

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**PERFIL MICROBIOLÓGICO DOS PACIENTES
DIAGNOSTICADOS COM EPIDERMÓLISE BOLHOSA
CONGÊNITA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JULIANA TOSETTO SANTIN

PORTO ALEGRE, BRASIL

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**PERFIL MICROBIOLÓGICO DOS PACIENTES
DIAGNOSTICADOS COM EPIDERMÓLISE BOLHOSA
CONGÊNITA**

JULIANA TOSETTO SANTIN

Orientadora: Prof^a. Dra. Lavínia Schüler-Faccini

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Elisa Kiszewski Bau

“A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre”

PORTO ALEGRE, BRASIL

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Tosetto Santin, Juliana
Perfil microbiológico dos pacientes diagnosticados
com epidermólise bolhosa congênita / Juliana Tosetto
Santin. -- 2019.

154 f.

Orientadora: Lavinia Schüler-Faccini.

Coorientadora: Ana Elisa Kiszewski Bau.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Epidermólise bolhosa congênita. 2.
Genodermatose. 3. Infecção. 4. Colonização bacteriana.
5. Staphylococcus aureus. I. Schüler-Faccini, Lavinia,
orient. II. Kiszewski Bau, Ana Elisa, coorient. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

28 / 02 / 2019

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof^a. Dr^a. Têmis Maria Félix
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Renan Rangel Bonamigo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo Comerlato Scotta
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

DEDICATÓRIA

Aos familiares e pacientes com Epidermólise Bolhosa Congênita.

Por me introduzirem a uma realidade até então pouco conhecida.

Por compartilharem, de maneira tão generosa, um pouco do que é conviver com a doença.

Por permitirem a construção de um conhecimento que levarei por toda a minha trajetória
profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Lavínia Schüler-Faccini, pelo incentivo e pela oportunidade de realizar este estudo.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Ana Elisa Kiszewski Bau, pela confiança, pelo incentivo, pela dedicação, pelo exemplo e por tantos ensinamentos e oportunidades.

Aos colaboradores Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo, Renata Oliveira Soares e Adriana Medianeira Rossato, pelo apoio e interesse desde o início e, acima de tudo, por terem desempenhado com maestria as análises microbiológicas desta pesquisa.

À DEBRA Brasil, em especial à sua presidente Dra. Jeanine Aparecida Frantz, por terem acreditado no potencial deste estudo e por terem contribuído ativamente para que o mesmo fosse realizado.

À APPEB-DF, em especial à Anna Carolina Ferreira da Rocha, pela colaboração.

Aos colaboradores regionais, por todo interesse e empenho despendidos.

Às queridas Amanda Z. Berticelli e Débora R. Von Saltiel, não somente por terem enfrentado os desafios da pós-graduação ao meu lado, mas, principalmente, por terem se tornado grandes amigas.

Aos meus pais, por todo o amor e exemplo dados ao longo da minha vida, por acreditarem no meu potencial e por serem sempre meus maiores incentivadores.

À minha irmã Thaís, pela companhia em todas as horas, pela torcida, por confiar tanto no meu trabalho e por comemorar comigo todas as minhas conquistas.

À minha amiga Petra, por nunca deixar de acreditar em mim, por todo o apoio e o incentivo, especialmente durante esses dois últimos anos.

À Yuki, por tanto amor e companheirismo enquanto este estudo ainda era apenas um projeto em construção.

RESUMO

Objetivos: Epidermólise Bolhosa Congênita (EBC) é um grupo heterogêneo de genodermatoses caracterizado por fragilidade da pele e mucosas que leva à formação de bolhas e erosões. Infecção é uma das principais complicações associadas à doença, e a sepse permanece como importante causa de mortalidade entre os pacientes. Nosso objetivo neste estudo foi investigar e analisar aspectos bacteriológicos de colonização dos pacientes com EBC. **Métodos:** Realizamos um estudo transversal no Departamento de Dermatologia da UFCSPA, que recrutou pacientes com EBC provenientes de diferentes regiões do país, durante um período de dois anos. Dados clínicos foram coletados através de anamnese e exame físico/dermatológico. A investigação bacteriológica foi realizada em espécimes clínicos coletados de cinco sítios corporais através de *swabs*. Presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foi confirmada por testes bioquímicos. Isolados de *S. aureus* foram adicionalmente investigados quanto à presença dos genes *nuc* e *mecA*, através da técnica de PCR, e quanto ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana, através do método disco difusão. **Resultados:** Oitenta e nove pacientes com EBC foram incluídos no estudo. *S. aureus* foi o agente mais frequentemente encontrado colonizando todos os sítios investigados, com uma prevalência geral de 51,7%. Pacientes colonizados por *S. aureus* nas narinas e no umbigo apresentaram um risco 3,4 vezes superior de também apresentar o agente nas lesões de pele. O gene *mecA*, que codifica resistência à meticilina, foi verificado em 24,7% de todos os isolados de *S. aureus* (MRSA). A frequência de colonização por MRSA entre nossos pacientes foi 15,7%. *Pseudomonas aeruginosa* foi identificada em 9% da nossa amostra. **Conclusões:** Este foi o primeiro estudo brasileiro sobre colonização microbiana em pacientes com EBC. As altas taxas de colonização pelo *S. aureus* e, em especial, pela sua variante MRSA, reforçam a necessidade de se conhecer o perfil bacteriológico dessa população

específica, para a instituição de tratamentos mais eficazes, com menor risco de cronificação de feridas e de complicações infecciosas graves.

Palavras-chave: Epidermólise Bolhosa Congênita; genodermatose; infecção; colonização; *Staphylococcus aureus*; resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Objective: Epidermolysis bullosa (EB) is a large heterogeneous group of genodermatosis characterized by skin and mucosal fragility that leads to blister and erosion formation. One of the most common complications of the disease is infection and sepsis still figures as an important cause of death among this patients. Our aim was to investigate and analyze bacteriological aspects of colonization of patients with EB in our country. **Methods:** We conducted a cross-sectional study at the Department of Dermatology from UFCSPA, recruiting patients with EB from different regions of Brazil, during a 2-year period. Clinical data was obtained through anamnesis and physical/dermatological examination. Bacteriological investigation was performed in clinical specimens collected through swabs from 5 body sites. Presence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* was confirmed by biochemical tests. *S. aureus* isolates were further submitted to *nuc* and *mecA* genes investigation by PCR assay and also to antimicrobial susceptibility analysis by disk diffusion method. **Results:** Eighty-nine patients with EB were included in our study. *S. aureus* was the most frequent agent founded colonizing all body sites, with an overall prevalence of 51.7%. Patients with *S. aureus* colonization of the anterior nares and belly button had a 3.4 times higher risk of also having skin lesions colonized by the same agent. The *mecA* gene was seen in 24.7% of all *S. aureus* isolates. Frequency of colonization by MRSA among our patients was 15.7%. *Pseudomonas aeruginosa* was identified in 9% of our sample. **Conclusions:** This was the first study on microbiological aspects of colonization of EB patients in Brazil. The high colonization rates by *S. aureus* in this population, especially by its MRSA variant, emphasize the importance of new medical approaches in order to minimize risks of wound healing delay and life-threatening infections.

Keywords: Inherited epidermolysis bullosa; genodermatosis; infection; colonization; *Staphylococcus aureus*; antimicrobial resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação esquemática das diferentes camadas da pele, demonstrando a localização de cada uma das principais proteínas-alvo envolvidas na patogênese da doença, bem como sua relação com os principais tipos de EBC.27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Subtipos clínicos da EBS e suas respectivas proteínas-alvo	28
Tabela 2 - Subtipos clínicos da EBJ, suas proteínas-alvo e os genes mutados	29
Tabela 3 - Subtipos clínicos de EBD e suas proteínas-alvo	30
Tabela 4 – Tipos de mutações conhecidas nos principais subtipos de EBC	34
Tabela 5 - Achados ultraestruturais de microscopia eletrônica nos tipos principais e subtipos selecionados de EBC	49
Tabela 6 - Alterações antigênicas encontradas em pele com EBC através da técnica de mapeamento por imunofluorescência	50

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DEBRA	<i>Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association</i>
EBC	Epidermólise Bolhosa Congênita
EBD	Epidermólise Bolhosa Congênita Distrófica
EBDD	Epidermólise Bolhosa Congênita Distrófica Dominante
EBDR	Epidermólise Bolhosa Congênita Distrófica Recessiva
EBJ	Epidermólise Bolhosa Congênita Juncional
EBS	Epidermólise Bolhosa Congênita Simples
LOC	Laringo-onico-cutânea
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
NEBR	<i>National Epidermolysis Bullosa Registry</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SK	Síndrome Kindler
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
IMM	Mapeamento antigênico por imunofluorescência ou imunomapeamento.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	DEFINIÇÃO DE EPIDERMÓLISE BOLHOSA CONGÊNITA	18
2.2	HISTÓRICO	18
2.3	EPIDEMIOLOGIA	19
2.4	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA	21
2.5	PATOGÊNESE	23
2.5.1	Aspectos anatômicos e fisiológicos da pele	24
2.5.2	Proteínas-alvo	27
2.5.2.1	Epiderme	27
2.5.2.2	Junção dermoepidérmica (zona da membrana basal)	28
2.5.2.3	Derme papilar superior	29
2.5.3	Aspectos genéticos	30
2.5.3.1	Herança	31
2.5.3.2	Genes associados	31
2.6	MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS	35
2.7	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS	41
2.8	DIAGNÓSTICO	46
2.8.1	Testes não moleculares	46
2.8.2	Testes moleculares	51
2.9	COMPLICAÇÕES CLÍNICAS	51
2.9.1	Infecção	52
2.9.2	Demais complicações	54
2.10	TRATAMENTO	60
3	JUSTIFICATIVA	67
4	OBJETIVOS	68
4.1	GERAL	68
4.2	ESPECÍFICOS	68
5	MÉTODOS	69
5.1	DELINEAMENTO	69
5.2	CONTEXTO	69
5.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA	69

5.3.1 Local	69
5.3.2 Amostra	70
5.3.3 Critérios de inclusão	71
5.3.4 Critérios de exclusão	71
5.4 COLETA DOS DADOS	71
5.4.1 Avaliação clínica	71
5.4.1.1 Anamnese	72
5.4.1.2 Exame físico geral	72
5.4.1.3 Exame dermatológico	72
5.4.2 Avaliação bacteriológica	73
5.4.2.1 Cultivo bacteriológico	73
5.4.2.2 Avaliação molecular dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	74
5.4.2.3 Análise de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	75
5.4.3 Avaliação genética	75
5.5 ASPECTOS ÉTICOS	76
6 REFERÊNCIAS	77
7 ARTIGO ORIGINAL	89
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
APÊNDICES	119
APÊNDICE A – FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS	120
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA E ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS	123
APÊNDICE C – INFORMAÇÕES DE PESQUISA E FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA COLETA E AVALIAÇÃO MOLECULAR	125
APÊNDICE D – TERMO DE CONCESSÃO PARA USO DE IMAGEM	132
APÊNDICE E – TERMO DE CONCESSÃO PARA USO DE IMAGEM	133
ANEXOS	134
ANEXO A – ARTIGO ORIGINAL	135

1 INTRODUÇÃO

A Epidermólise Bolhosa Congênita (EBC) é um grupo de desordens cutâneas geneticamente transmitidas, caracterizado por uma fragilidade mecânica da pele que leva à formação de bolhas espontâneas ou secundárias a pequenos traumas (FINE, 2010a; FINE; MELLERIO, 2015; HAS; FISCHER, 2018).

A fragilidade cutânea, principal característica da doença, decorre de mutações em genes de qualquer uma das proteínas estruturais da pele. São elas as queratinas 5 e 14, a transglutaminase 5, a laminina 332, os colágenos tipo VII e XVII, o antígeno do pênfigo bolhoso 1, a plectina, a integrina alfa-6-beta-4, a kindlina-1, e os componentes desmossomais placofilina-1, placoglobina e desmoplaquinas (FINE, 2016; FINE *et al.*, 2014; HAS; FISCHER, 2018).

A doença pode se apresentar de quatro formas clássicas, cada uma delas intimamente relacionada ao tipo de mutação genética envolvida e às suas conseqüentes alterações proteicas, podendo acometer a epiderme, a junção dermoepidérmica ou a derme superior (FINE *et al.*, 2014). Elas são denominadas Epidermólise Bolhosa Simples (EBS), Epidermólise Bolhosa Juncional (EBJ), Epidermólise Bolhosa Distrófica (EBD) e Síndrome Kindler (FINE *et al.*, 2008c; HAS; FISCHER, 2018).

Até o presente momento, mais de trinta entidades nosológicas foram descritas, todas com características genéticas e fenotípicas distintas. As subdivisões clínicas são feitas de acordo com o padrão de herança apresentado, o tipo de mutação envolvido, a análise da morfologia e distribuição das lesões, o nível de clivagem da bolha e a extensão de acometimento cutâneo e extracutâneo (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2010a; FINE *et al.*, 2008c; HAS; FISCHER, 2018).

Há escassez de dados epidemiológicos sobre a frequência da doença no Brasil. Nos Estados Unidos, estima-se uma prevalência e incidência, respectivamente, de 11.07 e 19.57 por milhão de nascidos vivos (FINE, 2016).

Com relação aos subtipos de EBC, as taxas de incidência por 1 milhão de nascidos vivos foram as seguintes: 7.87 para EBS, 2.68 para EBJ, 5.17 para EBD e 2.37 para subtipo indeterminado. Já as taxas de prevalência por 1 milhão de nascidos vivos foram 6.0 para EBS, 0.5 para EBJ, 2.9 para EBD e 1.3 para subtipo indeterminado (FINE, 2016).

Apesar de rara, a EBC representa um sério problema social devido ao grande impacto na vida dos pacientes e das suas famílias. As condições impostas pela doença são capazes de gerar sintomas físicos limitantes, com prejuízo emocional, alterações comportamentais e impasses econômicos (FINE; MELLERIO, 2009a, 2009b; MARGARI *et al.*, 2010).

O diagnóstico é clínico e laboratorial, sendo a microscopia eletrônica da biópsia cutânea e o mapeamento da membrana basal por imunofluorescência ambos considerados padrão-ouro para o diagnóstico não molecular da EBC (FINE; MELLERIO, 2015). O mapeamento da membrana basal por imunofluorescência também tem sido empregado na classificação dos diferentes tipos de EBC. A subclassificação da doença costuma ser realizada através do acompanhamento clínico (avaliação fenotípica e modo de transmissão), de imunohistoquímica ou através de técnicas de biologia molecular para a detecção de mutações específicas (FINE *et al.*, 2008c, 2014; HAS; FISCHER, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2010; PETRONIUS *et al.*, 2003; SAUNDERSON *et al.*, 2019), e é de suma importância para a sua determinação prognóstica. Através dela, é possível identificar eventuais riscos de manifestações extracutâneas graves como flictenas ou cicatrizes oculares, deformidades em pés e mãos, estenoses esofágicas ou traqueolaríngeas, complicações genitourinárias, neoplasias e mortes prematuras por causas específicas (FINE *et al.*, 2008c).

A doença está associada à elevada morbidade e isso se deve, em grande parte, à tendência a desenvolver erosões e ulcerações crônicas. Tal condição predispõe o paciente a inúmeras complicações como infecções locais e sistêmicas, atraso do crescimento e desenvolvimento e surgimento de neoplasias cutâneas malignas, entre outras (FINE, 2010a; FINE *et al.*, 2004c, 2008a, 2008b, 2008d, FINE; MELLERIO, 2009a, 2009b, 2015).

Apesar das melhorias em relação aos cuidados das lesões e da maior disponibilidade de antibióticos de amplo espectro, a sepse bacteriana permanece sendo uma das principais causas de mortalidade infantil em pacientes com EBC, sendo mais observada nas suas formas generalizadas (FINE *et al.*, 2008b; MELLERIO, 2010).

Há poucos estudos científicos acerca do perfil de colonização microbiana das lesões de pacientes com EBC. Os agentes mais comumente identificados por eles foram *Staphylococcus species*, *Streptococcus species*, *Diphtheroids*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida sp.* O uso crônico de antibióticos pelos pacientes gera a preocupação de aumentar o risco de resistência bacteriana e a dificuldade no manejo das complicações (BOEIRA *et al.*, 2013; BRANDLING-BENNETT; MOREL, 2010; FINE; MELLERIO, 2015; MELLERIO, 2010; SINGER *et al.*, 2018; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014). A elevada morbidade da doença, associada ao risco de sepse grave, torna imprescindível a identificação dos agentes colonizadores nesse tipo de paciente. A partir disso, é possível o emprego de antibioticoterapia dirigida para a cura das lesões infectadas evitando-se, assim, a cronificação das mesmas e o elevado risco de infecções sistêmicas. Nesse sentido, a presente dissertação teve como objetivo a investigação do perfil bacteriológico de colonização da pele de pacientes com diagnóstico de EBC.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DEFINIÇÃO DE EPIDERMÓLISE BOLHOSA CONGÊNITA

A Epidermólise Bolhosa Congênita é uma doença rara, transmitida de forma genética e caracterizada por diferentes níveis de fragilidade cutânea que levam ao surgimento de bolhas e demais complicações de maneira espontânea ou após traumas mínimos (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2010a; FINE; MELLERIO, 2015; HAS; FISCHER, 2018; PAI; MARINKOVICH, 2002).

2.2 HISTÓRICO

Os primeiros registros da doença datam de 1870, quando Ferdinand Von Hebra a descreveu sob o nome de *erblichen pemphigus* (FINE *et al.*, 1999). O seu nome atual foi cunhado por Koebner, em 1886. As formas simples e distrófica foram reconhecidas por Hallopeau, em 1898, enquanto a forma juncional somente foi identificada em 1935, por Herlitz, que a nomeou *EB letalis* (FINE; MELLERIO, 2015).

Pouco se sabia sobre a patogênese e a classificação da doença até que o uso da microscopia eletrônica de transmissão permitiu que Pearson, em 1962, pudesse caracterizar e classificar de forma mais precisa cada um dos 3 subtipos principais de EBC existentes na época, com base no nível ultraestrutural de clivagem das bolhas (PEARSON, 1962).

As alterações proteicas envolvidas na gênese da doença somente foram aventadas na década de 1980, após a realização de estudos com anticorpos monoclonais e policlonais, que levou ao desenvolvimento da técnica de mapeamento por imunofluorescência. Através dela,

observou-se que alguns subtipos de EBC poderiam ser identificados de acordo com as suas características antigênicas (HINTNER *et al.*, 1981 apud FINE *et al.*, 2008c).

A partir da década de 1990, iniciaram-se as pesquisas genéticas envolvendo a origem da doença. Elas levaram à descoberta da base molecular por trás de praticamente todos os subtipos reconhecidos de EBC até a atualidade, com a identificação de alterações nos genes responsáveis pela síntese das proteínas estruturais da pele (AUMAILLEY *et al.*, 2006; EPSTEIN, 1992; FINE; MELLERIO, 2015; PULKKINEN; UITTO, 1999; VARKI *et al.*, 2007).

Após o Terceiro Consenso Internacional sobre Diagnóstico e Classificação da Epidermólise Bolhosa Congênita, realizado em Viena, no ano de 2007, um quarto subtipo principal da doença foi adicionado à classificação: a Síndrome Kindler (FINE *et al.*, 2008c).

Devido ao constante e crescente número de descobertas, um grupo de *experts* mundiais se reuniu novamente em Londres, em junho de 2013, no intuito de revisar todos os dados obtidos até aquele momento sobre a doença. Durante essa, que ficou conhecida como a quarta reunião internacional, foram analisados e reformulados os termos e regras para a subclassificação adequada dos pacientes, mantendo-se o foco na origem molecular de cada subtipo, sempre que possível (FINE *et al.*, 2014).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

As estimativas para incidência e prevalência da EBC em nível mundial têm sido calculadas por técnicas bastante variadas dentre as diferentes populações, conferindo elevada heterogeneidade de publicações (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2016). Os estudos mais rigorosos e melhor delineados foram realizados com base nos registros do *National*

Epidermolysis Bullosa Registry, nos Estados Unidos, gerando resultados mais confiáveis (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2010b).

Seus dados mais atuais derivam de um estudo transversal e longitudinal prospectivo onde foram recrutados 3271 pacientes com diagnóstico de EBC, entre os anos de 1986 e 2002, com auxílio de instrumento desenvolvido pelo *National Institutes of Health*. Segundo os autores, durante os 16 anos de pesquisa, houve um aumento na prevalência de EBC de 8,22 para 11,07 por milhão de nascidos vivos, enquanto a incidência se manteve inalterada (19,6 *versus* 19,57 casos por 1 milhão de nascidos vivos) (FINE, 2016).

Além de apresentar dados americanos, tal estudo ainda comparou seus resultados com achados de outros estudos internacionais. Verificaram-se taxas de incidência e prevalência por milhão de nascidos vivos, respectivamente, de locais como Columbia Britânica (17,9 e 9,9), Itália (20,1 e 10,1), Romênia (25 e 4,4) e Japão (3,8 e 5,6-7,8). Algumas pesquisas apenas apresentaram taxas de prevalência, como a australiana (10,3), a croata (9,6), a escocesa (49,0), a norueguesa (54), a sul-africana (2,82) e uma segunda italiana (15,4) (FINE, 2016).

Com relação aos subtipos de EBC, as taxas de incidência por 1 milhão de nascidos vivos nos Estados Unidos foram as seguintes: 7,87 para EBS, 2,68 para EBJ, 5,17 para EBD e 2,37 para subtipo indeterminado. Já as taxas de prevalência por 1 milhão de nascidos vivos foram 6,0 para EBS, 0,5 para EBJ, 2,9 para EBD e 1,3 para subtipo indeterminado (FINE, 2016).

Em oposição ao que foi publicado anteriormente de que os achados norte-americanos poderiam reproduzir fielmente as estimativas de incidência e prevalência da EBC ao redor do mundo (FINE, 2010b), o estudo mais recente mostrou que, muito embora alguns dados sejam semelhantes aos de outras pesquisas internacionais (CASTORI *et al.*, 2008; INABA *et al.*, 1989; KHO *et al.*, 2010; PAVICIC *et al.*, 1990; TADINI *et al.*, 2005), também foram detectados dados muito discordantes com relação à prevalência e incidência de alguns

subtipos de EBC em determinadas populações (DĂNESCU *et al.*, 2015; HORN *et al.*, 1997; MCKENNA; WALSH; BINGHAM, 1992; SHINKUMA *et al.*, 2010; YUEN *et al.*, 2011). Assim sendo, é importante ressaltar que tais dados não devem ser generalizados (FINE, 2016).

Embora algumas teorias ainda não passem de especulação, uma possível explicação para algumas das diferenças epidemiológicas encontradas, especialmente no que diz respeito à subclassificação da EBC, é a influência de fatores geográficos (pequenas populações restritas a determinadas áreas), étnicos, religiosos, genéticos (frequência de mutações genéticas transmitidas) e consanguinidade (ABAHUSSEIN *et al.*, 1993; ABU SA'D *et al.*, 2006; FINE, 2016; NAKANO *et al.*, 2002).

Até o presente momento, há escassez de dados epidemiológicos acerca da doença no Brasil. Não há registros nacionais publicados sobre incidência ou prevalência da EBC. Recente estudo brasileiro para tradução, adaptação e validação de instrumento que avalia qualidade de vida (QoL) em pacientes com EBC publicou que, de um total de 57 pacientes, sendo 40 crianças e 17 adultos, 12 foram classificados como portadores da forma simples, 43 como distróficos e 2 como juncionais (CESTARI *et al.*, 2016).

