doença apenas após um novo consentimento. Tais estudos serão previamente aprovados por Comitê de Ética.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Lavínia Schüler Faccini, ou com a pesquisadora Luiza Monteavaro Mariath, telefone (51)3308-9819, ou ainda com Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, telefone (51) 3308-3738.

- ( ) Eu concordo em armazenar amostra de DNA para estudos futuros.  
( ) Eu NÃO concordo em armazenar amostra de DNA para estudos futuros.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante (se aplicável)

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

Nome do pesquisador que aplicou o Termo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador que aplicou o Termo

Local e Data: \_\_\_\_\_