2.4 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

Após o último Consenso Internacional sobre Diagnóstico e Classificação da EBC, realizado em Londres, no ano de 2013, uma nova abordagem para a classificação da doença foi introduzida. Denominada “*onion skinning*”, ela leva em consideração o tipo principal de EBC presente (com base na identificação do nível de clivagem da pele), características fenotípicas (como distribuição e gravidade da atividade da doença, manifestações extracutâneas específicas, entre outros), modo de herança, proteína ultraestrutural envolvida e

sua expressão na pele, gene envolvido e tipo de mutação presente (quando possível, ainda leva-se em consideração as mutações específicas identificadas e suas localizações) (FINE *et al.*, 2014; HAS; FISCHER, 2018).

Apesar de simples, essa nova proposta de classificação demonstra ser de extrema relevância, pois vem padronizar a nomenclatura e a subclassificação da EBC, considerando os recentes avanços e descobertas que possibilitaram um maior entendimento da doença, tanto ao nível molecular quanto clínico (FINE *et al.*, 2014).

Esquemáticamente, a abordagem pode ser resumida nos seguintes passos sequenciais: tipo principal de EBC → fenótipo (distribuição das lesões e gravidade) → modo de transmissão → sítio ultraestrutural de clivagem → proteínas envolvidas (com ou sem achados de mapeamento por imunofluorescência) → gene envolvido → mutação específica presente. Em situações clínicas onde o tipo de mutação específica já tiver sido identificado previamente, uma forma resumida do esquema poderá ser utilizada (FINE *et al.*, 2014).

O novo esquema proposto mantém como primeira divisão importante os quatro tipos principais de EBC já conhecidos: epidermólise bolhosa simples (EBS), epidermólise bolhosa juncional (EBJ), epidermólise bolhosa distrófica (EBD) e Síndrome Kindler (SK). A subclassificação, por sua vez, sofreu modificação de nomenclaturas e também adição de novos subtipos antes não classificados dessa forma (FINE *et al.*, 2014; HAS; FISCHER, 2018).

O primeiro tipo principal de EBC, a EBS, hoje pode ser subdividido em suprabasal e basal, cada um deles com uma série de novos subtipos. Correspondem aos subtipos suprabasais da EBS: *Peeling skin syndrome* acral, EBS superficial, EBS acantolítica e as síndromes de fragilidade cutânea por deficiência de desmoplaquina (EBS-desmoplaquina), de placoglobina (EBS-placoglobina) e placofilina (EBS-placofilina). Os subtipos basais da EBS são a EBS localizada, a EBS generalizada grave, a EBS generalizada intermediária, a EBS

com pigmentação mosqueada, a EBS circinada migratória, a EBS autossômica recessiva K14, a EBS com distrofia muscular, a EBS com atresia pilórica, a EBS Onga, a EBS autossômica recessiva por deficiência do PB 230 e EBS autossômica recessiva por deficiência de exofilina-5 (FINE *et al.*, 2014; FINE; MELLERIO, 2015).

A EBJ, segundo tipo principal de EBC, pode ser dividida inicialmente em formas generalizadas e localizadas. São formas generalizadas da EBJ a EBJ generalizada grave, a EBJ generalizada intermediária, a EBJ generalizada com atresia pilórica, EBJ generalizada de início tardio e a EBJ generalizada com envolvimento renal e respiratório. São formas localizadas da doença a EBJ localizada, a EBJ inversa e a Síndrome laringo-onico-cutânea (LOC) (FINE *et al.*, 2014; FINE; MELLERIO, 2015).

O terceiro tipo principal da doença, a EBD, pode ser dividido inicialmente em formas dominantes (EBDD) ou recessivas (EBDR). São formas dominantes da EBD: a EBDD generalizada, a EBDD acral, a EBDD pré-tibial, a EBDD pruriginosa, a EBDD apenas unhas e a EBDD dermólise bolhosa do recém-nascido. São formas recessivas da doença: a EBDR generalizada grave, a EBDR generalizada intermediária, a EBDR inversa, a EBDR localizada, a EBDR pré-tibial, a EBDR pruriginosa, a EBDR centrípeta e a EBDR dermólise bolhosa do recém-nascido (FINE *et al.*, 2014; FINE; MELLERIO, 2015).

A Síndrome Kindler, quarto tipo principal da EBC, não possui subclassificação até o presente momento (FINE *et al.*, 2014; FINE; MELLERIO, 2015).

2.5 PATOGÊNESE

A epidermólise bolhosa congênita é considerada o protótipo das doenças mecano-bolhosas. Os diferentes níveis de fragilidade cutânea, responsáveis pelo surgimento das bolhas e demais complicações associadas, decorrem de mutações nos genes que codificam as

proteínas ultraestruturais da pele e mucosas, tornando-as reduzidas ou até mesmo ausentes (FINE; MELLERIO, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O local em que cada uma dessas proteínas reside (epiderme, junção dermoepidérmica ou derme papilar superior) determina o nível ultraestrutural de clivagem das bolhas e, conseqüentemente, as manifestações clínicas de cada tipo principal e subtipo da doença (FINE; MELLERIO, 2015).

Nesse sentido, a identificação dos genes e das proteínas envolvidas foi de suma importância para o entendimento da doença, para o seu diagnóstico e também para a sua classificação. Pode-se afirmar, em outras palavras, que a gravidade clínica e as demais características fenotípicas estão intimamente associadas ao genótipo (FINE; MELLERIO, 2015).

2.5.1 Aspectos anatômicos e fisiológicos da pele

Para um melhor entendimento a respeito da patogênese e das conseqüentes manifestações clínicas da epidermólise bolhosa congênita, são necessárias algumas noções básicas sobre a anatomia da pele humana.

A principal função da pele é a de manter um ambiente interno que permita ao organismo proteger o seu DNA e reproduzi-lo da maneira mais fidedigna possível (VANDERGRIF; BERGSTRESSER, 2015).

A pele pode ser dividida, inicialmente, em duas camadas principais: a epiderme e a derme. O limite entre elas consiste em um agregado especializado de moléculas de adesão, coletivamente conhecidas como membrana basal (junção dermoepidérmica) (BURGESON; CHRISTIANO, 1997; VANDERGRIF; BERGSTRESSER, 2015).

A epiderme é a camada mais externa da pele. Ela consiste em um epitélio multiestratificado, composto basicamente por três populações principais de células: queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans. A sua principal função é estabelecer uma barreira entre o organismo e o meio externo, no intuito de protegê-lo contra substâncias tóxicas e de evitar a perda de água (FUCHS, 1998; ROGNONI; WATT, 2018; VANDERGRIFF; BERGSTRESSER, 2015).

Essa barreira é resultado de um complexo mecanismo de renovação e diferenciação celular terminal, que se inicia com a proliferação da progênie das células epidérmicas, ainda camada basal, e promove uma série de alterações moleculares e bioquímicas conforme elas ascendem para a superfície. Todo esse processo resulta na formação dos diferentes estratos epidérmicos (basal, espinhoso, granular e córneo) (ARIN *et al.*, 2015; ROGNONI; WATT, 2018).

A derme, camada mais interna da pele, é composta por um gel de mucopolissacarídeos que é sustentado por uma matriz fibrosa contendo colágeno e elastina. Rica em estruturas vasculares, ela é responsável por fornecer nutrientes e permitir a circulação de alguns tipos celulares. A presença de fibras nervosas é capaz de proporcionar as sensações cutâneas. Além desses, outros três tipos celulares residem na derme: mastócitos, fibroblastos, macrófagos e células dendríticas dérmicas (VANDERGRIFF; BERGSTRESSER, 2015).

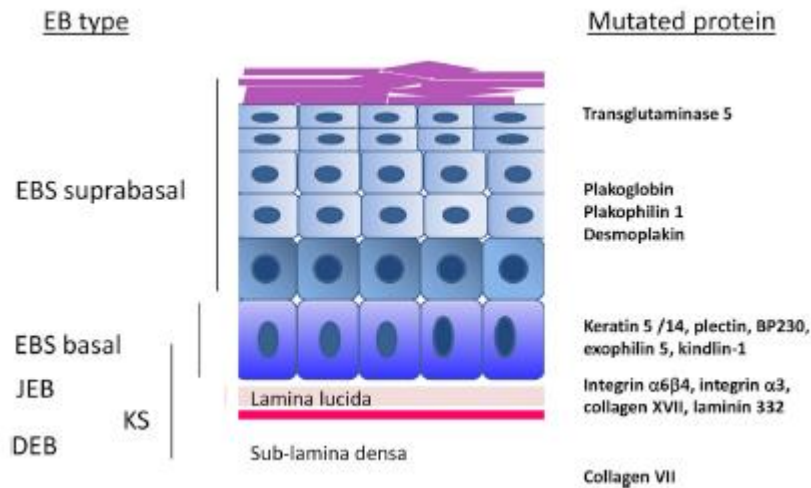
A junção dermoepidérmica, também conhecida como zona da membrana basal, como já diz sua nomenclatura, localiza-se entre as duas camadas principais descritas cima. De maneira ultraestrutural, ela pode ser dividida em quatro zonas descritivas. A primeira delas é composta pelas membranas celulares dos queratinócitos basais, que contém hemidesmossomos nos quais as citoqueratinas epiteliais se inserem. A segunda é denominada lâmina lúcida, uma região contendo filamentos de ancoragem e somente vista na microscopia eletrônica. A terceira é a lâmina densa, que recebeu este nome devido ao seu aspecto elétron-

denso na microscopia eletrônica. Por fim, a quarta zona corresponde a uma área sub-basal que também contém fibrilas de ancoragem (BURGESON; CHRISTIANO, 1997).

O conjunto de moléculas nela presentes proporciona não somente a adesão entre os queratinócitos basais e a derme, mas também uma interface dinâmica de trocas entre eles. Além de conferir resistência contra forças de cisalhamento, a junção dermoepidérmica também controla o trânsito de moléculas entre a epiderme e a derme e influencia o comportamento dos queratinócitos através da modulação da polaridade celular, da proliferação, da migração e da diferenciação. Ela ainda possui papel importante durante a morfogênese e o desenvolvimento, cicatrização de lesões e remodelamento cutâneo (BURGESON; CHRISTIANO, 1997; KOSTER *et al.*, 2015; VANDERGRIFF; BERGSTRESSER, 2015).

Conforme mencionado anteriormente, cada tipo e subtipo de EBC está intimamente associado à alteração de uma proteína estrutural específica da pele, que pode estar localizada em qualquer uma das suas três estruturas principais: epiderme, junção dermoepidérmica ou derme. O local da sua residência, portanto, é que vai definir o nível de clivagem das bolhas (FINE; MELLERIO, 2015). Nesse sentido, a figura 1 é muito elucidativa, mostrando as diferentes camadas da pele e relacionando-as com as principais proteínas encontradas e com os subtipos da doença.

Figura 1- Representação esquemática das diferentes camadas da pele, demonstrando a localização de cada uma das principais proteínas-alvo envolvidas na patogênese da doença, bem como sua relação com os principais tipos de EBC



Fonte: Fine *et al.* (2014)

2.5.2 Proteínas-alvo

2.5.2.1 Epiderme

Alterações provocadas nas proteínas estruturais localizadas na epiderme levam ao desenvolvimento do tipo simples da EBC, que possui nível de clivagem intraepidérmico. Tais estruturas podem residir em nível suprabasal ou basal (FINE; MELLERIO, 2015).

As proteínas que residem em nível suprabasal são a transglutaminase-5, a desmoplaquina, a placoglobina e a placofilina-1. Já as proteínas de nível basal são as citoqueratinas 5 e 14, a plectina, a integrina alfa-6-beta-4, o antígeno do penfigóide bolhoso tipo 1 e a exofilina-5 (FINE *et al.*, 2014).

A relação entre tais proteínas e o subtipo clínico decorrente das suas alterações pode ser verificada na tabela 1:

Tabela 1 - Subtipos clínicos da EBS e suas respectivas proteínas-alvo

EBS	Tipo Principal	Subtipos EBS	Proteínas-alvo
	Suprabasal	<i>Peeling skin syndrome</i> acral EBS superficial EBS acantolítica	Transglutaminase 5 Desconhecida Desmoplaquina, placoglobina
		Síndromes de fragilidade cutânea - Deficiência de desmoplaquina - Deficiência de placoglobina - Deficiência de placofilina	Desmoplaquina Placoglobina Placofilina 1
	Basal	EBS localizada EBS generalizada grave EBS generalizada intermediária EBS com pigmentação mosqueada EBS circinada migratória EBS autossômica recessiva K14 EBS com distrofia muscular EBS com atresia pilórica	K5; K14 K5; K14 K5; K14 K5 K5 K14 Plectina Plectina; Integrina alfa-6-beta-4
		EBS Onga EBS autossômica recessiva – deficiência de PB 230 EBS autossômica recessiva – deficiência de exofilina 5	Plectina Antígeno do penfigóide bolhoso 1 (PB 230) Exofilina 5

PB 230: Antígeno do penfigóide bolhoso 1; EBS: Epidermólise bolhosa simples.
Fonte: Adaptado de Fine *et al.* (2014)

2.5.2.2 Junção dermoepidérmica (zona da membrana basal)

Alterações nas proteínas localizadas na junção dermoepidérmica, mais precisamente no nível da lâmina lúcida, são responsáveis pela forma juncional da epidermólise bolhosa congênita (FINE; MELLERIO, 2015). São elas: a laminina-332, o colágeno XVII, a integrina alfa-6-beta-4 e a subunidade alfa-3 da integrina (FINE *et al.*, 2014; FINE; MELLERIO, 2015).

A descrição de cada subtipo clínico da EBJ com sua proteína-alvo correspondente pode ser vista na tabela 2:

Tabela 2 - Subtipos clínicos da EBJ, suas proteínas-alvo e os genes mutados

Subtipo de EBJ		Nível de formação das bolhas	Proteínas-alvo	Padrão de marcação antigênica	Genes mutados
EBJ generalizada	Grave	Intra-LL	Laminina-332	Ausente ou muito reduzida	<i>LAMA3, LAMB3, LAMC2</i>
	Intermediária	Intra-LL	Laminina-332	Reduzida	<i>LAMA3, LAMB3, LAMC2</i>
	Com atresia pilórica	Intra-LL	Colágeno XVII Integrina alfa-6-beta4	Ausente ou reduzida	<i>COL17A1 ITGB4, ITGB6</i>
	Início tardio	Intra-LL ou sem bolhas aparentes	Colágeno XVII	Reduzida ou positiva com padrão anormal	<i>COL17A1</i>
	Com comprometimento respiratório e renal	Intra-LL	Subunidade alfa 3 da integrina	Ausente ou normal	<i>ITGA3</i>
EBJ localizada	Localizada	Intra-LL	Colágeno XVII Integrina alfa-6-beta-4 Laminina-332	Ausente ou reduzida Reduzida Reduzida	<i>COL17A1 ITGB4 LAMA3, LAMB3, LAMC2</i>
	Inversa	Intra-LL	Laminina-332	Reduzida	<i>LAMA3, LAMB3, LAMC2</i>
	Síndrome LOC	Sem bolhas	Isoforma alfa 3 da laminina-332	Normal	<i>LAMA3A</i>

EBJ: Epidermólise bolhosa juncional; Intra-LL: Intra-lâmina lúcida.

Fonte: Adaptado de FINE *et al.* (2014)

2.5.2.3 Derme papilar superior

O plano de clivagem da EBD é abaixo da lâmina densa, na derme papilar superior. É nesse local que residem as fibrilas de ancoragem do colágeno VII, proteína-alvo de todos os subtipos distróficos da doença. Embora elas permaneçam com tamanho e estrutura normais nos subtipos dominantes da EBD, elas podem estar em número reduzido. Já nos subtipos recessivos, por sua vez, elas podem estar completamente ausentes (FINE; MELLERIO, 2015).

A tabela 3 mostra a relação de cada subtipo clínico de EBD com as alterações encontradas no colágeno tipo VII, a proteína-alvo envolvida.

Tabela 3 - Subtipos clínicos de EBD e suas proteínas-alvo

Subtipo de EBD	Nível de formação da bolha	Proteína alterada	Gene mutado
EBDD (todos exceto dermólise bolhosa do recém-nascido)	Dérmico (sublâmina densa)	Colágeno VII	<i>COL7A1</i>
EBDD e EBDR dermólise bolhosa do recém-nascido	Dérmico (sublâmina densa)	Colágeno VII	<i>COL7A1</i>
EBDR generalizada grave	Dérmico (sublâmina densa)	Colágeno VII	<i>COL7A1</i>
EBDR generalizada intermediária	Dérmico (sublâmina densa)	Colágeno VII	<i>COL7A1</i>
EBDR localizada	Dérmico (sublâmina densa)	Colágeno VII	<i>COL7A1</i>
EBDR todos outros tipos	Dérmico (sublâmina densa)	Colágeno VII	<i>COL7A1</i>

EBD: Epidermólise bolhosa distrófica; EBDD: Epidermólise bolhosa distrófica dominante; EBDR: Epidermólise bolhosa distrófica recessiva.

Fonte: Adaptado de FINE *et al.* (2014)

2.5.3 Aspectos genéticos

Desde o início da década de 1990, técnicas de biologia molecular vêm sendo amplamente desenvolvidas e empregadas no estudo da patogênese das genodermatoses, em especial na EBC, considerada o protótipo dessas afecções (FINE *et al.*, 2008c; PULKKINEN; UITTO, 1999).

2.5.3.1 Herança

O padrão de herança de cada tipo e subtipo da EBC pode variar. A maioria das formas de EBS é transmitida de maneira autossômica dominante, como a EBS localizada, a EBS generalizada grave, a EBS generalizada-outra, a EBS Onga, e a EBS com pigmentação mosqueada. As formas suprabasais (como a EBS acantolítica, a EBS por deficiência de placofilina, a EBS por deficiência de placoglobina e a EBS por deficiência de desmoplaquina), além da EBS com distrofia muscular, da EBS com atresia pilórica e da EBS autossômica recessiva possuem transmissão autossômica recessiva (FINE; MELLERIO, 2015).

Até o presente momento, todas as formas de EBJ foram transmitidas de maneira autossômica recessiva, com exceção de uma família que apresentou uma mutação dominante-negativa no gene codificador do colágeno tipo XVII (FINE; MELLERIO, 2015).

Assim como a EBS, o tipo distrófico também pode ser transmitido de maneira autossômica dominante ou recessiva. As formas que apresentam herança autossômica dominante são a EBDD generalizada, a EBDD acral, a EBDD pré-tibial, a EBDD pruriginosa, a EBDD apenas unhas e a EBDD do recém-nascido. Já as formas que apresentam herança autossômica recessiva são a EBDR generalizada grave, EBDR generalizada outra, EBDR inversa, EBDR pré-tibial EBDR centrípeta e a EBDR do recém-nascido (FINE *et al.*, 2014; FINE; MELLERIO, 2015).

A Síndrome Kindler somente é transmitida de maneira autossômica recessiva, conforme reportado até o momento (FINE; MELLERIO, 2015).

2.5.3.2 Genes associados

Atualmente, um grande número de mutações genéticas já foi identificado e associado a subtipos específicos da doença, auxiliando não somente na confirmação do seu diagnóstico, mas também na sua subclassificação (FINE *et al.*, 2008c, 2014; HAS; FISCHER, 2018).

Com relação à epidermólise bolhosa simples, por exemplo, já foram identificadas mutações em dez genes no total. Cinco deles, quando mutados, geram os subtipos suprabasais da doença, a saber: *TGM5* (que codifica a transglutaminase 5), *DSP* (que codifica a desmoplaquina), *JUP* (que codifica a placoglobina), *PKP1* (que codifica a placofilina-1). Os cinco restantes são responsáveis por subtipos basais da EBS: *KRT5* (que codifica a citoqueratina 5), *KRT14* (que codifica a citoqueratina 14), *EXPH5* (que codifica a exofilina 5), *PLEC* (que codifica a plectina) e *DST* (que codifica o antígeno do penfigóide bolhoso 1) (FINE *et al.*, 2014).

A epidermólise bolhosa juncional, por sua vez, está relacionada a mutações em oito genes já identificados. Alterações nos genes *LAMA3*, *LAMB3* e *LAMC2*, que codificam a laminina-332, podem dar origem a diversos subtipos da doença, tais como a EBJ generalizada grave, a EBJ generalizada moderada, a EBJ localizada e a EBJ localizada inversa. O gene *LAMA3A*, que codifica a cadeia alfa-3 da laminina-332, está associado ao desenvolvimento da Síndrome Laringo-onico-cutânea (LOC), um subtipo de EBJ caracterizado pela presença de bolhas e erosões com acometimento predominante da face e do pescoço, além de alterações oculares (lesões conjuntivas, simbléfaro e granulomas palpebrais) e respiratórias (anormalidades dos tecidos moles da laringe) (FINE *et al.*, 2014). Alterações no *COL17A1*, que codifica o colágeno XVII, podem levar aos subtipos de EBJ generalizada denominados de moderado e de início tardio, bem como a EBJ localizada. O gene *ITGB4*, que codifica a integrina alfa-6-beta-4, foi associado à EBJ generalizada com atresia pilórica e também a uma forma de EBJ localizada. Mutações no gene *ITGA6*, também associado à síntese da integrina alfa-6-beta-4, foi relacionado à EBJ generalizada com atresia pilórica. Por fim, alterações em

ITGA3, que codifica a subunidade alfa-3 da integrina, podem ser responsáveis por uma forma de EBJ generalizada com comprometimento renal e respiratório (FINE *et al.*, 2014).

O terceiro tipo principal de EBC conhecido, a epidermólise bolhosa distrófica, tem na sua origem mutações no gene *COL7A1*, que codifica o colágeno VII. Os diferentes níveis de expressão da proteína, que pode estar apenas reduzida ou completamente ausente, são responsáveis pelos variados subtipos e expressões fenotípicas da doença (FINE *et al.*, 2014). A Síndrome Kindler, quarto e último tipo principal da EBC, está associada a mutações no gene *FERMT1 (KIND1)*, que codifica a kindlina-1 (FINE *et al.*, 2014). A tabela 4 apresenta, de maneira resumida e objetiva, cada tipo principal e subtipo da EBC, relacionando-os às mutações encontradas em cada gene responsável pelas alterações proteicas.

Os avanços nos métodos diagnósticos, especialmente em relação à biologia molecular, têm proporcionado a identificação de um número crescente de genes envolvidos na origem da doença, bem como seus mecanismos de mutação e novos fenótipos associados. São exemplos dessas novas descobertas os genes *CD151*, cujas mutações levam a um fenótipo de fragilidade cutânea associada à doença renal, o gene *KLHL24*, cujas mutações podem levar à EBC com envolvimento cardíaco e neurológico, além de mutações no gene *PLEC1a*, que levam a um fenótipo de EBC simples, porém sem distrofia muscular. Um fenótipo de Síndrome LOC foi identificado também decorrente de alterações no gene da plectina, e não no *LAMA3A*, sendo chamado de Síndrome LOC-like (HAS; FISCHER, 2018).

Outro aspecto interessante é que, apesar de monogênicas, as doenças geneticamente heterogêneas como a EBC podem apresentar fenótipos que são decorrentes de mutações em diferentes genes (HAS; FISCHER, 2018).

Tabela 4 – Tipos de mutações conhecidas nos principais subtipos de EBC

Tipo de EBC	Subtipo de EBC	Genes mutados	Tipo de mutação	
EBS	Suprabasal	<i>TGM5</i>	MS, Del, Indels, Ins	
		<i>DSP</i>	NS, Del, MS	
		<i>PKP1</i>	Spl, NS, Del, Indels, Ins	
		<i>JUP</i>	NS, Spl	
	Basal	<i>KRT5</i>	MS, Del, Spl, NS, Indels	
		<i>KRT14</i>	MS, Del, NS, Spl, Indels,	
		<i>EXPH5</i>	Ins	
		<i>PLEC</i>	Del, NS, Ins	
		<i>DST</i>	NS, Del, Ins, Spl, Indels, MS NS	
EBJ	Generalizada grave	<i>LAMA3</i>	NS, Del, Spl	
		<i>LAMB3</i>	NS, Del, Spl, Ins	
		<i>LAMC2</i>	NS, Del, Spl, Indels	
	Generalizada/localizada	<i>LAMA3</i>	MS, NS, Spl, Ins	
		<i>LAMB3</i>	MS, NS, Spl, Del, Ins,	
		<i>LAMC2</i>	Indels	
		<i>COL17A1</i>	NS, Del, Indels, Ins, Spl	
			<i>ITGB4</i>	NS, Del, Spl, Ins, MS
			<i>COL17A1</i>	Del, Spl, MS
	Início tardio	<i>ITGB4</i>	MS	
	Com atresia pilórica	<i>ITGA6</i>	NS, MS, Del, Spl, Ins,	
<i>ITGA3</i>		Indels		
Com alteração respiratória e renal Síndrome LOC		<i>LAMA3A</i>	Del, MS, NS, Spl MS, Del, Spl	
			Ins, NS	
EBD	EBDR generalizada grave	<i>COL7A1</i>	NS, Del, Spl, Ins, Indels, MS	
	EBDR generalizada e localizada	<i>COL7A1</i>	MS, NS, Del, Spl, Ins,	
	EBDD (todos)	<i>COL7A1</i>	Indels	
Síndrome Kindler	Síndrome Kindler	<i>FERMT1 (KIND1)</i>	MS, Spl, Del NS, Del, Spl, Ins, Indels	

Del: Deleção; EBC: Epidermólise bolhosa congênita; EBD Epidermólise bolhosa distrófica; EBDD: Epidermólise bolhosa distrófica dominante; EBDR: Epidermólise bolhosa distrófica recessiva; EBJ: Epidermólise bolhosa junctional; Indels: Pequena deleção/inserção; Ins: Inserção; MS: Mutação *missense*; NS: Mutação *nonsense*; Spl: Mutação *splice site*.

Fonte: Adaptado de Fine *et al.* (2014)

2.6 MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS

As manifestações cutâneas, bem como sua gravidade e distribuição, são fundamentais para a determinação do fenótipo da EBC e, conseqüentemente, sua classificação clínica. Apesar disso, é comum haver sobreposição de achados entre os diferentes subtipos da doença, assim como modificação dos mesmos ao longo dos anos (FINE; MELLERIO, 2015).

A fragilidade cutânea, as bolhas e as erosões são características comuns a todos os subtipos. Durante o exame clínico, é possível induzir a formação de bolhas através de mínima fricção sobre a pele dos pacientes com EBC. Essas lesões recém-formadas podem servir, inclusive, de amostra de pele para exame anatomopatológico e testes imunohistoquímicos. No entanto, nem todas as formas da doença irão responder ao estímulo da fricção com a mesma intensidade. Os subtipos EBS localizada e EBDD, por exemplo, tendem a formar bolhas apenas nos locais geralmente acometidos (FINE; MELLERIO, 2015).

As cicatrizes, consequência direta das lesões primárias da EBC, também são comuns a todos os tipos clínicos, e possuem uma tendência maior a serem atróficas. Sua frequência é mais alta nos subtipos onde a clivagem da pele ocorre na junção dermoepidérmica (zona da membrana basal), especialmente no nível da lâmina densa, além das formas generalizadas e nos casos de acometimento extracutâneo. Dessa forma, é possível entender porque elas estão presentes em todos os pacientes com EBDR e apenas em 15% daqueles com EBS. Por esse mesmo motivo, achados como unhas ausentes ou distróficas, mília e alopecia cicatricial do couro cabeludo possuem distribuição semelhante nos diversos subtipos da doença (FINE; MELLERIO, 2015).

Quando as manifestações são comuns a vários subtipos clínicos, características como a distribuição das lesões e a gravidade do quadro é que irão auxiliar na definição do fenótipo.

Os pacientes com os subtipos EBJ e EBDR, por exemplo, tendem a concentrar lesões nas áreas intertriginosas. Na EBJ generalizada intermediária, por sua vez, as lesões tendem a surgir em áreas acrais. Como já diz a nomenclatura, pacientes com a EBD pré-tibial apresentam lesões quase exclusivamente na área de pele que recobre a tíbia. Na EBDR centrípeta, as bolhas iniciam em regiões acrais e tendem a progredir lentamente em direção ao tronco (FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015). Em crianças pequenas, essa diferenciação clínica através da avaliação do padrão de acometimento corporal pode ser mais difícil, particularmente devido à inespecificidade de algumas apresentações nessa faixa etária. Em algumas situações, entretanto, a presença de alterações mais específicas pode ser a chave para o diagnóstico (FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015).

Com relação à EBS, algumas considerações são importantes. O início da atividade da doença se dá tipicamente ao nascimento ou imediatamente após, com exceção da EBS localizada, que pode vir a se manifestar somente na infância tardia ou até mesmo no início da idade adulta. Como regra geral, as formas simples cursam com menos cicatrizes, menos mília e menos distrofia ungueal quando comparadas aos demais tipos principais. A EBS localizada é o subtipo mais comum. Nela, as lesões costumam acometer primariamente as palmas e solas, podendo haver hiperidrose associada. Esse envolvimento pode ser brando ou grave. As formas graves da EBS localizada, diferentemente das formas leves, caracterizam-se por um acometimento mais extenso, que pode avançar das palmas e solas em direção aos membros. Nesses casos, as bolhas normalmente já se apresentam ao nascimento. Bolhas agrupadas em arranjo arqueado ou policíclico (“herpetiforme”), associadas à queratodermia palmoplantar difusa e comprometimento da mucosa oral, são características da EBS generalizada grave. Esse subtipo está associado a uma elevada morbidade e, em alguns casos, à morte precoce durante a infância. Outra forma generalizada da EBS, a EBS generalizada intermediária, se caracteriza pela distribuição disseminada de bolhas e erosões, porém sem configuração

herpetiforme. A formação de cicatrizes, mília e as alterações ungueais também são menos comuns. Além disso, esse subtipo tende a poupar as palmas e solas (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015; SPRECHER, 2010).

Em relação aos subtipos mais raros da EBS, alguns achados podem ser muito úteis na sua distinção clínica. Hiperpigmentação reticulada, por exemplo, é muito sugestiva de um subtipo de EBS denominado EBS com pigmentação mosqueada (FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015). A descamação superficial da pele, na ausência de bolhas, sugere uma EBS superficial (FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015; SPRECHER, 2010). Na EBS com distrofia muscular, as bolhas são generalizadas, apresentam indução variável, os sintomas musculares normalmente se manifestam na vida adulta, e pode haver comprometimento dentário. Na EBS com atresia pilórica, as bolhas também são generalizadas, e os sintomas gastrintestinais já estão presentes ao nascimento. Devido ao acometimento extenso pela doença, seu prognóstico costuma ser reservado, com elevada mortalidade ainda durante a infância (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; SPRECHER, 2010). Na EBS Ogna, há uma tendência à formação de equimoses e hematomas, além de bolhas hemorrágicas e onicogribose. O acometimento é predominantemente acral, porém pode se disseminar (FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; KOSS-HARNES *et al.*, 2002; OLAISEN; GEDDE-DAHL, 1973; SPRECHER, 2010). A EBS circinada migratória normalmente se manifesta ao nascimento, e pode ser caracterizada pela presença generalizada de bolhas que evoluem para eritema circinado migratório e hiperchromia pós-inflamatória (FINE *et al.*, 2008c).

Já com relação às formas da EBJ, alterações da mucosa oral, alopecia e alterações ungueais são vistas com certa frequência. Uma característica comum a todos os subtipos é a hipoplasia do esmalte dentário. A grande maioria dos pacientes já apresentam lesões ao nascimento. Pacientes com EBJ generalizada grave costumam apresentar erosões e tecido de

granulação exuberante, acometendo de maneira simétrica áreas como regiões periorificiais, axilas, dorso superior, cervical posterior e periungueal. Além disso, complicações extracutâneas são bastante frequentes e comprometem extensamente mucosa e conjuntiva oculares, trato respiratório, trato gastrintestinal e genitourinário. A mortalidade precoce é elevada, mas os que sobrevivem à infância podem ter os sinais e sintomas mais graves amenizados com o tempo, tornando anormalidades dentárias, ungueais e do couro cabeludo mais aparentes. As características erosão e hipergranulação periorificiais tendem a permanecer (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015; NAKANO *et al.*, 2002; TOSTI; DE FARIAS; MURRELL, 2010; TOSTI; DUQUE-ESTRADA; MURRELL, 2010; WRIGHT, 2010).

Um segundo subtipo generalizado é a EBJ generalizada intermediária, também presente ao nascimento, com lesões disseminadas, cicatrizes atróficas, alterações ungueais que podem ser desde distrofia até anoníquia, além de hipo ou hiperpigmentação pós-inflamatória. As complicações extracutâneas associadas a esse subtipo, embora possam estar presentes, são muito menos frequentes do que na forma grave. Um subtipo raro de EBJ é associado à atresia pilórica. Seus achados clínicos são muito semelhantes aos da EBS com atresia pilórica, e a sua diferenciação se dá através da verificação do nível de clivagem da pele (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2010b; FINE; MELLERIO, 2015; NAKANO *et al.*, 2002; PUVABANDITSIN, 2001; TOSTI; DE FARIAS; MURRELL, 2010; TOSTI; DUQUE-ESTRADA; MURRELL, 2010; WRIGHT, 2010). A EBJ inversa, por sua vez, recebe esse nome pelo acometimento de áreas intertriginosas, esôfago e vagina (FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c). Por fim, a Síndrome LOC se caracteriza pela presença de bolhas, erosões, tecido de granulação e cicatrizes de maneira localizada, com acometimento preferencial da cabeça e do pescoço. Alterações das vias aéreas superiores, do aparelho ungueal e da conjuntiva ocular também estão presentes (FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; PHILLIPS *et al.*, 1994).

Conforme visto anteriormente, a EBD é primariamente subdividida em dominante e recessiva, conforme seu modo de transmissão. Na sua forma dominante, as lesões se manifestam inicialmente de maneira generalizada, ao nascimento ou na infância. Conforme os pacientes se tornam mais velhos, as bolhas tendem a surgir em áreas mais localizadas. O acometimento da mucosa oral e dos dentes é mais brando. Algumas variantes podem se apresentar com bolhas em áreas predominantemente acrais, enquanto outras se manifestam de maneira mais generalizada, com lesões albopapuloides. As cicatrizes são geralmente atróficas, e a presença de mília e distrofia ungueal é bastante frequente. O acometimento esofágico é comum entre os pacientes, com progressão para disfagia. Apesar disso, não costuma haver complicações mais graves (BOEIRA *et al.*, 2013; BRUCKNER-TUDERMAN, 2010; FINE, 2010b; FINE; MELLERIO, 2009b, 2009a; HORN; TIDMAN, 2002).

Além dessas, há também outras formas mais raras da EBDD. A EBDD pré-tibial, mencionada previamente, se caracteriza pela presença de bolhas, cicatrizes e pápulas ou placas com coloração eritemato-violácea, confinadas à região pré-tibial (FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015; FURUE *et al.*, 1986). A EBDD acral costuma cursar com lesões exclusivas das mãos e dos pés, porém sem evoluir para pseudossindactilia (FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c). A EBDD pruriginosa, como já sugere sua nomenclatura, pode se apresentar acompanhada de prurido intenso ou até mesmo intratável (FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; MCGRATH; SCHOFIELD; EADY, 1994). A dermólise bolhosa do recém-nascido se manifesta com lesões generalizadas, já ao nascimento, com tendência à formação de cicatrizes atróficas focais. A atividade da doença costuma esmaecer e cessar até os 24 meses de idade (FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; HASHIMOTO; MATSUMOTO; IACOBELLI, 1985).

Já na sua forma recessiva, a EBDR pode acometer os indivíduos tanto de maneira leve quanto extensa e grave. De maneira geral, a atividade da doença tem início já ao nascimento.

As formas leves costumam cursar com acometimento acral e ungueal, porém com poucas alterações mucosas e, conseqüentemente, menos complicações multissistêmicas. O seu subtipo mais grave, denominado EBDR generalizada grave, apresenta bolhas disseminadas, que tipicamente se concentram nas áreas acrais e podem levar a pseudossindactilia em mãos (“em luvas de boxe”) e pés, além de causarem contraturas importantes. Nesse subtipo, o acometimento ungueal, dentário e mucoso é mais extenso. Estruturas do trato gastrointestinal e genitourinário são comumente envolvidas, dando origem a estenoses e obstruções importantes, anemia e déficit de crescimento e desenvolvimento (BOEIRA *et al.*, 2013; BRUCKNER-TUDERMAN, 2010; FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015; HORN; TIDMAN, 2002). Um subtipo mais raro corresponde à EBDR inversa, caracterizada pelo surgimento de bolhas e erosões restritas a áreas intertriginosas, base do pescoço, dorso superior e região lombo-sacral. Pode haver comprometimento importante da cavidade oral, esôfago e trato genitourinário (FINE, 2010b; FINE *et al.*, 2008c). Outro subtipo raro diz respeito à dermólise do recém-nascido transmitida de maneira recessiva. Diferentemente da sua forma dominante correspondente, a forma recessiva é precocemente fatal. O risco de carcinoma epidermóide da pele está presente em todas as formas (FINE, 2010b; FINE; MELLERIO, 2009a).

Devido à possibilidade de clivagem em diferentes níveis ultraestruturais da pele, a SK apresenta-se de maneira variada, podendo simular clinicamente os demais tipos clássicos da EBC. As bolhas tendem a ser acrais, com surgimento ao nascimento ou durante os primeiros dias de vida. Outros achados clínicos incluem poiquilodermia difusa progressiva, xerodermia, atrofia cutânea em áreas como abdome, coxas, joelhos e cotovelos, liquenificação da pele, fotossensibilidade e fusão de quirodáctilos e pododáctilos. O aparelho ungueal, os dentes e o couro cabeludo podem ser normais ou apresentar alterações mínimas. O acometimento mucoso é frequente, com bolhas e erosões que podem levar a estenoses e obstruções

gastrointestinais, respiratórias, genitourinárias e também a alterações oculares. Assim como em algumas formas distróficas, as lesões de pele também podem sofrer transformação maligna, evoluindo para carcinomas epidermóides (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2010a; FINE *et al.*, 2008c; MAHAJAN *et al.*, 2005; WIEBE; LARJAVA, 1999).

As complicações cutâneas e as manifestações extracutâneas relacionadas a cada subtipo da EBC serão abordadas detalhadamente na seção de número 2.9, intitulada Complicações clínicas.

2.7 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

A presença de erosões sobre a pele, característica marcante da doença, leva a um comprometimento importante da sua função de barreira. Como consequência, pode haver progressão para lesões crônicas e significativo aumento no número de microorganismos oportunistas que ali se instalam, em especial as bactérias. O grau de acometimento de cada ferida por tais agentes, também referido na literatura como balanço ou carga bacteriana, costuma se apresentar através de um gradiente contínuo, constituído de quatro fases distintas (EDWARDS; HARDING, 2004; MELLERIO, 2010; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014).

Na primeira fase, denominada de contaminação, há a inoculação bacteriana na superfície das lesões. Ali, elas permanecem sem se replicar e sem causar qualquer tipo de dano tecidual. A segunda fase, chamada de colonização, corresponde ao momento em que a proliferação bacteriana tem início, entretanto, a pequena quantidade de micróbios ainda não retarda a cicatrização e também não causa avanço das áreas acometidas. Quando a proliferação aumenta mais um pouco, atinge-se então a fase denominada de colonização crítica, agora já com prejuízo e dificuldade de cura, porém ainda sem provocar aumento das lesões. Por fim, atinge-se a quarta e última fase, que é a infecção propriamente dita. De uma

maneira geral, ela surge acompanhada de progressão da área acometida, exsudato purulento, odor desagradável, dor, além de eritema e edema circundantes. Sinais e sintomas sistêmicos também podem estar presentes nesse momento (CUTTING; WHITE, 2004; MELLERIO, 2010; SIBBALD; WOO; AYELLO, 2006). Alguns autores ainda descrevem uma quinta etapa evolutiva, que se refere à invasão bacteriana e sepse (EDWARDS; HARDING, 2004; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014). Informações provenientes da observação desse processo ressaltam que toda ferida crônica deve ser considerada, ao menos, contaminada (VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014).

Em oposição ao que ocorre em doenças como a dermatite atópica e a fibrose cística, onde as associações entre colonização e infecção bacterianas também são muito frequentes e já foram amplamente estudadas (BREUER *et al.*, 2002; GOSS; MUHLEBACH, 2011; HON *et al.*, 2016; KĘDZIERSKA *et al.*, 2008; LIPNHARSKI *et al.*, 2013; MIMICA, 2012; MUHLEBACH, 2017; PALLER *et al.*, 2019; PETRY *et al.*, 2014; RANGEL; PALLER, 2018; TOMI; KRÄNKE; ABERER, 2005), ainda há escassez de dados epidemiológicos sobre suas características e seu impacto nos pacientes com EBC (BRANDLING-BENNETT; MOREL, 2010; MELLERIO, 2010; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014).

Os poucos estudos publicados, norte-americanos e europeus em sua maioria, relatam que os agentes mais comumente identificados nos pacientes com EBC foram *Staphylococcus species*, *Streptococcus species*, *Diphtheroids*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida sp* (BOEIRA *et al.*, 2013; BRANDLING-BENNETT; MOREL, 2010; FINE; MELLERIO, 2009a, 2015; SINGER *et al.*, 2018). Não há, até o presente momento, estudos nacionais publicados que possuam enfoque semelhante.

O patógeno mais frequentemente associado aos processos infecciosos foi o *Staphylococcus aureus*, porém qualquer espécie microbiana pode estar envolvida nesse tipo de complicação. As cepas meticilina-resistentes do *S. aureus* (MRSA) ainda são incomuns

nos pacientes com EBC, no entanto, sua frequência tem aumentado, assim como na população geral (DELEO *et al.*, 2010; FINE; MELLERIO, 2009a; GORWITZ *et al.*, 2008; MORAN *et al.*, 2006; SINGER *et al.*, 2018; STEFANI; VARALDO, 2003; VIVONI *et al.*, 2006). Espécies gram-negativas, tais como *Pseudomonas sp* e *Escherichia coli*, são mais frequentemente encontradas em lesões de pele localizadas nos membros inferiores, porém nem sempre atuam como patógenos importantes (FINE; MELLERIO, 2009a).

As taxas estimadas de colonização pelo *S. aureus* na população humana geral são de cerca de 30% (KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014; WERTHEIM *et al.*, 2005), sendo as narinas o principal sítio carreador, com uma prevalência que varia de 25% a 37% (GORWITZ *et al.*, 2008; KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997; WERTHEIM *et al.*, 2005). Outros sítios carreadores conhecidos são a pele, o períneo, a faringe, o trato gastrintestinal, a vagina e as axilas (LAUDERDALE *et al.*, 2010; MERMEL *et al.*, 2011; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014).

Embora não ocorra infecção na maioria das pessoas, a colonização bacteriana é considerada um importante fator de risco para tal complicação (GORWITZ *et al.*, 2008; VON EIFF *et al.*, 2001), particularmente quando o agente envolvido é um *S. aureus* MRSA (DAVIS *et al.*, 2004; ELLIS *et al.*, 2004; GORWITZ *et al.*, 2008), cuja prevalência nasal na população geral é em torno de 1,5% (GORWITZ *et al.*, 2008). Em situações onde a barreira cutânea se encontra danificada, ou quando há comprometimento do sistema imunológico, o *S. aureus* pode passar de um simples comensal a um patógeno importante, com elevado potencial de gerar infecção e de desenvolver resistência antimicrobiana (LOWY, 1998, 2003; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014). A partir das narinas, ele pode se disseminar e acometer outros sítios. Nesse sentido, acredita-se que grande parte dos processos infecciosos possa ser evitada adotando-se medidas para erradicação da colonização bacteriana (YU *et al.*, 1986).

Uma coorte conduzida na Holanda avaliou a frequência de colonização por *S. aureus* em um total de 62 pacientes com EBC, com e sem lesões crônicas, durante um período de dois anos. As taxas encontradas foram surpreendentemente elevadas, não somente nas lesões, mas também nas narinas e na faringe (KOOI-POL *et al.*, 2012; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2013a). A taxa de colonização nasal encontrada correspondeu a 62%, nos pacientes sem lesões crônicas, enquanto aqueles que as possuíam chegaram a ser colonizados em 75% dos casos. Esses valores são notadamente superiores aos encontrados na população geral (25 a 37%) (KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997; WERTHEIM *et al.*, 2005) e também no grupo-controle do estudo, constituído por profissionais saudáveis da área da saúde (39%) (KOOI-POL *et al.*, 2012). Quanto à colonização da faringe, a frequência foi de 55% nos pacientes com lesões crônicas, bastante superior aos 26% e 23% detectados em pacientes sem as lesões e no grupo-controle, respectivamente (KOOI-POL *et al.*, 2012). A taxa de colonização nas lesões crônicas foi de 92%, enquanto lesões mais recentes apresentaram um valor de 69% (KOOI-POL *et al.*, 2012).

Em contraste, um estudo retrospectivo que analisou culturas realizadas a partir de amostras de 30 pacientes com EB, nos Estados Unidos, mostrou que não houve correlação entre colonização nasal pelo *S. aureus* e sua presença nas lesões ou desenvolvimento de infecção (BRANDLING-BENNETT; MOREL, 2010), entretanto, limitações quanto ao seu desenho e execução podem comprometer a validade dos seus resultados. Tais achados foram concordantes com os de outro estudo, desta vez realizado em crianças com infecções recorrentes de pele, onde as cepas de *S. aureus* encontradas nas lesões não foram as mesmas encontradas colonizando as narinas. Assim sendo, foi sugerido que a colonização bacteriana das narinas poderia não ter valor como fator de risco para infecções de pele em crianças (CHEN *et al.*, 2009).

A influência da colonização das lesões pelo *S. aureus* sobre a cura e a cicatrização das mesmas ainda é discutido de maneira controversa na literatura (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; BRANDLING-BENNETT; MOREL, 2010; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014). Entretanto, conforme mencionado anteriormente nesta seção, a alta prevalência do agente nas lesões crônicas, superior à verificada em lesões agudas ou subagudas, pode ser um indicativo de que a presença e proliferação bacteriana local pode, sim, retardar tal processo (BRANDLING-BENNETT; MOREL, 2010; TRENGOVE *et al.*, 1996; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014).

Outra questão interessante, abordada em alguns estudos que realizaram a tipificação molecular dos isolados de *S. aureus*, diz respeito ao padrão de colonização dos pacientes com EBC pelo referido agente. A população geral costuma ser colonizada pelas cepas bacterianas mais prevalentes no meio em que vive. Entretanto, é sabido que os indivíduos saudáveis tendem a disponibilizar um número restrito de nichos para a ocupação bacteriana, que serão rapidamente preenchidos pela cepa que estiver melhor adaptada. Embora possa haver alternância de cepas a cada determinado período de tempo, como via de regra, todos são colonizados predominantemente por uma única cepa. O mesmo não ocorre com os pacientes portadores de EBC. Neles, já foram identificadas múltiplas cepas distintas de *S. aureus* colonizando simultaneamente o mesmo paciente e podendo, inclusive, habitar locais muito próximos. Essa particularidade se torna especialmente relevante devido ao risco em potencial que esses patógenos apresentam de causar infecções estafilocócicas graves (VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2013b, 2014).

As cepas de *S. aureus* possuem características moleculares que as distinguem de demais isolados bacterianos. O gene *nuc*, por exemplo, é um gene específico do *S. aureus* e, dessa forma, a sua detecção pode ser muito útil para a identificação de tal agente em espécimes clínicos (CHEN *et al.*, 2017; SUDHAHARAN *et al.*, 2015). O gene *mecA*, por sua

vez, é biologicamente responsável pela resistência à meticilina. Ele codifica a chamada proteína de ligação da penicilina 2a (PBP2a), capaz de manter a síntese da parede celular enquanto as demais proteínas são inibidas pelos antibióticos β -lactâmicos. Quando associada à investigação do gene *nuc*, a sua detecção é particularmente útil para uma rápida identificação e diferenciação de cepas *S. aureus* MRSA (CHAMBERS; DELEO, 2009; CHEN *et al.*, 2017; FISHOVITZ *et al.*, 2014; POZZI *et al.*, 2012; STÜRENBURG, 2009; SUDHAHARAN *et al.*, 2015).

Além da presença do gene *mecA*, uma série de outras características estão relacionadas ao aumento da patogenicidade do MRSA, dentre elas um fator de virulência denominado toxina Leucocidina de Pantón-Valentine, associado a cepas comunitárias. Ela é capaz de induzir à necrose e, dessa forma, levar à apoptose e destruição dos leucócitos mononucleares e polimorfonucleares (BHATTA *et al.*, 2016). O MRSA é considerado a mais prevalente bactéria multirresistente da atualidade (VAN DUIN; PATERSON, 2016). Quando comparado a outras cepas, ele é associado a um número muito maior de complicações infecciosas que evoluem para desfechos desfavoráveis, incluindo situações ameaçadoras à vida (CAVALCANTE *et al.*, 2017; DAVIS *et al.*, 2004; DELEO *et al.*, 2010; ELLIS *et al.*, 2004; GORWITZ *et al.*, 2008; WITTE, 2009). O aumento da sua frequência em ambientes intra e extra-hospitalares tem tornado o manejo terapêutico dos quadros infecciosos cada vez mais desafiador e oneroso (DELEO *et al.*, 2010; STEFANI; VARALDO, 2003).

2.8 DIAGNÓSTICO

2.8.1 Testes não moleculares

A avaliação diagnóstica e a classificação dos tipos e subtipos de EBC iniciam com a investigação do nível de clivagem da pele, preferencialmente em bolhas recentemente induzidas, através de dois testes específicos: a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e o mapeamento antigênico de imunofluorescência ou imunomapeamento (IMM) (FINE *et al.*, 2014; SAUNDERSON *et al.*, 2019). Ambos são considerados padrão-ouro para o diagnóstico não molecular da EBC, havendo uma discrepância observada entre eles de apenas 3% (FINE; MELLERIO, 2015).

Através da MET, é possível definir o nível ultraestrutural de formação das bolhas e, dessa forma, fazer distinção entre os quatro tipos principais da doença. Além disso, ela pode ser utilizada de maneira quantitativa e qualitativa, com o objetivo de avaliar estruturas específicas da pele que estão sabidamente alteradas em número ou aparência na EBC, tais como tonofilamentos basilares, desmossomos, hemidesmossomos, filamentos e fibrilas de ancoragem, dentre outros (FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015).

Apesar das vantagens da MET no diagnóstico e classificação da EBC, dificuldades técnicas e a falta de laboratórios capacitados e confiáveis para a sua realização podem levar a achados equivocados com certa frequência. Dessa forma, muito embora a MET permaneça ocupando importante espaço no ambiente acadêmico e na pesquisa, o seu emprego de maneira rotineira tende a diminuir cada vez mais no cenário mundial (FINE *et al.*, 2008c). A tabela 5 apresenta os principais achados de microscopia eletrônica para cada tipo e subtipo de EBC, bem como suas localizações dentre as camadas da pele.

O mapeamento antigênico de imunofluorescência, por sua vez, utiliza anticorpos monoclonais direcionados a estruturas da zona de membrana basal e antígenos epidérmicos, realizando uma avaliação qualitativa e quantitativa da expressão e distribuição dessas proteínas na pele. Assim sendo, além de identificar o nível de clivagem da pele e, conseqüentemente, o tipo principal de EBC presente, essa técnica pode ainda facilitar a

subsequente subclassificação da doença, uma vez que os diferentes subtipos de EBC irão apresentar variados níveis de intensidade dos marcadores antigênicos para as proteínas mutadas. As amostras biológicas são coletadas de bolhas espontâneas recentes ou induzidas (FINE *et al.*, 2008c, 2014; FINE; MELLERIO, 2015).

Quando comparado à MET, o imunomapeamento apresenta uma série de vantagens. A técnica é mais simples de ser executada, mais rápida e também menos onerosa. Os equipamentos necessários, tais como um crio-micrótomo e um microscópio de fluorescência, são mais acessíveis e de fácil instalação. Além disso, quando mantidos em temperatura adequada, os meios apropriados de transporte garantem que espécimes permaneçam viáveis para análise mesmo após várias semanas da coleta. Atualmente, diversos laboratórios ao redor do mundo são capazes de desenvolver a técnica, utilizando séries de anticorpos relevantes para a EBC e seguindo protocolos já bem estabelecidos (FINE *et al.*, 2008c).

Tabela 5 - Achados ultraestruturais de microscopia eletrônica nos tipos principais e subtipos selecionados de EBC

Tipo ou subtipo de EBC	Sítio ultraestrutural da clivagem	Achados ultraestruturais
EB simples (EBS)		
Localizada	Camada basal	Separação pode evoluir para camada suprabasal
Generalizada grave	Camada basal no citoplasma subnuclear	Aglomerados densos e circunscritos de queratina
Com distrofia muscular	Predominantemente na camada basal	Integração reduzida dos filamentos de queratina aos hemidesmossomos
Autossômica recessiva	Queratinócitos basais	Filamentos de queratina ausentes ou reduzidos
Superficial	Interface entre camadas granular e córnea	-----
Acantolítica letal	Suprabasal com acantólise	Retração perinuclear dos filamentos de queratina
Com atresia pilórica	Camada basal baixa	Integração reduzida dos filamentos de queratina aos hemidesmossomos
EB juncional (EBJ)		
Generalizada grave	Lâmina lúcida	Hemidesmossomos muito reduzidos ou ausentes; lâmina densa ausente
Generalizada intermediária	Lâmina lúcida	Hemidesmossomos normais ou reduzidos em número/tamanho
Com atresia pilórica	Lâmina lúcida	Placas hemidesmossômicas pequenas com lâmina densa atenuada
EB distrófica dominante		
Generalizada grave	Sublâmina densa	Fibrilas de ancoragem normais ou reduzidas
Dermólise bolhosa do recém-nascido	Sublâmina densa	Corpos estelares elétrondensos na camada basal; fibrilas de ancoragem reduzidas
EB distrófica recessiva		
Generalizada grave	Sublâmina densa	Fibrilas de ancoragem ausentes ou rudimentares
Generalizada intermediária	Sublâmina densa	Fibrilas de ancoragem reduzidas ou rudimentares
Dermólise bolhosa do recém-nascido	Sublâmina densa	Corpos estelares elétrondensos na camada basal; fibrilas de ancoragem reduzidas

EB: Epidermólise bolhosa.

Fonte: adaptado de FINE *et al.* (2008c)

Entretanto, é importante ressaltar que o imunomapeamento é um exame “operador-dependente” e, portanto, seu sucesso depende da experiência de quem o executa e o interpreta. Resultados falso-negativos podem surgir decorrentes de adesão inadequada ao anticorpo secundário, aparente perda da marcação antigênica pelo uso de preparações de anticorpos fora do prazo de validade, bem como diferenças na intensidade da adesão do anticorpo ao tecido relacionadas ao lote ou marca dos produtos utilizados (FINE *et al.*, 2008c). Além disso, é importante frisar que a técnica utilizada é apenas semiquantitativa e, por esse motivo, não é capaz de distinguir de forma acurada todos os subtipos de EBC existentes (Fine *et al.* 1999, apud FINE *et al.*, 2008b). A tabela 6 mostra, de forma resumida, as alterações antigênicas encontradas em determinados subtipos de EBC.

Tabela 6 - Alterações antigênicas encontradas em pele com EBC através da técnica de mapeamento por imunofluorescência

Antígeno	Marcação anormal em	Padrão de marcação
Citoqueratina 14 (K14) Laminina-332	EBS autossômica recessiva	Ausente ou muito reduzido
	EBJ generalizada grave EBJ generalizada intermediária	Ausente ou muito reduzido Reduzido
Colágeno tipo XVII	EBJ generalizada intermediária	Ausente
	EBJ localizada	Reduzido
Colágeno tipo VII	EBDR generalizada grave	Ausente ou muito reduzido
	EBDR generalizada intermediária	Reduzido
	EBDR inversa	Variável
	EBD dermólise do RN	Granular entre queratinócitos basais e suprabasais; ausente ou muito reduzido na JDE
Plectina	EBS com distrofia muscular	Ausente ou reduzido
	EBS com atresia pilórica	Ausente ou reduzido
	EBS Oga	Reduzido
Integrina alfa-6-beta4	EBJ com atresia pilórica	Ausente ou reduzido
	EBS com atresia pilórica	Ausente ou reduzido
	EBJ generalizada intermediária	Reduzido
Kindlina 1	Síndrome Kindler	Ausente, reduzido ou normal

EBD: Epidermólise bolhosa distrófica; EBJ Epidermólise bolhosa juncional; EBS: epidermólise bolhosa simples; JDE: Junção dermoepidérmica; RN: Recém-nascido.
Fonte: Adaptado de FINE *et al.* (2008c)

2.8.2 Testes moleculares

Após a correta identificação do nível de clivagem da pele e do seu perfil antigênico, recomenda-se, sempre que possível, a análise das mutações genéticas causadoras. A avaliação genética irá permitir não somente a subclassificação mais precisa da doença, mas também a possibilidade, no futuro, de terapia molecular. No momento, os achados genéticos correspondem à maneira mais assertiva de se estabelecer modo de transmissão da doença, permitindo o aconselhamento genético acurado. Entretanto, devido à grande variabilidade com relação à gravidade e história natural da doença, muito provavelmente com influência de fatores ambientais e modificadores genéticos, não se recomenda estabelecer prognóstico apenas com base nos achados moleculares (FINE *et al.*, 2014). Vale ressaltar também que a análise de mutações genéticas ainda não é considerada um teste de primeira linha para o diagnóstico da EBC, com exceção dos casos de diagnóstico pré-natal e pré-implantação (FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015), embora já haja um movimento nessa direção (SAUNDERSON *et al.*, 2019).

2.9 COMPLICAÇÕES CLÍNICAS

Até este momento, há escassez de dados com base em evidências científicas que descrevam a história natural de cada tipo principal de EBC. Esse fato gera a preocupação de que, por falta de entendimento das particularidades de cada subtipo da doença, alguns médicos assistentes, especialmente não especialistas, possam estabelecer prognósticos e tomar condutas equivocadas com base em riscos que foram erroneamente generalizados para todos

os pacientes. Nesse sentido, fazem-se imprescindíveis o estudo e a compreensão das complicações associadas a cada tipo de EBC (FINE *et al.*, 2008b).

Além da pele, muitos outros tecidos podem ser acometidos pela formação de bolhas e erosões, levando a um aumento considerável da morbidade. Isso costuma ser visto predominantemente nas formas mais graves e generalizadas, embora cada subtipo tenha as suas particularidades. Além das complicações locais diretamente relacionadas ao surgimento das lesões ou aos seus processos cicatriciais, uma série de outras afecções já foi sabidamente relacionada a determinados subtipos de EBC, tais como anemia, retardo do crescimento e desenvolvimento, infecções locais e sistêmicas, insuficiência renal, malignidades e até mesmo morte prematura. Tais fatos reforçam a necessidade e a relevância de uma total compreensão do comportamento natural e dos riscos associados a cada forma específica da doença, no intuito de minimizar as complicações e de proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes (FINE *et al.*, 2008b; FINE; MELLERIO, 2009b).

2.9.1 Infecção

As infecções de pele são comuns a todos os tipos e subtipos de EBC, porém exercem papel mais importante nas formas generalizadas graves da EBDR e da EBJ (FINE; MELLERIO, 2009a). Esses pacientes acometidos de maneira extensa pela doença, mesmo com cuidados extremos, dificilmente conseguem permanecer livres de infecção (MOY *et al.*, 1990). Muitos são os fatores de risco para o desenvolvimento de infecções cutâneas. As extensas áreas de pele danificada e desprotegida tornam-se mais propensas à penetração microbiana. Além disso, o meio úmido da superfície das feridas proporciona um aumento na proliferação bacteriana. Esses fatores locais, aliados a anormalidades imunológicas e deficiências nutricionais, especialmente nos subtipos mais graves de EBC como a EBJ

generalizada grave, acabam tornando os pacientes mais vulneráveis aos processos infecciosos (BOEIRA *et al.*, 2013; PAI; MARINKOVICH, 2002).

Conforme visto anteriormente, o patógeno mais frequentemente associado a esse tipo de complicação é o *Staphylococcus aureus*, porém qualquer espécie microbiana pode estar envolvida (FINE; MELLERIO, 2009a).

As infecções sistêmicas são menos comuns nos pacientes com EBC. A sepse era a principal causa de mortalidade em crianças com EBC algumas décadas atrás, no entanto, melhorias em relação ao manejo tópico das lesões, particularmente com o desenvolvimento de curativos mais sofisticados, além do uso de antibióticos tópicos e sistêmicos mais potentes, porém mais seletivos, muito provavelmente foram os responsáveis por uma redução significativa do número de casos graves nos países desenvolvidos. Atualmente, apontam-se como principais fatores de risco para sepse e morte por sepse nesses países o uso de cateteres invasivos e o uso indiscriminado de antimicrobianos tópicos e sistêmicos, com consequente indução de resistência bacteriana (FINE, 1986; FINE *et al.*, 2008b; FINE; MELLERIO, 2009a).

Dados de pesquisa realizada nos Estados Unidos mostraram a sepse como causa de morte na idade de 1 ano presente em todos os subtipos de EBC, com exceção de dois, com uma frequência que variou de 0,4% no subtipo EBDR generalizada intermediária até 19,5% no subtipo EBJ generalizada intermediária. O risco cumulativo de morte por sepse observado foi de 11% e 20% para as formas EBJ generalizada grave e EBJ generalizada intermediária, respectivamente, aos 12 meses de idade. Esse risco aumentou para 17,5% nos pacientes com EBJ generalizada grave, aos 8 anos de idade, e para 24,2% nos pacientes com EBJ generalizada intermediária, aos 15 anos (FINE *et al.*, 2008b; FINE; MELLERIO, 2009a).

Pacientes com o subtipo EBS generalizada grave também apresentaram uma taxa de mortalidade por sepse em torno de 2% aos 12 meses de idade, sendo ela a principal causa de

morte nesse subtipo e nessa faixa etária. Não foram observados riscos em idades posteriores. A mortalidade por sepse observada nos demais subtipos de EBC durante a infância foi baixa. Observou-se um aumento de 8% no risco para os pacientes com o diagnóstico de EBDR generalizada grave na idade de 35 anos, porém muito provavelmente associado a complicações de metástases de carcinoma epidermóide da pele (FINE *et al.*, 2008b; FINE; MELLERIO, 2009a).

Embora a preocupação em torno da mortalidade por sepse seja uma realidade para poucos subtipos da EBC (EBJ e EBS generalizada grave) nos países desenvolvidos, nos países do terceiro mundo, como é o caso do Brasil, o cenário é outro. Aqui, a sepse permanece como importante fator de risco para mortalidade entre os pacientes com EBC (FINE *et al.*, 2008b; MELLERIO, 2010).

2.9.2 Demais complicações

Os pacientes com EBC apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores cutâneos malignos. O mais frequente deles é o carcinoma epidermóide da pele, considerado a principal complicação entre a população adulta portadora de EBC, especialmente entre os pacientes com o subtipo EBDR generalizada grave (FINE, 2010a; FINE *et al.*, 2008b, 2009, FINE; MELLERIO, 2009a, 2015). Embora menos frequente, o melanoma maligno também pode ocorrer em crianças diagnosticadas com EBC, já tendo sido relatado em algumas formas simples e distróficas (FINE *et al.*, 2009). Além disso, crianças com EBC podem desenvolver nevos melanocíticos bastante pigmentados, grandes e irregulares que, apesar de benignos, assemelham-se a melanomas malignos, os denominados “nevos EB” (FINE; MELLERIO, 2015). Por fim, pacientes com o subtipo EBS generalizada grave apresentaram maior risco de desenvolver carcinoma basocelular do que o observado na

população branca norte-americana geral ou em pacientes com a forma localizada da EBS (FINE *et al.*, 2009; FINE; MELLERIO, 2009a).

A alopecia pode ser um achado comum a muitos subtipos de EBC, entretanto, nenhum padrão específico foi reportado até o momento (BOEIRA *et al.*, 2013). Dependendo da extensão da doença e do nível de clivagem das bolhas, ela pode ser focal ou difusa, transitória ou evoluir para cicatrizes de maneira irreversível. Além do couro cabeludo, os cílios e as sobrancelhas também podem ser acometidos em diferentes graus. Pacientes com comprometimento sistêmico por anemia ou sepse podem, ainda, desenvolver rarefação capilar decorrente de eflúvio telógeno. Além da alopecia, alguns subtipos de EBC também podem cursar com alterações da haste capilar (DANG *et al.*, 2008; HAMADA *et al.*, 2002; MCGRATH *et al.*, 1997; TOSTI; DUQUE-ESTRADA; MURRELL, 2010).

Os tecidos moles da cavidade oral e os dentes estão comumente alterados nos pacientes com EBC, uma vez que bolhas e erosões são muito frequentes nesse local. Embora pacientes com as formas juncional e distrófica recessiva sejam os mais frequentemente acometidos, muito provavelmente devido à correlação com a gravidade e a atividade da doença, os demais subtipos também podem apresentar alterações (FINE; MELLERIO, 2009a, 2015, WRIGHT; FINE; JOHNSON, 1993, 1994). São elas: hipoplasia do esmalte dentário, cáries, perda precoce da dentição, microstomia e anquiloglossia (FINE; MELLERIO, 2009a, 2015; WILDER *et al.*, 2017; WRIGHT; FINE; JOHNSON, 1994).

Alterações musculoesqueléticas, de uma forma geral, também são frequentes nos pacientes com EBC. Sua principal complicação é a pseudossindactilia, característica marcante das formas distróficas recessivas, especialmente da EBDR generalizada grave, embora também já tenha sido observada nos subtipos EBDD, EBJ e EBS generalizada grave (FINE; MELLERIO, 2009a, 2015). Seu manejo é particularmente difícil, em especial devido às inúmeras recorrências (MARIN-BERTOLIN *et al.*, 1999 *apud* LURIA *et al.*, 2014;

RASHIDGHAMAT; MCGRATH, 2017; TERRILL *et al.*, 1992). Outras complicações musculoesqueléticas comuns a vários tipos de EBC são a osteopenia, a osteoporose, as fraturas ósseas e as contraturas (FINE; MELLERIO, 2009a, 2015). A distrofia muscular, muito menos frequente, está associada a um subtipo raro de EBC onde mutações no gene da plectina (*PLEC1*) levam à propensão ao desenvolvimento de bolhas intraepidérmicas e distrofia muscular, denominado EBS com distrofia muscular (FINE *et al.*, 1989; FINE; MELLERIO, 2009a, 2015; KYROVA *et al.*, 2016; NIEMI, 1988; ROUAN *et al.*, 2000).

A anemia é uma complicação observada com certa frequência na EBC, especialmente nos subtipos mais graves, como na EBDR e na EBJ (FINE *et al.*, 2008c; SIDWELL; YATES; ATHERTON, 2000). Ela pode ocasionar sintomas como redução da energia e disposição, dispneia, redução da tolerância para atividades físicas, atraso na cura de lesões cutâneas e anorexia (FINE; MELLERIO, 2009a). Acredita-se que a sua etiologia seja multifatorial (FINE; MELLERIO, 2009a; SIDWELL; YATES; ATHERTON, 2000; WEISS, 1999).

A maioria das crianças com formas graves de EBC apresenta atraso no crescimento e no desenvolvimento puberal, com comprometimento da altura final e da massa óssea total. A incidência exata dessas alterações no contexto das doenças crônicas e, no caso específico da EBC, é incerto (FINE; MELLERIO, 2009a; MARTINEZ; ALLGROVE; BRAIN, 2010). Acredita-se que os principais mecanismos envolvidos na origem dessas desordens sejam derivados de um estado inflamatório exacerbado e de deficiências nutricionais (FINE; MELLERIO, 2009a; MARTINEZ; ALLGROVE; BRAIN, 2010) e, quanto mais precocemente a doença se manifesta, maior é o impacto sobre o crescimento e o desenvolvimento puberal da criança (MARTINEZ; ALLGROVE; BRAIN, 2010; MCKAY *et al.*, 1998; POZO; ARGENTE, 2002).

Muitas são as complicações otorrinolaringológicas que podem surgir no contexto da EBC, envolvendo estruturas anatômicas como as orelhas, a cavidade nasal, a orofaringe e as

vias aéreas superiores (supraglote, glote, subglote e traqueia) (FINE *et al.*, 2007; FINE; MELLERIO, 2009b). As orelhas externa e interna podem ser acometidas de maneira primária pelo surgimento de bolhas e erosões, com formação de crostas e eventuais infecções secundárias. Além disso, pode haver formação de mília, desenvolvimento de otites, evolução para cicatrizes e estenoses do conduto auditivo externo, bem como perda auditiva (FINE *et al.*, 2007; FINE; MELLERIO, 2009b).

As vias aéreas superiores também podem ser afetadas de maneira direta pelo surgimento de inflamação, bolhas, erosões, crostas, tecido de granulação abundante, nódulos, cistos estenoses e obstruções. A afecção mais comumente relatada nos pacientes com EBC foi a rouquidão, que pode corresponder a um sinal precoce de envolvimento laríngeo. Estridor inspiratório e dispneia também podem ser observados (BERSON *et al.*, 1992; FINE *et al.*, 2007; FINE; MELLERIO, 2009b; GONZALEZ; ROTH, 1989; KENNA; STOOL; MALLORY, 1986; THOMPSON; AHMED; DUDLEY, 1980; YUEN *et al.*, 2012).

A complicação respiratória mais preocupante, sem sombra de dúvidas, diz respeito à evolução para estenoses e obstruções graves, até mesmo fatais, especialmente em crianças pequenas. Esse tipo de complicação pode ser visto na EJB generalizada em geral, porém com maior frequência na forma generalizada grave. Alguns subtipos de EBDR e EBS também podem ser acometidos, bem como a Síndrome LOC (FINE *et al.*, 2007; FINE; MELLERIO, 2009b, 2015; GONZALEZ; ROTH, 1989; IDA *et al.*, 2012; YUEN *et al.*, 2012).

A cardiomiopatia dilatada é uma complicação infrequente. O subtipo mais associado a essa afecção é a EBDR generalizada grave, porém ela também já foi observada em pacientes com os subtipos EBDR generalizada intermediária e EBJ generalizadas grave e intermediária (FINE *et al.*, 2008d; FINE; MELLERIO, 2009a; MELVILLE *et al.*, 1996; SIDWELL; YATES; ATHERTON, 2000). A sua etiologia ainda é incerta, porém acredita-se que seja multifatorial. Dentre os possíveis desencadeantes já foram citados anemia grave, sobrecarga

de ferro pelo excesso de transfusões sanguíneas, deficiências nutricionais (especialmente dos micronutrientes selênio e carnitina), bem como miocardites virais (FINE; MELLERIO, 2009a; MELVILLE *et al.*, 1996; MORELLI *et al.*, 2001; SIDWELL; YATES; ATHERTON, 2000). Além disso, a coexistência de doença renal nessa população confere um risco adicional de desenvolver a doença cardíaca (FINE *et al.*, 2008d; FINE; MELLERIO, 2009a).

Assim como os demais sistemas revestidos por epitélio, o trato gastrintestinal também pode sofrer com o surgimento de lesões próprias da EBC. De maneira geral, qualquer porção pode ser acometida, com exceção do fígado, do pâncreas e da vesícula biliar, levando a considerável morbidade decorrente de complicações importantes, tais como anemia refratária, hipoalbuminemia, síndromes disabsortivas e retardo no crescimento e desenvolvimento (FINE; MELLERIO, 2009b, 2015).

O sintoma do trato gastrointestinal alto mais comumente observado é a disfagia. Em alguns subtipos distróficos como na EBDR generalizada grave, na EBDR inversa, na EBDR generalizada intermediária, bem como na EBJ generalizada grave e na Síndrome Kindler, a ocorrência de bolhas e erosões esofágicas pode evoluir para cicatrizes e estenoses, que é a complicação gastrintestinal mais grave e temida, embora raramente haja obstrução completa (FINE *et al.*, 2008a; FINE; MELLERIO, 2009b, 2015). Demais alterações observadas, porém de maneira muito menos frequente, são refluxo gastroesofágico, espasmos esofágicos, laceração de Mallory Weiss e perfuração esofágica (FINE *et al.*, 2008a).

As complicações gástricas são pouco comuns, com um número pequeno de pacientes apresentando gastrite ou úlcera gástrica. A atresia pilórica é observada em alguns pacientes com o subtipo juncional que hoje é denominado EBJ com atresia pilórica. Quanto aos achados gastrintestinais baixos, a alteração observada com maior frequência é a constipação intestinal. Outros achados encontrados, porém com uma frequência muito inferior, são diarreia, lacerações retais, prolapso retal, estenose retal, fístulas, fissuras e estenoses anais, encoprese,

megacolon, doença inflamatória intestinal, hemorroidas, diverticulose e intussuscepção (FINE *et al.*, 2008a).

As alterações associadas à EBC podem ocorrer em qualquer porção do trato genitourinário e também nos rins (ALMAANI; MELLERIO, 2010; FINE; MELLERIO, 2009b; KRETKOWSK, 1973). A fragilidade extrema do urotélio, com formação de vesículas, bolhas e cicatrizes ao longo do seu trajeto, pode levar a complicações como inflamação persistente do músculo detrusor, estenoses e obstruções parciais desde o meato uretral até os ureteres, com formação de hidroureteres e até mesmo hidronefrose, além de predisposição à pielonefrite (ALMAANI; MELLERIO, 2010; FINE *et al.*, 2004c; FINE; MELLERIO, 2009b, 2015). As formas distróficas e juncionais são as mais acometidas por esse tipo de complicação (ALMAANI; MELLERIO, 2010; CHAN *et al.*, 2007; FINE *et al.*, 2004c; FINE; MELLERIO, 2009b, 2015; MUTLUBAS *et al.*, 2007). Além das complicações renais derivadas de causa obstrutiva, algumas outras condições já foram relatadas em associação com a EBC, tais como glomerulonefrite pós-estreptocócica, nefropatia por IgA e amiloidose secundária (ALMAANI; MELLERIO, 2010; CHAN *et al.*, 2007; FINE *et al.*, 2004c; FINE; MELLERIO, 2009b; MANN *et al.*, 1988; MUTLUBAS *et al.*, 2007).

A pele e a córnea compartilham muitas características ultraestruturais e bioquímicas semelhantes (DESTRO; WALLOW; BRIGHTBILL, 1987), motivo pelo qual são comuns as alterações oculares secundárias à EBC, especialmente nas formas EBJ e EBD (FIGUEIRA; MURRELL; CORONEO, 2010; FINE *et al.*, 2004b; FINE; MELLERIO, 2009b; GRANEK; BADEN, 1980; MELLADO *et al.*, 2018; TONG *et al.*, 1999). As complicações oftalmológicas mais frequentes incluem afecções agudas e fugazes, tais como injeção conjuntival, com hiperemia ocular e lacrimejamento, além da formação de vesículas, bolhas e erosões. Entretanto, também são relatadas condições mais crônicas como formação de cicatrizes corneanas, pannus, simbléfaro, anquilobléfaro, ectrópio, catarata, erros de refração,

ambliopia, estrabismo e obstrução do ducto lacrimal, dentre outras (FIGUEIRA; MURRELL; CORONEO, 2010; FINE *et al.*, 2004b; FINE; MELLERIO, 2009b, 2015; MELLADO *et al.*, 2018; TONG *et al.*, 1999).

Apesar de rara, a EBC representa um sério problema social devido ao grande impacto na vida dos pacientes e das suas famílias. As condições impostas pela doença são capazes de gerar sintomas físicos limitantes, com prejuízo emocional, alterações comportamentais, afetivas, escolares, além e impasses econômicos (CESTARI *et al.*, 2016; FINE *et al.*, 2005; MARGARI *et al.*, 2010). O aspecto psicossocial da doença ainda tem sido analisado com pouca frequência, refletido no pequeno número de publicações a esse respeito (ANDREOLI *et al.*, 2002; FINE *et al.*, 2005; MARGARI *et al.*, 2010). Alguns estudos mostram elevada frequência de sintomas psiquiátricos entre pacientes com EBC, tais como somatização, ansiedade, obsessão, compulsão, depressão, fobia, ideias paranoicas, hostilidade, raiva, alteração da percepção corporal e distúrbios afetivos (FINE; MELLERIO, 2009a; MARGARI *et al.*, 2010). Além disso, há relato de agravamento clínico que culminou com suicídio ou tentativa de suicídio em uma minoria dos casos (FINE; MELLERIO, 2009a). Não parece haver prejuízo intelectual associado à doença (ANDREOLI *et al.*, 2002).

2.10 TRATAMENTO

Não há, até o presente momento, tratamento específico para a EBC. A abordagem terapêutica está fundamentada, basicamente, na prevenção de lesões, no manejo das complicações e na reabilitação dos pacientes. Devido à grande extensão da doença, capaz de acometer múltiplos órgãos e sistemas, torna-se imprescindível que os pacientes tenham acesso a equipes multidisciplinares. Para o adequado planejamento terapêutico, recomenda-se, inicialmente, o exame global dos pacientes, com avaliação da extensão de superfície corporal

acometida e do tipo de lesão apresentada (bolhas intactas, erosões ou feridas crônicas). Sugere-se que essa avaliação de toda a pele seja realizada ao menos a cada 6 meses, embora alguns pacientes possam ser bastante relutantes (BOEIRA *et al.*, 2013; EL HACHEM *et al.*, 2014; FALABELLA *et al.*, 1999; FINE; MELLERIO, 2015; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013; SHIN *et al.*, 2011).

O principal cuidado diz respeito à prevenção de traumas mecânicos e de infecções. De uma maneira geral, as crianças pequenas são mais vulneráveis e necessitam de atenção especial. Recomenda-se que elas sejam manipuladas de forma gentil, através de técnicas específicas. A área das fraldas deve ser adequadamente protegida por cremes de barreira (à base de óxido de zinco, por exemplo), e as proeminências ósseas devem ser revestidas por espumas próprias para essa finalidade. O uso de roupas justas deve ser evitado, devido ao atrito causado sobre a pele. Crianças maiores também devem vestir roupas e calçados confortáveis, bem como ter as áreas de maior atrito devidamente cobertas e protegidas, como os joelhos e cotovelos, por exemplo (BOEIRA *et al.*, 2013; EL HACHEM *et al.*, 2014; FINE; MELLERIO, 2015; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013).

O manejo das lesões pode variar dependendo dos achados clínicos. Na presença de bolhas intactas, por exemplo, sugere-se a punctura e o esvaziamento, para evitar o aumento da área acometida. A pele deve ser mantida sobre o local, como uma forma de proteção adicional ao uso de curativos estéreis. As crostas e os tecidos desvitalizados, quando presentes, devem ser gentilmente removidos, no intuito de diminuir o processo inflamatório (BOEIRA *et al.*, 2013; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013; MELLERIO *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2011; SPRECHER, 2010).

As lesões devem ser higienizadas com produtos de baixa toxicidade, como soro fisiológico ou água. Algumas medidas como banhos com hipoclorito de sódio em uma concentração de 0,005% ou com ácido acético a 0,25%, além do uso de soluções contendo

clorexidina ou cloreto de benzalcônio podem auxiliar na redução da colonização bacteriana. Em situações específicas, antibióticos tópicos e sistêmicos poderão ser associados, entretanto, o seu uso contínuo é desencorajado devido ao risco de induzir resistência bacteriana (BOEIRA *et al.*, 2013; FALABELLA *et al.*, 1999; FINE; MELLERIO, 2015; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013; LARA-CORRALES *et al.*, 2010; MELLERIO, 2010; MELLERIO *et al.*, 2007; POPE *et al.*, 2012; RASHIDGHAMAT; MCGRATH, 2017; SHIN *et al.*, 2011).

O critério para uso de antibióticos tópicos é a presença de três das seguintes características: lesão crônica que não cicatriza, exsudato em quantidade aumentada, eritema, presença de tecidos friáveis ou necróticos e odor desagradável. A recomendação para uso de antibióticos sistêmicos, por sua vez, baseia-se na presença de pelo menos três dos seguintes achados: lesões extensas, diferença de temperatura maior que 5,4°C, eritema ou edema nas bordas, presença de exsudato em abundância e odor fétido (BOEIRA *et al.*, 2013; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013).

As áreas erodadas devem sempre ser cobertas por curativos, tanto para favorecer a reepitelização, como para promover alívio sintomático e evitar infecções secundárias. A escolha do curativo deve ser individualizada para atender às necessidades de cada lesão, entretanto, apenas aqueles não adesivos podem ser aplicados na pele dos pacientes com EBC. De uma maneira geral, ao se escolher o material mais apropriado, deve-se sempre considerar o tipo de lesão apresentada, a extensão do acometimento, o nível de exsudação, a presença de infecção, a localização, a frequência das trocas e o custo (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE; MELLERIO, 2015; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013; MELLERIO *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, uma grande variedade de curativos vem sendo desenvolvida, cada um com composição e indicações bastante específicas, ideais para pacientes que necessitam

de um manejo personalizado. Atualmente, a espuma de silicone é considerada a cobertura mais completa, pois oferece proteção, absorção do exsudato, hidratação e, em alguns casos, ação antimicrobiana (quando acrescida de aditivos como a prata, por exemplo). Feridas exsudativas, em geral, se beneficiam das espumas e de outras modalidades mais absorptivas. Para feridas mais ressecadas, além da espuma de silicone, há a possibilidade de usar curativos à base de hidrogéis, de celulose bio sintética ou de membranas de silicone macio (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013; MELLERIO *et al.*, 2007).

Quando há necessidade de desbridamento, além dos curativos de hidrogéis e de celulose bio sintética, também podem ser utilizados os hidrocolóides. De uma forma geral, o tratamento precoce das feridas e o uso das coberturas adequadas diminui a necessidade de desbridamento, que pode ser realizado de maneira suave durante o banho. As feridas muito colonizadas ou infectadas podem se beneficiar de uma série de curativos com propriedades antimicrobianas, que é proporcionada pela presença de prata, mel medicinal ou PHMB na sua composição, entre outros. Uma opção mais simples e acessível pode ser construída com gaze embebida em vaselina, muito útil como cobertura primária de feridas crônicas (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE *et al.*, 2008c; FINE; MELLERIO, 2015; MELLERIO *et al.*, 2007). Além disso, novas modalidades de terapia local incluem o uso de bioequivalentes de pele, derivados de cultura de tecidos, que podem ser incluídos no arsenal terapêutico de feridas crônicas e recalcitrantes (FALABELLA *et al.*, 1999; FINE; MELLERIO, 2015; SHIN *et al.*, 2011).

O *status* nutricional dos pacientes possui influência direta na cicatrização das feridas. Assim sendo, alguns deles podem necessitar de suplementação adequada e, eventualmente, auxílio de gastrostomia ou dilatação esofágica (BIRGE, 1995; BOEIRA *et al.*, 2013; FINE; MELLERIO, 2009a; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013; HAYNES, 2006; MELLERIO *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2011; SPRECHER, 2010). Devido à tendência a

desenvolver anemia, recomenda-se o monitoramento dos níveis séricos de hemoglobina que, idealmente, devem manter-se acima de 8g/dL. A suplementação oral ou sistêmica de ferro pode ser necessária, bem como a realização de transfusões sanguíneas. O uso de eritropoietina ou darbepoietina alfa também pode ser considerado nessas situações (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE; MELLERIO, 2009a, 2015; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013; MELLERIO *et al.*, 2007).

O desconforto causado pela hiperidrose plantar, que pode ser bastante problemática nos pacientes com EBS, pode ser minimizado com aplicações tópicas de cloreto de alumínio ou injeções de toxina botulínica. Essa última, inclusive, já foi associada a uma diminuição na formação de bolhas e calosidades, e também no alívio da dor (ABITBOL; ZHOU, 2009; BOEIRA *et al.*, 2013; FINE; MELLERIO, 2015; SWARTLING *et al.*, 2010). A analgesia deve ser prescrita conforme a gravidade do sintoma, podendo ser utilizados medicamentos como paracetamol ou acetaminofen, anti-inflamatórios não esteroidais ou até mesmo opióides. A dor neuropática parece ter boa resposta ao uso da amitriptilina ou da gabapentina (BOEIRA *et al.*, 2013; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013; MELLERIO *et al.*, 2007).

A fenitoína sistêmica, utilizada no passado nas formas EBJ e EBDR por seu efeito inibidor da collagenase, não se mostrou eficaz em estudo controlado e randomizado (CALDWELL-BROWN *et al.*, 1992; FINE; JOHNSON, 1988; FINE; MELLERIO, 2015; LANGAN; WILLIAMS, 2009; RASHIDGHAMAT; MCGRATH, 2017). Alguns outros medicamentos sistêmicos como a tetraciclina (FINE; MELLERIO, 2015; MELLERIO *et al.*, 2007; WEINER *et al.*, 2004), a ciclosporina (FINE; MELLERIO, 2015; TAKAHASHI *et al.*, 2016) e a talidomida (FINE; MELLERIO, 2015; OZANIC BULIC *et al.*, 2005) podem ter algum benefício sintomático para os subtipos EBS e EBD pruriginosa. O uso de retinóides sistêmicos para a prevenção de carcinomas epidermóides cutâneos nos pacientes com EBDR

ainda precisa ser melhor estudado (FINE, 2010a; FINE *et al.*, 2004a; FINE; MELLERIO, 2015; PAI; MARINKOVICH, 2002).

Conforme visto anteriormente, os pacientes mais graves são os mais propensos a complicações cutâneas e extracutâneas. Por esse motivo, é muito importante que eles sejam acompanhados rotineiramente e, preferencialmente, por equipes multidisciplinares. O diagnóstico e o tratamento precoce de tais manifestações, com o auxílio dos profissionais especializados de cada área, são capazes de proporcionar maior chance de cura e também menor risco de sequelas graves (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE; MELLERIO, 2009a, 2009b, 2015; SHIN *et al.*, 2011).

Como perspectivas para o futuro, espera-se que a terapia gênica possa se tornar realidade para todos os pacientes com EBC, especialmente para aqueles com os subtipos mais graves. Há diversos estudos em andamento nessa área que testam muitas possibilidades terapêuticas inovadoras. As técnicas para tratamento local de feridas recentemente estudadas abrangem desde transferência gênica e correção genética com transplante de queratinócitos, até injeção intradérmica de células do estroma mesenquimal, de colágeno humano tipo VII e de fibroblastos alogênicos normais, essa última já sendo testada em ensaios clínicos. Além disso, enxertos de pele e bioequivalentes sintetizados através de engenharia genética tem tido um efeito positivo para os pacientes com EBC que, devido à pouca idade ou a características próprias da doença, não eram candidatos a procedimentos desse tipo (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE, 2010c; FINE; MELLERIO, 2015; RASHIDGHAMAT; MCGRATH, 2017; SHIN *et al.*, 2011).

Uma possibilidade para tratamento sistêmico da EBC, aventada nos últimos anos, é o transplante de células-tronco da medula óssea, especialmente para o subtipo EBDR. Entretanto, diversos ensaios clínicos ainda estão sendo conduzidos na tentativa de provar o real valor e o benefício dessa técnica, considerando-se a sua agressividade e os riscos em

potencial (BOEIRA *et al.*, 2013; FINE; MELLERIO, 2015; KIURU *et al.*, 2010; RASHIDGHAMAT; MCGRATH, 2017; TOLAR *et al.*, 2009; UITTO, 2018; WAGNER *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

A Epidermólise Bolhosa Congênita é um grupo raro de genodermatoses, entretanto, o impacto na vida dos pacientes e dos seus familiares é imensurável. As infecções locais das lesões são complicações comuns da doença e a sepse, embora menos frequente nos dias atuais, permanece como uma das principais causas de mortalidade, correspondendo a 24% dos óbitos em menores de 15 anos com a forma juncional da doença (EBJ) (BRANDLING-BENNETT; MOREL, 2010; FINE *et al.*, 2008b). Apesar da importância de se aprimorar a abordagem terapêutica, poucos avanços foram feitos nesta área. Há escassez de dados na literatura mundial e não há estudos nacionais com enfoque semelhante. Apesar do avanço em terapias que envolvem transplante de células-tronco e terapia gênica, não existe até o momento um protocolo de tratamento para esses pacientes. Enquanto essas novas estratégias não se tornam disponíveis, é necessário maior investimento em pesquisa e desenvolvimento de técnicas para a prevenção das lesões e o adequado controle das suas complicações. Neste sentido, o presente trabalho torna-se de fundamental importância, pois visa à obtenção de dados objetivos e cruciais para o estabelecimento de novas terapias, através da investigação e análise do perfil bacteriológico dos pacientes com EBC e da sua correlação com evolução clínica e história de complicações.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Investigação da presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em pele e mucosa de pacientes com epidermólise bolhosa congênita e seu perfil de resistência antimicrobiana.

4.2 ESPECÍFICOS

- Avaliação das características moleculares dos isolados de *S. aureus*;
- Avaliação da relação entre prevalência de colonização por *S. aureus* e cada subtipo clínico de epidermólise bolhosa congênita confirmado por biologia molecular;
- Avaliação da prevalência dos isolados de *S. aureus* resistentes à metilina;
- Avaliação da relação entre prevalência de isolados *S. aureus* MRSA e cada subtipo clínico de epidermólise bolhosa congênita.

5 MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo transversal, utilizando uma amostra por conveniência.

5.2 CONTEXTO

O presente trabalho consiste na segunda fase do projeto “Perfil microbiológico dos pacientes diagnosticados com Epidermólise Bolhosa Congênita no Serviço de Dermatologia da UFCSPA”.

Após a primeira etapa da pesquisa, que deu origem a um estudo piloto, optou-se por expandir o tamanho amostral e recrutar pacientes com diagnóstico confirmado de epidermólise bolhosa congênita também em outros centros médicos do país.

Para tanto, nosso projeto teve apoio da DEBRA Brasil, associação nacional sem fins lucrativos que visa apoiar pacientes e familiares com a doença, bem como promover campanhas e atividades educacionais que possam levar informação à população geral. Da mesma forma, recebemos importante apoio da ACPAPEB, da Appapeb, da AAPEB-SP e da APPEB-DF, associações de pais e pacientes com epidermólise bolhosa congênita de Santa Catarina, do Paraná, de São Paulo e do Distrito Federal, respectivamente.

5.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

5.3.1 Local

O presente trabalho foi desenvolvido no Ambulatório de Dermatologia Pediátrica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), localizado no Centro de Saúde Santa Marta, em Porto Alegre, e no Hospital da Criança Santo Antônio, da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Outros centros médicos do país atuaram como colaboradores, recrutando e encaminhando amostras e pacientes. Eles estão localizados nos estados de Santa Catarina (através da ACPAPEB), Paraná (através da Appapeb), São Paulo (através da AAPEB-SP), Maranhão (Hospital Infantil Dr. Juvêncio Matos) e no Distrito Federal (através da APPEB-DF).

As análises microbiológicas foram todas processadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). O estudo genético dos pacientes foi realizado no Laboratório de Genética Médica e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

5.3.2 Amostra

Por se tratar de uma doença rara, a amostragem deste estudo foi realizada por conveniência. Todos os pacientes com diagnóstico clínico já firmado de EBC que se encontravam em acompanhamento nos centros de dermatologia de Porto Alegre, Santa Catarina, São Paulo, Maranhão e Distrito Federal foram convidados a participar do estudo, durante suas consultas de rotina ou via contato telefônico. Para os pacientes menores de 18 anos, o convite foi feito aos seus pais ou representantes legais.

Durante um período de dois anos (Outubro de 2015 a Outubro de 2017), foram recrutados 109 voluntários, de ambos os gêneros, sem limitação por faixa etária. Após leitura e posterior assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e de Concessão de Imagem, todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica, coleta de material biológico

para avaliação bacteriológica e genética, e registro fotográfico. Todas essas etapas foram realizadas em um único tempo, durante a consulta médica de rotina, por profissional médico habilitado.

Para o diagnóstico clínico, foi levado em consideração aquele realizado pelo dermatologista assistente, na sua cidade de origem, além da avaliação dos registros fotográficos de cada paciente. Quando houve discordância entre as fotografias e o diagnóstico clínico presumido, foi considerada como diagnóstico final a nossa avaliação.

5.3.3 Critérios de inclusão

Indivíduos com diagnóstico de EBC de qualquer gênero e idade, em acompanhamento médico nos centros de dermatologia envolvidos no estudo.

5.3.4 Critérios de exclusão

Pacientes que não puderam realizar as etapas da avaliação clínica, bacteriológica e genética, além dos que não concordaram em assinar os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e de Concessão de Imagem.

5.4 COLETA DOS DADOS

5.4.1 Avaliação clínica

A avaliação clínica abordou dados de anamnese, exame físico geral e exame dermatológico. Os dados coletados foram devidamente preenchidos em uma ficha clínica

específica (Apêndice A), que foi desenvolvida pela própria equipe pesquisadora para essa finalidade. Nesse mesmo momento, todos os pacientes foram fotografados com ênfase nos achados clínicos relevantes.

5.4.1.1 Anamnese

Os dados investigados nesta primeira etapa da avaliação clínica foram identificação, naturalidade, procedência, idade atual, idade ao diagnóstico, história médica familiar e história médica pessoal pregressa, incluindo revisão geral de sistemas, relatos do início dos sintomas, frequência e facilidade na indução de bolhas, infecções prévias e uso de antimicrobianos tópicos e sistêmicos.

5.4.1.2 Exame físico geral

O exame físico geral consistiu na coleta de dados antropométricos como peso, altura e cálculo do IMC, bem como avaliação de marcos do desenvolvimento infantopuberal.

Nesse momento, também foi realizado o exame da cavidade oral dos pacientes, não somente em busca de alterações na mucosa e tecidos moles, mas também na dentição (presença de hipoplasia do esmalte dentário e de cáries), muito comuns em alguns subtipos de EBC.

5.4.1.3 Exame dermatológico

Como terceira etapa da avaliação clínica, foi realizado o exame dermatológico completo e detalhado. Alterações cutâneas clássicas dos diversos subtipos de EBC foram pesquisadas e registradas na ficha clínica anteriormente mencionada.

Destacam-se como os achados investigados a presença e distribuição de bolhas, mília, cicatrizes atróficas, alterações ungueais (distrofia e anoníquia), tecido de granulação, anormalidades do couro cabeludo, ceratodermia, nevos atípicos, lesões albopapulóides, pseudossindactilia e lesões suspeitas de neoplasia maligna da pele.

5.4.2 Avaliação bacteriológica

A pesquisa bacteriológica deu-se através do cultivo e análise de material biológico coletado por *swabs* de cinco sítios anatômicos previamente determinados: conduto nasal anterior, axilas, cicatriz umbilical, região anal e lesão erosada (esta última, quando presente no momento da consulta). As espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram ativamente pesquisadas em meios próprios para o seu crescimento. As coletas foram realizadas de maneira padronizada, durante as consultas de rotina, por profissional médico capacitado. Os *swabs* utilizados continham meio de conservação para o transporte. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia da UFCSPA para análise.

5.4.2.1 Cultivo bacteriológico

As amostras foram semeadas de forma padronizada em Ágar Sangue (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), para a observação de hemólise, e também em meios seletivos e diferenciais como Ágar Manitol (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), para a detecção de *S.*

aureus, e Ágar MacConkey (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), para a detecção de *Pseudomonas aeruginosa*. O material semeado foi incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 18 a 24 horas.

Os microorganismos que cresceram em Ágar Sal Manitol, que fermentaram o meio produzindo colônias amarelas (características de *S. aureus*), e que apresentaram algum tipo de beta-hemólise no Ágar Sangue, foram então submetidos aos testes de catalase e coagulase, além da coloração de Gram. Foram considerados *S. aureus* os isolados positivos nos três primeiros testes, e que apresentaram agregados de cocos Gram-positivos semelhantes a “cachos de uva” na coloração.

Os isolados que apresentaram colônias lactose negativas e crescimento característico de *Pseudomonas* em Ágar MacConkey, foram submetidos ao teste da oxidase em tiras reagentes e coloração de Gram. Foram considerados *Pseudomonas aeruginosa* os isolados positivos para o teste da oxidase e que se apresentaram como bacilos Gram-negativos na coloração de Gram.

5.4.2.2 Avaliação molecular dos isolados de *Staphylococcus aureus*

As cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas dos cultivos e identificadas através dos testes bioquímicos acima descritos foram também submetidas à avaliação de suas características moleculares. A presença do gene *nuc* foi pesquisada através da técnica convencional da reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme previamente descrito (MUSTAPHA *et al.*, 2016). Resistência à metilina foi confirmada através da investigação do gene *mecA*, através da técnica de PCR convencional (KONDO *et al.*, 2007), e também através do tradicional método Kirby-Bauer, usando cefoxitina (DME, São Paulo, Brasil).

5.4.2.3 Análise de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus aureus*

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de infecções estafilocócicas foi realizado através do método de disco-difusão em ágar, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2015). Os isolados foram testados frente aos seguintes agentes antimicrobianos: Cefoxitina (30µg), Clindamicina (2µg), Eritromicina (15µg), Levofloxacina (5µg), Linezolida (30µg), Penicilina (10 UI), Rifampicina (5µg), Teicoplanina (30µg) e Trimetoprima/Sulfametoxazol (25µg).

5.4.3 Avaliação genética

Foram coletadas amostras de saliva de 91 pacientes, bem como amostras de sangue dos 22 pacientes restantes. O material biológico foi devidamente armazenado e encaminhado ao Laboratório de Genética Médica e Evolução da UFRGS para a extração do DNA e a investigação das mutações. A extração do DNA das amostras de saliva e sangue foi realizada através dos Kits Oragene-DNA OG-500 (DNA Genotek, Canadá) e Pure Link Genomic DNA (Invitrogen, EUA), respectivamente, de acordo com as instruções dos fabricantes.

Para este estudo, foi desenvolvido um painel multigênico através de sequenciamento de nova geração (NGS), que incluiu a análise dos genes *KRT5*, *KRT14*, *PLEC*, *TGM5*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *COL7A1* e *FERMT1*, todos sabidamente envolvidos na origem dos principais tipos e subtipos da EBC. O painel foi desenhado com auxílio do *software* Ion AmpliSeq Designer (Thermo Fisher Scientific, EUA), incluindo um total de 574 amplicons e apresentando um tamanho total de 62.72 Kb.

A biblioteca de amplicons foi preparada através do kit AmpliSeq Library 2.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA). O NGS foi realizado através da tecnologia Ion Torrent, utilizando o

chip de sequenciamento Ion 318™ Chip Kit v2 BC e o kit de reagentes Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA), no equipamento denominado Ion Personal Genome Machine™ System. Os dados gerados pelo Ion Torrent foram então analisados através do *software* Torrent Suite 5.0.5, excluindo-se as leituras de baixa qualidade. As sequências foram alinhadas ao genoma de referência humano hg19. A chamada e a anotação das variantes foram feitas através do *software* Ion Reporter (v 5.10). As variantes foram revisadas e verificadas através do *software* Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) e as leituras mapeadas foram visualizadas através do *software* Integrative Genomics Viewer (IGV).

5.5 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos da Declaração Internacional de Helsinki (1964). O presente projeto foi apresentado ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), recebendo aprovação em 23 de novembro de 2015, através do número de protocolo 48778615.2.0000.5345. A parte envolvendo as análises genéticas foi aprovada através do número de protocolo 59157016.6.0000.5347, da Plataforma Brasil.

Os pacientes portadores de EBC ou seus responsáveis legais foram adequadamente informados sobre o embasamento técnico e científico pertinente ao projeto de pesquisa, por meio dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices B e C). A realização das fotografias e o seu eventual uso para fins técnico-científicos foram permitidos através da leitura e posterior assinatura do Termo de Concessão de Imagem (Apêndices D e E).

6 REFERÊNCIAS

- ABAHUSSEIN, A. A. *et al.* Epidermolysis bullosa in the eastern province of Saudi Arabia. **International Journal of Dermatology**, v. 32, n. 8, p. 579–81, 1993.
- ABITBOL, R. J.; ZHOU, L. H. Treatment of epidermolysis bullosa simplex, Weber-Cockayne type, with botulinum toxin type A. **Archives of Dermatology**, v. 145, n. 1, p. 13–5, 2009.
- ABU SA'D, J. *et al.* Molecular epidemiology of hereditary epidermolysis bullosa in a Middle Eastern population. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 4, p. 777–781, 2006.
- ALMAANI, N.; MELLERIO, J. E. Genitourinary tract involvement in epidermolysis bullosa. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 2, p. 343–346, 2010.
- ANDREOLI, E. *et al.* Epidermolysis bullosa. Psychological and psychosocial aspects. **Dermatology and Psychosomatics / Dermatologie und Psychosomatik**, v. 3, n. 2, p. 77–81, 2002.
- ARIN, M. J. *et al.* Biologia dos queratinócitos. In: CALLEN, J.P. *et al.* (Eds.). **Tratado de Dermatologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 825–836.
- AUMAILLEY, M. *et al.* Molecular basis of inherited skin-blistering disorders, and therapeutic implications. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 24, p. 1–21, 2006.
- BERSON, S. *et al.* Junctional epidermolysis bullosa of the larynx. **Annals of Otolaryngology & Rhinology**, v. 101, n. 10, p. 861–865, 1992.
- BHATTA, D. R. *et al.* Association of Panton Valentine Leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: a matter of concern for community infections (a hospital based prospective study). **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 199, 2016.
- BIRGE, K. Nutrition management of patients with epidermolysis bullosa. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 95, n. 5, p. 575–579, 1995.
- BOEIRA, V. L. S. Y. *et al.* Inherited epidermolysis bullosa: clinical and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 2, p. 185–198, 2013.
- BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 244–269, 2001.
- BRANDLING-BENNETT, H. A.; MOREL, K. D. Common wound colonizers in patients with epidermolysis bullosa. **Pediatric Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 25–28, 2010.
- BREUER, K. *et al.* *Staphylococcus aureus*: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. **The British Journal of Dermatology**, v. 147, n. 1, p. 55–61, 2002.
- BRUCKNER-TUDERMAN, L. Dystrophic epidermolysis bullosa: pathogenesis and clinical

features. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 107–114, 2010.

BURGESON, R. E.; CHRISTIANO, A. M. The dermal-epidermal junction. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 651–8, 1997.

CALDWELL-BROWN, D. *et al.* Lack of efficacy of phenytoin in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 3, p. 163–167, 1992.

CASTORI, M. *et al.* Herlitz junctional epidermolysis bullosa: laminin-5 mutational profile and carrier frequency in the Italian population. **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 1, p. 38–44, 2008.

CAVALCANTE, F. S. *et al.* Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients on admission to a teaching hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 11, p. 1190–1193, 2017.

CESTARI, T. *et al.* Translation, cross-cultural adaptation and validation of the quality of life evaluation in epidermolysis bullosa instrument in Brazilian portuguese. **International Journal of Dermatology**, v. 55, n. 2, p. e94–e99, 2016.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, 2009.

CHAN, S. M. H. *et al.* Nephro-urological complications of epidermolysis bullosa in paediatric patients. **British Journal of Dermatology**, v. 156, n. 1, p. 143–147, 2007.

CHEN, A. E. *et al.* Discordance between *Staphylococcus aureus* nasal colonization and skin infections in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 3, p. 244–246, 2009.

CHEN, C. *et al.* Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using simultaneous detection of *mecA*, *nuc*, and *femB* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). **Current Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 965–971, 2017.

CUTTING, K. F.; WHITE, R. Defined and refined: criteria for identifying wound infection revisited. **British Journal of Community Nursing**, v. 9, n. Sup1, p. S6–S15, 2004.

DĂNESCU, S. *et al.* Epidemiology of inherited epidermolysis bullosa in Romania and genotype-phenotype correlations in patients with dystrophic epidermolysis bullosa. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 5, p. 899–903, 2015.

DANG, N. *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 Dermato Venereologica**, v. 88, n. 5, p. 438–448, 2008.

DAVIS, K. A. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 6, p. 776–782, 2004.

DELEO, F. R. *et al.* Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1557–68, 2010.

DESTRO, M.; WALLOW, I. H.; BRIGHTBILL, F. S. Recessive dystrophic epidermolysis

bullosa. **Archives of Ophthalmology**, v. 105, n. 9, p. 1248–52, 1987.

EDWARDS, R.; HARDING, K. G. Bacteria and wound healing. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 91–6, 2004.

EL HACHEM, M. *et al.* Multicentre consensus recommendations for skin care in inherited epidermolysis bullosa. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 9, n. 1, p. 76, 2014.

ELLIS, M. W. *et al.* Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 7, p. 971–979, 2004.

EPSTEIN, E. H. Molecular genetics of epidermolysis bullosa. **Science**, v. 256, n. 5058, p. 799–804, 1992.

FALABELLA, A. F. *et al.* The use of tissue-engineered skin (Apligraf) to treat a newborn with epidermolysis bullosa. **Archives of Dermatology**, v. 135, n. 10, p. 1219–22, 1999.

FIGUEIRA, E. C.; MURRELL, D. F.; CORONEO, M. T. Ophthalmic involvement in inherited epidermolysis bullosa. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 143–152, 2010.

FINE, J.-D. Epidermolysis bullosa. Clinical aspects, pathology, and recent advances in research. **International Journal of Dermatology**, v. 25, n. 3, p. 143–57, 1986.

FINE, J.-D. *et al.* Autosomal recessive epidermolysis bullosa simplex. Generalized phenotypic features suggestive of junctional or dystrophic epidermolysis bullosa, and association with neuromuscular diseases. **Archives of Dermatology**, v. 125, n. 7, p. 931–8, 1989.

FINE, J.-D. *et al.* **Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry**. 1st. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1999.

FINE, J.-D. *et al.* Chemoprevention of squamous cell carcinoma in recessive dystrophic epidermolysis bullosa: results of a phase 1 trial of systemic isotretinoin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 4, p. 563–571, 2004a.

FINE, J.-D. *et al.* Eye involvement in inherited epidermolysis bullosa: experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry. **American Journal of Ophthalmology**, v. 138, n. 2, p. 254–262, 2004b.

FINE, J.-D. *et al.* Inherited epidermolysis bullosa and the risk of death from renal disease: experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 44, n. 4, p. 651–660, 2004c.

FINE, J.-D. *et al.* Impact of inherited epidermolysis bullosa on parental interpersonal relationships, marital status and family size. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 5, p. 1009–1014, 2005.

FINE, J.-D. *et al.* Tracheolaryngeal complications of inherited epidermolysis bullosa: cumulative experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry. **The Laryngoscope**, v. 117, n. 9, p. 1652–1660, 2007.

FINE, J.-D. *et al.* Gastrointestinal complications of inherited epidermolysis bullosa:

- cumulative experience of the National Epidermolysis Bullosa Registry. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 46, n. 2, p. 147-158, 2008.
- FINE, J.-D. *et al.* Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa. **The Journal of Pediatrics**, v. 152, n. 2, p. 276–280.e2, 2008b.
- FINE, J.-D. *et al.* The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 6, p. 931–950, 2008c.
- FINE, J.-D. *et al.* The risk of cardiomyopathy in inherited epidermolysis bullosa. **The British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 3, p. 677–82, 2008d.
- FINE, J.-D. *et al.* Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: The National EB Registry experience, 1986-2006. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 2, p. 203–211, 2009.
- FINE, J.-D. Inherited epidermolysis bullosa: past, present, and future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1194, n. 1, p. 213–222, 2010a.
- FINE, J.-D. Inherited epidermolysis bullosa. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, p. 12, 2010b.
- FINE, J.-D. Inherited epidermolysis bullosa: recent basic and clinical advances. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 22, n. 4, p. 453–458, 2010c.
- FINE, J.-D. *et al.* Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 70, n. 6, p. 1103–1126, 2014.
- FINE, J.-D. Epidemiology of inherited epidermolysis bullosa based on incidence and prevalence estimates from the National Epidermolysis Bullosa Registry. **JAMA Dermatology**, v. 152, n. 11, p. 1231–1238, 2016.
- FINE, J.-D.; JOHNSON, L. Efficacy of systemic phenytoin in the treatment of junctional epidermolysis bullosa. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 9, p. 1402–1406, 1988.
- FINE, J.-D.; MELLERIO, J. E. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa part II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 3, p. 387–402, 2009a.
- FINE, J.-D.; MELLERIO, J. E. Extracutaneous manifestations and complications of inherited epidermolysis bullosa part I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 3, p. 367–384, 2009b.
- FINE, J.-D.; MELLERIO, J. E. Epidermólise bolhosa. In: CALLEN, J.P *et al.* (Eds.). **Tratado de Dermatologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 501–514.
- FISHOVITZ, J. *et al.* Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **IUBMB Life**, v. 66, n. 8, p. 572–577, 2014.
- FUCHS, E. Beauty is skin deep: the fascinating biology of the epidermis and its appendages. **Harvey Lectures**, v. 94, p. 47–77, 1998.
- FURUE, M. *et al.* Pretibial epidermolysis bullosa. Successful therapy with a skin graft.

Archives of Dermatology, v. 122, n. 3, p. 310–3, 1986.

GARCIA-DOVAL, I.; DAVILA-SEIJO, P.; LANGAN, S. M. Updated systematic review of randomized controlled trials of treatments for inherited forms of epidermolysis bullosa. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 38, n. 1, p. 92–4, 2013.

GONZALEZ, C.; ROTH, R. Laryngotracheal involvement in epidermolysis bullosa. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 17, n. 3, p. 305–311, 1989.

GORWITZ, R. J. *et al.* Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 9, p. 1226–1234, 2008.

GOSS, C. H.; MUHLEBACH, M. S. Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 10, n. 5, p. 298–306, 2011.

GRANEK, H.; BADEN, H. P. Corneal involvement in epidermolysis bullosa simplex. **Archives of Ophthalmology**, v. 98, n. 3, p. 469–472, 1980.

HAMADA, T. *et al.* Genotype-phenotype correlation in skin fragility-ectodermal dysplasia syndrome resulting from mutations in plakophilin 1. **Experimental Dermatology**, v. 11, n. 2, p. 107–114, 2002.

HAS, C.; FISCHER, J. Inherited epidermolysis bullosa: New diagnostics and new clinical phenotypes. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29679399> /> Acesso em: 10 jan. 2019. doi:10.1111/exd.13668

HASHIMOTO, K.; MATSUMOTO, M.; IACOBELLI, D. Transient bullous dermolysis of the Newborn. **Archives of Dermatology**, v. 121, n. 11, p. 1429–1438, 1985.

HAYNES, L. Nutritional support for children with epidermolysis bullosa. **British Journal of Nursing**, v. 15, n. 20, p. 1097–101, 2006.

HETEM, D. J.; BONTEN, M. J. M. Clinical relevance of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infection**, v. 85, n. 4, p. 249–256, 2013.

HINTNER, H. *et al.* Immunofluorescence mapping of antigenic determinants within the dermal-epidermal junction in mechanobullous diseases. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 76, p. 113–8, 1981.

HON, K. L. *et al.* Clinical features and *Staphylococcus aureus* colonization/infection in childhood atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 27, n. 3, p. 235–240, 2016.

HORN, H. M. *et al.* The prevalence of epidermolysis bullosa in Scotland. **The British Journal of Dermatology**, v. 136, n. 4, p. 560–4, 1997.

HORN, H. M.; TIDMAN, M. J. The clinical spectrum of dystrophic epidermolysis bullosa. **The British Journal of Dermatology**, v. 146, n. 2, p. 267–74, 2002.

IDA, J. B. *et al.* Upper airway complications of junctional epidermolysis bullosa. **The Journal of Pediatrics**, v. 160, n. 4, p. 657–661.e1, 2012.

INABA, Y. *et al.* A study on the estimation of prevalence of epidermolysis bullosa in Japan. **The Japanese Journal of Dermatology**, v. 99, n. 9, p. 1021–6, 1989.

- KĘDZIERSKA, A. *et al.* Susceptibility testing and resistance phenotype detection in *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with atopic dermatitis, with apparent and recurrent skin colonization. **British Journal of Dermatology**, v. 159, n. 6, p. 1290–1299, 2008.
- KENNA, M. A.; STOOL, S. E.; MALLORY, S. B. Junctional epidermolysis bullosa of the larynx. **Pediatrics**, v. 78, n. 1, p. 172–4, 1986.
- KHO, Y. C. *et al.* Epidemiology of epidermolysis bullosa in the antipodes. **Archives of Dermatology**, v. 146, n. 6, p. 635–40, 2010.
- KIURU, M. *et al.* Bone marrow stem cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 2, p. 371–382, 2010.
- KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 505–20, 1997.
- KONDO, Y. *et al.* Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 264–74, 2007.
- KOOI-POL, M. M. *et al.* High genetic diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients with epidermolysis bullosa. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 463–466, 2012.
- KOSS-HARNES, D. *et al.* A site-specific plectin mutation causes dominant epidermolysis bullosa simplex oagna: two identical de novo mutations. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, n. 1, p. 87–93, 2002.
- KOSTER, M. I. *et al.* Desenvolvimento e manutenção da pele. In: CALLEN, J.P. *et al.* (Eds.). **Tratado de Dermatologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 55–64.
- KRETKOWSK, R. C. Urinary tract involvement in epidermolysis bullosa. **Pediatrics**, v. 51, n. 5, p. 938–41, 1973.
- KYROVA, J. *et al.* Epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. Review of the literature and a case report. **Journal of Dermatological Case Reports**, v. 10, n. 3, p. 39–48, 2016.
- LANGAN, S. M.; WILLIAMS, H. C. A systematic review of randomized controlled trials of treatments for inherited forms of epidermolysis bullosa. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 34, n. 1, p. 20–25, 2009.
- LARA-CORRALES, I. *et al.* Principles of wound care in patients with epidermolysis bullosa. **Pediatric Dermatology**, v. 27, n. 3, p. 229–237, 2010.
- LAUDERDALE, T.L. Y. *et al.* Carriage rates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) depend on anatomic location, the number of sites cultured, culture methods, and the distribution of clonotypes. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 12, p. 1553–1559, 2010.
- LIPNHARSKI, C. *et al.* Colonization by *S. aureus* increases the EASI and the number of appointments by patients with atopic dermatitis: cohort with 93 patients. **Anais Brasileiros de**

Dermatologia, v. 88, n. 4, p. 518–521, 2013.

LOWY, F. D. Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–32, 1998.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265–73, 2003.

LURIA, S. *et al.* Hand surgery for dystrophic epidermolysis bullosa. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, v. 34, n. 7, p. 710–714, 2014.

MAHAJAN, V. K. *et al.* Kindler syndrome. **Orphanet Encyclopedia**. p. 1-17. 2005.

MAHMOODZADEH HOSSEINI, H. *et al.* Distribution of high-level mupirocin resistance among clinical MRSA. **Journal of Chemotherapy**, v. 29, n. 4, p. 215–219, 2017.

MANN, J. F. *et al.* The spectrum of renal involvement in epidermolysis bullosa dystrophica hereditaria: report of two cases. **American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 11, n. 5, p. 437–41, 1988.

MARGARI, F. *et al.* Psychiatric symptoms and quality of life in patients affected by epidermolysis bullosa. **Journal of Clinical Psychology in Medical Settings**, v. 17, n. 4, p. 333–339, 2010.

MARIN-BERTOLIN, S. *et al.* Surgical management of hand contractures and pseudosyndactyly in dystrophic epidermolysis bullosa. **Annals of Plastic Surgery**, v. 43, p. 555–559, 1999.

MARTINEZ, A. E.; ALLGROVE, J.; BRAIN, C. Growth and pubertal delay in patients with epidermolysis bullosa. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 2, p. 357–9, 2010.

MCGRATH, J. A. *et al.* Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. **Nature Genetics**, v. 17, n. 2, p. 240–244, 1997.

MCGRATH, J. A.; SCHOFIELD, O. M. V.; EADY, R. A. J. Epidermolysis bullosa pruriginosa: dystrophic epidermolysis bullosa with distinctive clinicopathological features. **British Journal of Dermatology**, v. 130, n. 5, p. 617–625, 1994.

MCKAY, H. A. *et al.* Peak bone mineral accrual and age at menarche in adolescent girls: a 6-year longitudinal study. **The Journal of Pediatrics**, v. 133, n. 5, p. 682–7, 1998.

MCKENNA, K. E.; WALSH, M. Y.; BINGHAM, E. A. Epidermolysis bullosa in Northern Ireland. **The British Journal of Dermatology**, v. 127, n. 4, p. 318–21, 1992.

MELLADO, F. *et al.* Ophthalmologic approach in epidermolysis bullosa. **Cornea**, v. 37, n. 4, p. 442–447, 2018.

MELLERIO, J. E. *et al.* Medical management of epidermolysis bullosa: proceedings of the IInd International Symposium on Epidermolysis Bullosa, Santiago, Chile, 2005. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 8, p. 795–800, 2007.

MELLERIO, J. E. Infection and colonization in epidermolysis bullosa. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 2, p. 267–269, 2010.

MELVILLE, C. *et al.* Fatal cardiomyopathy in dystrophic epidermolysis bullosa. **The British**

Journal of Dermatology, v. 135, n. 4, p. 603–6, 1996.

MERMEL, L. A. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* colonization at different body sites: a prospective, quantitative analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1119–1121, 2011.

MIMICA, M. J. *Staphylococcus aureus* and cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 11, n. 1, p. 71, 2012.

MORAN, G. J. *et al.* Methicillin-Resistant *S. aureus* infections among patients in the Emergency Department. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 7, p. 666–674, 2006.

MORELLI, S. *et al.* Reversible acute global left ventricular dysfunction in a patient with autosomal recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **International Journal of Cardiology**, v. 79, n. 2–3, p. 321–3, 2001.

MOY, J. A. *et al.* Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus* after long-term treatment of patients with epidermolysis bullosa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 22, n. 5 Pt 1, p. 893–5, 1990.

MUHLEBACH, M. S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 23, n. 6, p. 544–550, 2017.

MUSTAPHA, M. *et al.* Phenotypic and genotypic detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hunting dogs in Maiduguri metropolitan, Borno State, Nigeria. **Veterinary World**, v. 9, n. 5, p. 501–506, 2016.

MUTLUBAS, F. *et al.* Epidermolysis bullosa dystrophica with renal failure due to secondary amiloidosis. **Indian Journal of Nephrology**, v. 17, n. 4, p. 178–181, 2007.

NAKANO, A. *et al.* Junctional epidermolysis bullosa in the Middle East: clinical and genetic studies in a series of consanguineous families. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 46, n. 4, p. 510–6, 2002.

NIEMI, K.-M. Epidermolysis bullosa simplex associated with muscular dystrophy with recessive inheritance. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 4, p. 551–554, 1988.

OLAISEN, B.; GEDDE-DAHL, T. GPT – Epidermolysis bullosa simplex (EBS Ogná) linkage in man. **Human Heredity**, v. 23, n. 3, p. 189–196, 1973.

OLIVEIRA, Z. N. P. DE *et al.* Imunomapeamento nas epidermólises bolhosas hereditárias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 6, p. 856–861, 2010.

OZANIC BULIC, S. *et al.* Thalidomide in the management of epidermolysis bullosa pruriginosa. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 6, p. 1332–1334, 2005.

PAI, S.; MARINKOVICH, M. P. Epidermolysis bullosa: new and emerging trends. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 3, n. 6, p. 371–80, 2002.

PALLER, A. S. *et al.* The microbiome in patients with atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 1, p. 26–35, 2019.

PAVICIĆ, Z. *et al.* Occurrence of hereditary bullous epidermolyses in Croatia. **Pediatric Dermatology**, v. 7, n. 2, p. 108–10, 1990.

PEARSON, R. W. Studies on the pathogenesis of epidermolysis bullosa. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 39, p. 551–75, 1962.

PETRONIUS, D. *et al.* A comparative study of immunohistochemistry and electron microscopy used in the diagnosis of epidermolysis bullosa. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 25, n. 3, p. 198–203, 2003.

PETRY, V. *et al.* Prevalence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance in patients with atopic dermatitis in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Dermatology**, v. 53, n. 6, p. 731–735, 2014.

PHILLIPS, R. J. *et al.* Laryngo-onycho-cutaneous syndrome: an inherited epithelial defect. **Archives of Disease in Childhood**, v. 70, p. 319–326, 1994.

POPE, E. *et al.* A consensus approach to wound care in epidermolysis bullosa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 5, p. 904–917, 2012.

POZO, J.; ARGENTE, J. Delayed puberty in chronic illness. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 73–90, 2002.

POZZI, C. *et al.* Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002626, 2012.

PULKKINEN, L.; UITTO, J. Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. **Matrix biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 18, n. 1, p. 29–42, 1999.

PUVABANDITSIN, S. Junctional epidermolysis bullosa associated with congenital localized absence of skin, and pyloric atresia in two newborn siblings. **Article in Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 2, p. 330–335, 2001.

RANGEL, S. M.; PALLER, A. S. Bacterial colonization, overgrowth, and superinfection in atopic dermatitis. **Clinics in Dermatology**, v. 36, n. 5, p. 641–647, 2018.

RASHIDGHAMAT, E.; MCGRATH, J. A. Novel and emerging therapies in the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Intractable & Rare Diseases Research**, v. 6, n. 1, p. 6–20, 2017.

ROGNONI, E.; WATT, F. M. Skin cell heterogeneity in development, wound healing, and cancer. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 9, p. 709–722, 2018.

ROUAN, F. *et al.* Epidermolysis bullosa: novel and de novo premature termination codon and deletion mutations in the plectin gene predict late-onset muscular dystrophy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 2, p. 381–387, 2000.

SANTOS, H. B. *et al.* Prevalence and acquisition of MRSA amongst patients admitted to a tertiary-care hospital in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 328, 2010.

SAUNDERSON, R. B. *et al.* A retrospective cohort study evaluating the accuracy of clinical diagnosis compared to immunofluorescence and electron microscopy in children with inherited epidermolysis bullosa. **British Journal of Dermatology**, 2019. Disponível em: <<https://www.bjdonline.com/article/a-retrospective-cohort-study-evaluating-the-accuracy-of-clinical-diagnosis-compared-with-immunofluorescence-and-electron-microscopy-in-children>>

with-inherited-epidermolysis-bullosa/> Acesso em: 10 fev. 2019.

SHIN, K. C. *et al.* The use of cultured allogenic keratinocyte grafting in a patient with epidermolysis bullosa simplex. **Annals of Dermatology**, v. 23, n. Suppl 3, p. S393-7, 2011.

SHINKUMA, S. *et al.* Epidermolysis bullosa in Japan. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 2, p. 431–432, 2010.

SIBBALD, R. G.; WOO, K.; AYELLO, E. A. Increased bacterial burden and infection: the story of NERDS and STONES. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 19, n. 8, p. 447- 61; quiz 461–3, 2006.

SIDWELL, R. U.; YATES, R.; ATHERTON, D. Dilated cardiomyopathy in dystrophic epidermolysis bullosa. **Archives of Disease in Childhood**, v. 83, p. 59–63, 2000.

SINGER, H. M. *et al.* Wound culture isolated antibiograms and caregiver-reported skin care practices in children with epidermolysis bullosa. **Pediatric Dermatology**, v. 35, n. 1, p. 92–96, 2018.

SPRECHER, E. Epidermolysis bullosa simplex. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 23–32, 2010.

STEFANI, S.; VARALDO, P. E. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1179–86, 2003.

STÜRENBURG, E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. **German Medical Science: GMS e-journal**, v. 7, Doc06, p. 1-19, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2716550/> Acesso em: 17 out. 2018.

SUDHAHARAN, S. *et al.* Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of *nuc* and *mecA* genes among clinical isolates of *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 9, n. 8, p. DC06-9, 2015.

SWARTLING, C. *et al.* Botulinum toxin in the treatment of sweat-worsened foot problems in patients with epidermolysis bullosa simplex and pachyonychia congenita. **The British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 5, p. 1072–6, 2010.

TADINI, G. *et al.* The Italian Registry of hereditary epidermolysis bullosa. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 140, n. 4, p. 359–72, 2005.

TAKAHASHI, T. *et al.* Dystrophic epidermolysis bullosa pruriginosa successfully treated with immunosuppressants. **The Journal of Dermatology**, v. 43, n. 11, p. 1391–1392, 2016.

TERRILL, P. J. *et al.* The surgical management of dystrophic epidermolysis bullosa (excluding the hand). **British Journal of Plastic Surgery**. v. 45, n. p. 426-234, 1992.

THOMPSON, J. W.; AHMED, A. R.; DUDLEY, J. P. Epidermolysis bullosa dystrophica of the larynx and trachea. **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**, v. 89, n. 5, p. 428–429, 1980.

TOLAR, J. *et al.* Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow

cells. **Blood**, v. 113, n. 5, p. 1167–1174, 2009.

TOMI, N. S.; KRÄNKE, B.; ABERER, E. Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 1, p. 67–72, 2005.

TONG, L. *et al.* The eye in epidermolysis bullosa. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 83, n. 3, p. 323–6, 1999.

TOSTI, A.; DE FARIAS, D. C.; MURRELL, D. F. Nail involvement in epidermolysis bullosa. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 153–157, 2010.

TOSTI, A.; DUQUE-ESTRADA, B.; MURRELL, D. F. Alopecia in epidermolysis bullosa. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 165–169, 2010.

TRENGOVE, N. J. *et al.* Qualitative bacteriology and leg ulcer healing. **Journal of Wound Care**, v. 5, n. 6, p. 277–80, 1996.

UITTO, J. The conundrum of allogeneic bone marrow transplantation for epidermolysis bullosa. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 5, p. 1029–1031, 2018.

VAN DER KOOI-POL, M. M. *et al.* High anti-staphylococcal antibody titers in patients with epidermolysis bullosa relate to long-term colonization with alternating types of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 3, p. 847–850, 2013a.

VAN DER KOOI-POL, M. M. *et al.* Topography of distinct *Staphylococcus aureus* types in chronic wounds of patients with epidermolysis bullosa. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67272, 2013b.

VAN DER KOOI-POL, M. M. *et al.* Host–pathogen interactions in epidermolysis bullosa patients colonized with *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 2, p. 195–203, 2014.

VAN DUIN, D.; PATERSON, D. L. Multidrug-resistant bacteria in the community: trends and lessons learned. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 377–390, 2016.

VANDERGRIF, T. W.; BERGSTRESSER, P. R. Anatomia e fisiologia. In: CALLEN, J. P. *et al.* (Eds.). **Tratado de Dermatologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 43–53.

VARKI, R. *et al.* Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype-genotype correlations in the dystrophic subtypes. **Journal of Medical Genetics**, v. 44, n. 3, p. 181–192, 2007.

VÁZQUEZ, N. M. *et al.* Emerging mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care children’s hospital in Argentina. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 117, n. 1, p. 48–51, 2019.

VIVONI, A. M. *et al.* Clonal composition of *Staphylococcus aureus* isolates at a Brazilian university hospital: identification of international circulating lineages. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1686–1691, 2006.

VON EIFF, C. *et al.* Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **New**

England Journal of Medicine, v. 344, n. 1, p. 11–16, 2001.

WAGNER, J. E. *et al.* Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 7, p. 629–639, 2010.

WEINER, M. *et al.* Tetracycline and epidermolysis bullosa simplex: a double-blind, placebo-controlled, crossover randomized clinical trial. **The British Journal of Dermatology**, v. 150, n. 3, p. 613–4, 2004.

WEISS, G. Iron and anemia of chronic disease. **Kidney International**. v. 55, Suppl 69, p. S-12 - S-17, 1999.

WERTHEIM, H. F. *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751–762, 2005.

WIEBE, C. B.; LARJAVA, H. S. Abnormal deposition of type VII collagen in Kindler syndrome. **Archives of Dermatological Research**, v. 291, n. 1, p. 6–13, 1999.

WILDER, E. G. *et al.* Spectrum of orocutaneous disease associations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 77, n. 5, p. 809–830, 2017.

WITTE, W. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: what do we need to know? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 17–25, 2009.

WRIGHT, J. T. Oral manifestations in the epidermolysis bullosa spectrum. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 159–64, 2010.

WRIGHT, J. T.; FINE, J. D.; JOHNSON, L. Hereditary epidermolysis bullosa: oral manifestations and dental management. **Pediatric Dentistry**, v. 15, n. 4, p. 242–8, 1993.

WRIGHT, J. T.; FINE, J. D.; JOHNSON, L. Dental caries risk in hereditary epidermolysis bullosa. **Pediatric Dentistry**, v. 16, n. 6, p. 427–32, 1994.

YU, V. L. *et al.* *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. **New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 2, p. 91–96, 1986.

YUEN, W. Y. *et al.* Herlitz junctional epidermolysis bullosa: diagnostic features, mutational profile, incidence and population carrier frequency in the Netherlands. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 6, p. 1314–1322, 2011.

YUEN, W. Y. *et al.* Long-term follow-up of patients with Herlitz-type junctional epidermolysis bullosa. **British Journal of Dermatology**, v. 167, n. 2, p. 374–382, 2012.

7 ARTIGO ORIGINAL

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elevada prevalência bacteriana encontrada nos pacientes portadores de EBC neste estudo vem confirmar a hipótese de que, devido ao extenso comprometimento da barreira cutânea, associada a deficiências imunológicas, essa população poderia apresentar taxas de colonização mais altas, bem como um número maior de complicações infecciosas.

De uma maneira geral, há escassez de dados na literatura acerca do perfil de colonização microbiológica dos pacientes com EBC (BRANDLING-BENNETT; MOREL, 2010; MELLERIO, 2010; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2014) e, até onde sabemos, este foi o primeiro estudo brasileiro desta natureza. A elevada frequência do *S. aureus* na nossa amostra, principal agente microbiano encontrado colonizando todos os cinco sítios pesquisados, é consistente com achados de estudos internacionais prévios semelhantes (BRANDLING-BENNETT; MOREL, 2010; FINE; MELLERIO, 2009a; KOOI-POL *et al.*, 2012; MELLERIO, 2010; SINGER *et al.*, 2018; VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2013a, 2014). A alta taxa de colonização por isolados *S. aureus* MRSA identificados neste estudo, consistentes com dados de um estudo americano também em pacientes com EBC (SINGER *et al.*, 2018), foram surpreendentemente superiores às identificadas na população geral por estudos nacionais prévios (CAVALCANTE *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2010).

Os resultados reportados neste estudo, além de confirmar suspeitas prévias, vêm também reforçar uma preocupação geral relacionada ao aumento das taxas de resistência antimicrobiana e do surgimento e aumento da frequência de bactérias multirresistentes na população. Quando transportamos essa realidade para o cenário da EBC, tais achados se tornam ainda mais alarmantes, considerando a extrema vulnerabilidade e propensão a complicações graves inerentes aos pacientes portadores da doença.

Nesse sentido, acreditamos ser de absoluta relevância o conhecimento do perfil microbiológico desses pacientes. Através dele, será possível o desenvolvimento de protocolos terapêuticos mais eficazes, objetivando a implementação de técnicas mais adequadas de descolonização e tratamento das complicações infecciosas. Dessa forma, será possível prevenir de maneira adicional o desenvolvimento de feridas crônicas e, acima de tudo, minimizar a indução de resistência antimicrobiana decorrente do uso indiscriminado de tais agentes.

Diferentemente do que ocorre na população geral, alguns estudos demonstraram uma tendência de os pacientes com EBC serem colonizados por múltiplas cepas diferentes de *S. aureus*, algumas habitando locais muito próximos dentro de uma mesma lesão de pele. Essa particularidade, além de interessante do ponto de vista biológico, reforça uma preocupação devido ao risco em potencial que esses patógenos apresentam de causar infecções estafilocócicas graves (VAN DER KOOI-POL *et al.*, 2013b, 2014). Como perspectivas futuras, pretendemos complementar a avaliação molecular dos isolados de *S. aureus*, para que possamos diferenciar as cepas presentes na amostra e analisar sua frequência e distribuição topográfica.

A mupirocina é um agente antimicrobiano tópico amplamente utilizado para descolonização de pacientes e tratamento de infecções cutâneas na população geral e, especialmente na população com EBC. Há divergências na literatura em relação ao possível benefício do seu uso contínuo e prolongado nesses pacientes, à despeito da indução de resistência bacteriana (BOEIRA *et al.*, 2013; FALABELLA *et al.*, 1999; FINE; MELLERIO, 2015; GARCIA-DOVAL; DAVILA-SEIJO; LANGAN, 2013; LARA-CORRALES *et al.*, 2010; MELLERIO, 2010; MELLERIO *et al.*, 2007; MOY *et al.*, 1990; POPE *et al.*, 2012; RASHIDGHAMAT; MCGRATH, 2017; SHIN *et al.*, 2011; SINGER *et al.*, 2018). Por se tratar de uma ferramenta terapêutica importante, e também devido ao fato de cepas resistentes

a ela estarem emergindo (HETEM; BONTEN, 2013; MAHMOODZADEH HOSSEINI *et al.*, 2017; SINGER *et al.*, 2018; VÁZQUEZ *et al.*, 2019), consta também nos nossos planos futuros incluir a análise do perfil de susceptibilidade dos nossos isolados de *S. aureus* em relação a esse agente.

APÊNDICES

APÊNDICE A – FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

1. NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO:
2. NOME:
3. DIAGNÓSTICO CLÍNICO:
4. IDADE:
5. DATA DE NASCIMENTO:
6. LOCAL DE NASCIMENTO:
7. NOME DO PAI:
8. IDADE DO PAI QUANDO MÃE ENGRAVIDOU:
9. NOME DA MÃE:
10. IDADE DA MÃE QUANDO ENGRAVIDOU:
11. CONSANGUINIDADE ENTRE OS PAIS?
12. NÚMERO DE IRMÃOS:
13. OUTRO FAMILIAR COM EBC? QUANTOS? QUAL O GRAU DE PARENTESCO?
14. IDADE DO DIAGNÓSTICO:
15. PESO:
16. ALTURA:
17. IMC:
18. IDADE DE INÍCIO DAS BOLHAS: AO NASCIMENTO () // PRIMEIROS MESES DE VIDA ()
19. DISTRIBUIÇÃO DAS BOLHAS: GENRALIZADA () // LOCALIZADA ()
20. ACHADOS CUTÂNEOS: BOLHAS () // MÍLIA () // CICATRIZ ATRÓFICA () // DISTROFIA OU AUSÊNCIA DE UNHAS () // TECIDO DE GRANULAÇÃO () // ANORMALIDADE DO COURO CABELUDO () // CERATODERMIA () //

NEVOS ATÍPICOS () // LESÕES ALBOPAPULÓIDES () //

PSEUDOSINDACTILIA ()

21. INDUÇÃO DAS BOLHAS: BAIXA () // VARIÁVEL () // ALTA ()

22. ANEMIA: SIM () Hb // NÃO ()

23. RETARDO DO CRESCIMENTO: SIM () // NÃO ()

24. CAVIDADE ORAL: ANORMALIDADES DOS TECIDOS MOLES SIM () NÃO () // HIPOPLASIA DO ESMALTE () SIM NÃO () // CÁRIES SIM () NÃO ()

25. ANORMALIDADES DO TRATO GASTROINTESTINAL: SIM () NÃO ()

26. ANORMALIDADES DO TRATO GENITOURINÁRIO: SIM () NÃO ()

27. ALTERAÇÕES OCULARES:

28. ALTERAÇÕES TRATO RESPIRATÓRIO

29. OUTROS: CARDIOPATIA, OSTEOPOROSE, NEFROPATIA, ATRASO NA PUBERDADE

30. TUMORES DE PELE: CA ESCAMOSO, CA BASOCELULAR, MELANOMA

MICROBIOLOGIA

1. COM QUE FREQUÊNCIA UTILIZA ANTIBIÓTICO ORAL? () MENSAL () TRIMESTRAL () SEMESTRAL () ANUAL

2. NA ÚLTIMA OCASIÃO EM QUE UTILIZOU ANTIBIÓTICO ORAL, PARA QUAL INFECÇÃO FOI UTILIZADO E POR QUANTO TEMPO FOI UTILIZADO? QUANDO ISSO ACONTECEU?

3. UTILIZA ANTIBIÓTICOS TÓPICOS? COM QUE FREQUÊNCIA?

4. QUAIS ANTIBIÓTICOS TÓPICOS VOCÊ UTILIZOU NOS ÚLTIMOS 6 MESES?

5. VOCÊ UTILIZA SABONETES ANTISSÉPTICOS? QUAL SABONETE ESTÁ UTILIZANDO ATUALMENTE?

ENDEREÇO:

TELEFONE PARA CONTATO:

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA E ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

A Epidermólise bolhosa congênita (EBC), é uma doença caracterizada por formação de bolhas em áreas de menor atrito. Dependendo do tipo de EBC o paciente ainda pode apresentar lesões na cavidade oral e esôfago e alterações nas unhas e dentes. A causa é a mutação de algumas proteínas responsáveis pela adesão dermo-epidérmica. Os pacientes são com frequência colonizados por bactérias e por isso, podem apresentar infecções cutâneas de repetição. Além disso, o uso frequente de antibióticos por estes pacientes favorece o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos convencionais.

Assim, este trabalho tem como objetivo verificar os achados clínicos e microbiológicos dos pacientes com diagnóstico clínico de EBC atendidos pelo Serviço de Dermatologia da UFCSPA. Os exames microbiológicos serão realizados no laboratório de microbiologia da UFCSPA.

Após a realização do consentimento informado, você ou seu filho será submetido a uma avaliação médica, com coleta de dados sobre o início das lesões cutâneas, história familiar, crescimento e desenvolvimento, resultados de exames realizados, além de exame físico detalhado. Também, após a sua permissão por escrito, serão feitas fotos para comparação das características físicas com programas de computador utilizados para estudar as doenças genéticas.

Existe a possibilidade de que a participação neste estudo possa fazer você, ou o seu filho se sentirem emocionalmente desconfortáveis. A participação de vocês é inteiramente voluntária. *Você tem o direito de não fazer parte, ou mesmo de pedir desistência na participação desta pesquisa sem que isso represente qualquer forma de prejuízo para o seu atendimento ou do seu filho dentro da Instituição onde o projeto está sendo realizado.* Não se

dará qualquer informação genética sobre você ou seu filho, a outros membros da família, ou a terceiros sem sua permissão por escrito.

“Pelo presente Consentimento Informado, eu declaro que fui informado de forma clara, detalhada e livre de qualquer constrangimento ou obrigação, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos a que serei submetido, bem como dos desconfortos e benefícios do presente trabalho. Tive também a oportunidade de discutir e fazer perguntas sobre o trabalho. Eu, voluntariamente, concordo em participar deste estudo”.

Nome do paciente:

Assinatura do paciente se maior de 12 anos:

Nome do responsável:

Assinatura do responsável:

Grau de parentesco e RG do responsável:

Nome do pesquisador responsável:

Assinatura do pesquisador responsável:

* Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA: 3303 8804.

* Telefone do pesquisador responsável Prof. Dra. Ana Elisa K. Bau: 33615550

Porto Alegre, ____/____/_____.

APÊNDICE C – INFORMAÇÕES DE PESQUISA E FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA COLETA E AVALIAÇÃO MOLECULAR

TÍTULO: Registro de Pesquisa Sobre Epidermólise Bolhosa Congênita (EBC)

PESQUISADORES: Ana Elisa Kiszewski Bau

Lavinia Schuler Faccini

Luiza Mariath

Juliana Tosetto Santin

LOCALIDADE:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Neste formulário de consentimento, “você” sempre se refere ao sujeito de pesquisa. Se você for um representante legalmente autorizado, lembre-se de que “você” se refere ao sujeito de pesquisa deste estudo.

DECLARAÇÃO

Por meio deste documento, solicitamos sua participação no Registro de Pesquisa sobre Epidermólise Bolhosa Congênita (RPEBC). O propósito da pesquisa é reunir informações sobre pacientes portadores de EBC em um registro de pesquisa que poderá ser utilizado para ajudar os pesquisadores a entender as manifestações clínicas e genéticas da EBC. Para que médicos, cientistas e pesquisadores qualificados tenham condições de utilizar as informações do registro, o Projeto EBC precisa obedecer às leis que regulamentam os registros médicos.

O propósito deste formulário de consentimento se destina a lhe oferecer as informações que você irá precisar para ajudar na decisão se irá ou não participar do RPEBC. Você pode fazer perguntas sobre o propósito do RPEBC, o que será solicitado de você, quais são os riscos e benefícios, seus direitos como participante voluntário, bem como qualquer outra coisa relacionada ao RPEBC ou a este formulário de consentimento que não estiver clara. Isto é denominado “consentimento informado”.

A quem solicitamos que participe do RPEBC?

Todas as pessoas portadoras de EBC estão sendo convidadas a se registrarem.

Não se sabe quantas pessoas têm EBC, embora já se saiba que se trata de uma doença muito rara.

Por quanto tempo o RPEBC manterá suas informações guardadas?

As informações contidas no RPEBC serão guardadas por um período de tempo indeterminado, a menos que você retire sua permissão de participação do registro.

O que sua participação no RPEBC envolve?

Se você concordar em participar do RPEBC, pediremos que você:

- responda a um questionário sobre informações detalhadas sobre você, seu histórico familiar, sua condição de portador de EBC e como a EBC afeta a sua vida;
- colete uma amostra de saliva para extração de DNA para composição de um banco de DNA para análise genética de mutações relacionadas à EB;
- dê permissão para uso de seu DNA armazenado para análise genética de mutações relacionadas à EBC descobertas no futuro;

- peça a outros membros da família que também sejam portadores de EB que entrem em contato com o pesquisador;
- dê permissão ao Projeto EBC para contatar você aproximadamente uma vez ao ano para atualizar suas informações.

Quais são os possíveis riscos de minha participação no RPEBC?

Para evitar que as informações a seu respeito possam se tornar de conhecimento de pessoas fora do Projeto EBC designaremos um número de código de pesquisa relativo às suas informações que estarão armazenadas no RPEBC e faremos separação de identificadores pessoais (por exemplo, seu nome, número de CPF, endereço). O acesso a identificadores pessoais será protegido por senha. Além disso, as informações que fizerem ligação do número de código de pesquisa a seu nome e a outros identificadores pessoais serão armazenadas em um local seguro em separado.

Para coleta de material genético, uma pequena amostra de saliva será necessária.

Quais são os possíveis benefícios de minha participação no RPEBC?

Você não receberá nenhum benefício direto ao participar deste estudo. Entretanto, as informações contidas no RPEBC estarão disponíveis para trabalhos de pesquisa direcionados para o avanço do conhecimento sobre EBC.

Está previsto que o RPEBC auxiliará os médicos do estudo de duas maneiras:

- (a) permitirá aos pesquisadores revisar e estudar as informações sobre muitos portadores de IP;
- (b) ajudará os pesquisadores a identificar e recrutar pacientes que possam ser selecionados para participação em futuros trabalhos de pesquisa.

Receberei pagamento por minha participação no RPEBC?

Não. Você não receberá nenhum pagamento por sua participação no RPEBC.

Quem terá acesso às minhas informações identificáveis no RPEBC?

O acesso às informações identificáveis contidas no RPEBC será limitado ao pesquisador principal do Projeto EBC e àqueles médicos que servem ao Projeto EBC.

AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAR E REVELAR INFORMAÇÕES PARA FINS DE PESQUISA

Algumas regulamentações federais dão a você certos direitos relativos às informações sobre sua saúde. Aí se inclui o direito de saber quem pode obter informações e por que razão essas pessoas podem obtê-las. O médico do estudo precisa obter sua autorização (permissão) para utilizar ou fornecer qualquer informação de saúde que possa identificar você.

Quais informações poderão ser usadas e passadas a outras pessoas?

Se você optar por participar do estudo, o médico responsável obterá informações pessoais sobre você, incluindo:

- Dados médicos passados e presentes;
- Dados de pesquisa;
- Informações obtidas durante esta pesquisa sobre exames físicos, exames laboratoriais, exames genéticos, raios X e outros resultados de exames.

Por que essas informações serão utilizadas e/ou repassadas a outros?

As informações sobre você e sua saúde poderão ser repassadas a terceiros para desenvolver o trabalho de pesquisa. Os pesquisadores analisarão e avaliarão os resultados do

estudo. Esses resultados desta pesquisa poderão ser publicados em periódicos científicos ou apresentados em reuniões médicas, porém sua identidade não será revelada.

O que acontecerá se eu não der permissão para uso e repasse das informações sobre minha saúde?

Ao assinar este formulário de consentimento, você dará permissão de uso e de repasse de suas informações de saúde listadas acima para os propósitos supracitados. Se você se recusar a dar permissão, não poderá participar desta pesquisa.

Posso sair ou revogar (cancelar) minha permissão?

Você poderá sair ou retirar sua permissão para usar e revelar informações sobre sua saúde a qualquer momento. Isso se faz enviando aviso por escrito ao médico responsável pelo estudo.

Se você retirar sua permissão, não poderá continuar no estudo. Ao retirar sua permissão, nenhuma informação nova sobre sua saúde que possa identificar você será coletada após a data. As informações que já tiverem sido reunidas ainda poderão ser usadas e repassadas a terceiros. Isso será feito se for necessário para que a pesquisa seja confiável.

Minha participação no RPEBC é voluntária?

Sua participação no RPEBC para os propósitos descritos acima é completamente voluntária.

Quem providenciará os recursos de financiamento?

O financiamento desta pesquisa se dará com recursos disponíveis nos Laboratórios de Citogenética e Biologia Molecular da UFRGS e de Microbiologia da UFCSPA. Além disso, o projeto será submetido a editais de agências oficiais de fomento.

PARTICIPAÇÃO EM EXAMES GENÉTICOS

Solicito exames genéticos para verificar minha mutação genética específica.

Sim____ Não____

Concordo que os resultados dos exames podem ser divulgados pelo Projeto EBC para o RPEBC

Sim____ Não____

Concordo que o DNA pode ser armazenado pelo laboratório para possíveis exames ou estudos adicionais relacionados à EBC.

Sim____ Não____

Concordo que se o laboratório não puder armazenar o DNA, o Projeto EBC poderá tratar do armazenamento com outra entidade inteiramente qualificada para esse procedimento.

Sim____ Não____

CONSENTIMENTO

Certifico que li este formulário de consentimento (ou que alguém o leu para mim).
Tive oportunidade de fazer perguntas. Todas as minhas perguntas foram respondidas

convenientemente. Dou meu consentimento voluntário para participar (permitir que meu filho ou filha participe) do RPEBC.

Autorizo o uso e a revelação das informações sobre minha saúde (ou sobre a saúde de meu filho ou filha) para as partes listadas na seção de autorização deste consentimento para os propósitos descritos acima.

Assinando este formulário de consentimento, não renunciei a nenhum direito legal que eu (ou meu filho ou filha) de outra forma teria como sujeito em um trabalho de pesquisa.

Data: _____

Nome: _____

Assinatura (Maiores de 18 anos)

OU

Assinatura do representante legalmente autorizado (quando aplicável)

Assinatura do pesquisador que coletou as informações

APÊNDICE D – TERMO DE CONCESSÃO PARA USO DE IMAGEM**(MENORES DE 18 ANOS)**

Eu, _____, portador (a) de cédula de identidade número _____, responsável legal pelo menor _____, portador de cédula de identidade número _____, **AUTORIZO** o registro fotográfico do (a) menor supracitado (a), bem como o uso de tais imagens em qualquer meio de comunicação para fins didáticos, de pesquisa e divulgação de conhecimento científico, elaboração de projetos visuais sem quaisquer ônus ou restrições.

Fica ainda AUTORIZADA, de livre e espontânea vontade, para os mesmos fins, a cessão de direitos de veiculação das imagens, não recebendo para tanto qualquer remuneração.

Porto Alegre, __/__/__.

Assinatura do responsável:

Assinatura do (a) menor:

APÊNDICE E – TERMO DE CONCESSÃO PARA USO DE IMAGEM**(MAIORES DE 18 ANOS)**

Eu, _____, portador (a) de cédula de identidade número _____, **AUTORIZO** o meu registro fotográfico bem como o uso de tais imagens em qualquer meio de comunicação para fins didáticos, de pesquisa e divulgação de conhecimento científico, elaboração de projetos visuais sem quaisquer ônus ou restrições.

Fica ainda **AUTORIZADA**, de livre e espontânea vontade, para os mesmos fins, a cessão de direitos de veiculação das imagens, não recebendo para tanto qualquer remuneração.

Porto Alegre, __/__/__.

Assinatura:

ANEXOS

ANEXO A – ARTIGO ORIGINAL

Title: An overview of the genetic basis of Epidermolysis Bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants

Running title: Genetics of Epidermolysis Bullosa in Brazil

Authors:

Luiza Monteavaro Mariath¹, Juliana Tosetto Santin², Jeanine Aparecida Frantz^{3,4}, Maria Juliana Rodovalho Doriqui⁵, Ana Elisa Kiszewski^{6,7} Lavínia Schuler-Faccini^{1,8*}

Authors' affiliations:

¹ Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

² Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

³ Universidade Regional de Blumenau, Brazil

⁴ DEBRA Brasil (Epidermolysis Bullosa Research Association of Brazil), Brazil

⁵ Section of Medical Genetics, Hospital Infantil Dr. Juvêncio Mattos, São Luís, Maranhão, Brazil

⁶ Section of Dermatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil

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

⁸ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INaGeMP)

***Corresponding author:** Lavínia Schuler-Faccini; email: lavinia.faccini@ufrgs.br

Acknowledgments:

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 Epidermolysis Bullosa Research Association of Brazil (DEBRA-Brasil) and to the society of EB patients and families from Distrito Federal (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).

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 probands (25 EBS, 4 JEB and 58 DEB probands) in addition to 22 affected family members were studied (total of 109 individuals). We performed a next-generation sequencing-based multi-gene 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 83 probands (efficiency of 95.4%). 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 Epidermolysis Bullosa and describes, for the first time, the genetic profile of EB patients from Brazil.

Keywords: Epidermolysis bullosa; genodermatosis; genetic disease; next generation sequencing; gene panel; pathogenic variant.

Introduction

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

EBS is characterized by intraepidermal blistering. About 75% of EBS cases are due to *KRT5* or *KRT14* mutations,⁴ encoding the basal keratins 5 (K5) and 14 (K14), although at least other nine genes have been also implicated.¹ The K5 and K14 interaction provides strength and flexibility to basal keratinocytes.^{4,5} Mutations in *PLEC* gene, encoding plectin, an important protein that connects keratins to the hemidesmosomal plaque, underlie EBS in 8% of patients.⁶ 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.^{7,8} Recently, acral peeling skin syndrome, caused by mutations in *TGM5*, has been classified as a subtype of EBS.¹

In JEB, the blisters develop within the lamina lucida, *i.e.* the junction of the skin basement membrane zone.¹ Mutations in nearly 8 genes have been implicated in JEB, with autosomal recessive mode of inheritance.^{1,9} 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.^{1,10} Rare cases of JEB are associated with integrin $\alpha 6\beta 4$ deficiency (encoded by *ITGB4* and *ITGA6*).^{1,10}

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.^{1,11,12} 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.¹² In RDEB, mutations include nonsense, splice site, deletions or insertions, ‘silent’ glycine substitutions (manifested only in a recessive state), and non-glycine missense variants.^{12,13} Additionally, some specific glycine substitutions were reported in both DDEB and RDEB.¹⁴

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

Although EB is one of the most common inherited skin disorder,^{15,16} with a birth prevalence of 1.9/100,000 in Europe,¹⁷ 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.¹⁸⁻²¹ 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-based multi-gene panel.

Materials and Methods

Subjects and ethical aspects

A total of 109 patients with a clinical diagnosis of EB were studied, including 87 probands and 22 affected family members. 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 (ACPAPPEB), Paraná (Appapeb), and São Paulo (APPEB-SP). Most probands (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).

Molecular analysis

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

A next-generation sequencing (NGS)-based multi-gene 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*, *KRT14*, *PLEC*, *TGM5*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGB4*, *COL7A1*, and *FERMT1*. The panel was designed using AmpliSeq Designer software (Thermo Fisher Scientific, USA), 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, USA). 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, USA). 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 373.4 and the uniformity of base coverage was 94.2%. The variants were reviewed and checked in the Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) software and the mapped reads were visualized in the Integrative Genomics Viewer (IGV) software.

***In silico* analysis**

The identified variants were investigated in the following databases: human gene mutation database (HGMD; <http://www.hgmd.cf.ac.uk>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), Leiden Open Variation Database (LOVD; <http://www.lovd.nl>), Genome Aggregation Database (gnomAD; <http://gnomad-old.broadinstitute.org>), Exome aggregation consortium (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org>) and AbraOM (Online Archive of Brazilian Mutations; <http://abraom.ib.usp.br>). Variants in *COL7A1* gene were additionally sought in COL7A1 Gene Variants Database (<http://col7a1-database.info>). The following prediction tools were used to estimate the impact of variants: SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg>), PROVEAN (<http://provean.jcvi.org>), Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), Mutation Taster and Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/HSF>). All variants were classified according to the American College of Medical Genetics (ACMG) guidelines.²² All likely pathogenic variants were considered with pathogenic variants, and collectively named pathogenic variants hereafter.

Results

Seventy-two different pathogenic variants in eight distinct genes were identified in the 87 families studied (Table 1 and Table 2). To our knowledge, 32 (44.4%) of them have not been described to date in EB literature and in the HGMD. The identification of the causal mutation(s) and the consequent determination of the type of EB were achieved in 95.4 % (83/87) of the studied probands. No pathogenic variants were identified in *LAMA3*, *ITGB4* and *FERMT1* genes.

In the 25 EBS probands, 15 distinct pathogenic variants were identified; seven of them (46.7%) unreported to date (Table 1). We failed to identify the causative mutation in four EBS probands. 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, representing 33.3% of all the identified EBS alleles (8/24). 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 probands: one homozygous for a mutation in *LAMC2* while the other two were compound heterozygotes for *LAMB3* and *COL17A1* variants (Table 1). 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 2 presents all pathogenic variants found in the studied DEB probands. 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 1A illustrates the distribution of the identified 21 novel *COL7A1* pathogenic variants along the protein domains. Figure 1B 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 (VUS) found in the studied EB probands.

Discussion

We have developed a next-generation sequencing-based multi-gene 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 83 from the 87 probands, resulting in an efficiency of 95.4%. Vahidnezhad *et al.* developed a multi-gene panel including 21 genes and found an efficiency of 83.5% predicting the subtype of EB in 76 out of 91 families.²³ Has *et al.* elucidated 90% (36 of 40) of the studied cases by a NGS-panel which included 49 genes.²⁴ Finally, Lucky *et al.* found an efficiency of 97.7% (42/43 patients) in a NGS assay that included 21 genes, in which all the identified mutations were present in only five genes (*KRT5*, *KRT14*, *LAMB3*, *COL17A1*, *COL7A1*).²⁵ 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 in ten alleles was associated with *KRT14* pathogenic variants, while in nine of them *KRT5* pathogenic variants were identified (Table 1). These results are in accordance with previous reports indicating a similar ratio of *KRT5* and *KRT14* mutations in EBS.^{8,26} Eight of the 25 (32%) EBS probands 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,⁸ 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.⁴ 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.²⁷ The well-documented variant p.Gly113Cys in *TGM5*, identified in a homozygous proband, is the most frequent mutation in patients with acral peeling skin syndrome,^{28,29} 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.^{4,7} 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 1).

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.³⁰⁻³² 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: one splice site mutation in *LAMC2*, one frameshift in *LAMB3*, and two in *COL17A1* (one nonsense and one splice site mutation) (Table 1). All variants were private to families. The only one carried in homozygosis (c.1066+1delG in *LAMC2*) was identified in a proband from a consanguineous family. The recurrent JEB variants previously described, including a hotspot in *LAMB3* (the p.R635X variant) and other population-specific mutations,¹⁰ were not identified here.

In five patients (four EBS and one JEB) no pathogenic variant was identified, suggesting the existence of large rearrangements not identified by NGS or, more likely,

mutations in genes not included in our multi-gene panel. Mutations in at least additional five genes, such as *DSP*, *JUP*, *PKP1*, *EXPH5* and *DST*, have been associated to EBS,^{1,33} while rare mutations in *ITGA6*, *ITGA3* and *LAMA3A* have been demonstrated to cause JEB.¹

The dystrophic type of EB was the most represented in our sample, with 58 probands. In total, 52 different variants were disclosed, 21 of them representing pathogenic variants unreported to date, located in distinct protein domains (Table 2; Figure 1A). Few *COL7A1* variants were more prevalent in our sample. The c.5047C>T (p.Arg1683Ter) variant was identified in 12 alleles, representing 11.2% (10/106) of all *COL7A1* alleles. This variant was first described in a compound heterozygous Japanese patient,³⁴ being subsequently identified in two European subjects, also compound heterozygous.^{35,36} Our finding, therefore, suggests that in Brazil this might be a frequent recurrent variant. Since it was identified in patients from different Brazilian regions (Figure 1B), additional studies will be important to investigate a possible common origin.

The pathogenic variant c.325_326insCG (p.Glu109fs) was identified in nine alleles (8.4% 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.*³⁷ 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 (8.4% of all *COL7A1* alleles). It was previously described by Cuadrado-Corrales *et al.* in a year-old patient with RDEB from Spain.³⁸ In a subsequent study, the authors have demonstrated this variant results in the usage of a cryptic splice site in intron 96, leading to out-of-frame transcript.³⁶ Interestingly, in our study all patients carrying c.7380+2T>C variant were from southern Brazil (Figure 1B), including 3 homozygous probands. 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 Northeast regions. Taking into account the important migratory process of Brazilian northeasterners towards 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.

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. Kiritsi 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 2018. 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
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. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Schuilenga-Hut PH, Vlies Pv, 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.
27. Pfindner EG, Bruckner AL. Epidermolysis Bullosa Simplex. 1998 Oct 7 [Updated 2016 Oct 13]. 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/NBK1369/>. Accessed January 18, 2019.
28. 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.
29. Szczecinska 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):1206-10.
30. 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.

31. 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.
32. Fine JD, Hintner H. *Life with Epidermolysis Bullosa (EB): Etiology, Diagnosis, Multidisciplinary Care and Therapy*. New York: Springer-Verlag/Wien; 2008. 338 p.
33. Wertheim-Tysarowska K, Oldak 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
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.

Tables

Table 1. Frequency of the identified pathogenic/likely pathogenic variants in Brazilian EBS and JEB probands

EB Type	Pathogenic/Likely pathogenic variants	N (alleles)	Frequency	Mutation first reported in reference
EBS	<i>KRT14</i> , c.373C>T, p.Arg125Cys	5	0.208	Coulombe (1991) Cell 66, 1301
	<i>KRT14</i> , c.374G>A, p.Arg125His	3	0.125	Coulombe (1991) Cell 66, 1301
	<i>KRT14</i>, c.606delC, p.Lys203fs*	2	0.083	This study
	<i>PLEC</i>, c.6697dupG, p.Asp2233fs*	2	0.083	This study
	<i>TGM5</i> , c.337G>T, p.Gly113Cys*	2	0.083	Cassidy (2005) Am J Hum Genet 77, 909
	<i>KRT5</i> , c.74C>T, p.Pro25Leu	1	0.042	Uttam (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 9079
	<i>KRT5</i> , c.427G>T, p.Val143Phe	1	0.042	Kang (2010) J Dermatol Sci 57,90
	<i>KRT5</i>, c.528C>G, p.Asn176Lys	1	0.042	This study
	<i>KRT5</i>, c.545T>C, p.Phe182Ser	1	0.042	This study
	<i>KRT5</i> , c.555+1G>A, p.?	1	0.042	Rugg (1999) Eur J Hum Genet 7, 293
	<i>KRT5</i>, c.598T>C, p.Trp200Arg	1	0.042	This study
	<i>KRT5</i>, c.1396G>C, p.Glu466Gln	1	0.042	This study
	<i>KRT5</i>, c.1406C>G, p.Thr469Ser	1	0.042	This study
	<i>KRT5</i> , c.1411C>T, p.Arg471Cys	1	0.042	Arin (2010) Br J Dermatol 162, 1365
	<i>PLEC</i> , c.5998C>T, p.Arg2000Trp	1	0.042	Koss-Harnes (2002) J Invest Dermatol 118, 87
	Total alleles:	24		
EB Type	Pathogenic/Likely pathogenic variants	N (alleles)	Frequency	References
JEB	<i>LAMC2</i>, c.1066+1delG, p.?	2	0.333	This study
	<i>LAMB3</i> , c.1132+5G>A, p.?	1	0.167	Nakano (2002) Hum Genet 110, 41
	<i>LAMB3</i>, c.2106delG, p.Gln702fs	1	0.167	This study
	<i>COL17A1</i>, c.3171_3173delCTC,	1	0.167	This study

	p.Tyr1057Ter			
	COL7A1, c.2002+2T>G, p.?	1	0.167	This study
	Total alleles:	6		

Novel variants are highlighted in bold.* EBS variants inherited in homozygosis.

Table 2. Frequency of the identified pathogenic/likely pathogenic variants in Brazilian DEB probands

Pathogenic/Likely pathogenic variants	N (alleles)	Frequency	Mutation first reported in reference
<i>COL7A1</i> , c.5047C>T, p.Arg1683Ter	12	0.112	Sawamura (2005) J Hum Genet 50, 543
<i>COL7A1</i> , c.325_326insCG, p.Glu109fs	9	0.084	Hovnanian (1997) Am J Hum Genet 61, 599
<i>COL7A1</i> , c.7380+2T>C, p.?	9	0.084	Cuadrado-Corrales (2009) Hum Genet 126, 335
COL7A1, c.1758delC, p.Ser587fs *	7	0.065	This study
<i>COL7A1</i> , c.7957G>A, p.Gly2653Arg	4	0.037	Christiano (1996) Am J Hum Genet 58, 671
<i>COL7A1</i> , c.887delG, p.Gly296fs	3	0.028	Christiano (1996) Mol Med 2, 59
<i>COL7A1</i> , c.4011G>A, p.(Pro1337=)	3	0.028	van den Akker (2009) J Dermatol Sci 56, 9
<i>COL7A1</i> , c.7078G>A, p.Gly2360Arg *	3	0.028	Almaani (2011) Acta Derm Venereol 91, 262;
<i>COL7A1</i> , c.2005C>T, p.Arg669Ter	2	0.019	Cserhalmi-Friedman (1998) Lab Invest 78, 1483
COL7A1, c.2783_2784insGACAC, p.Gln929fs	2	0.019	This study
<i>COL7A1</i> , c.4018C>T, p.Arg1340Ter	2	0.019	Hovnanian (1994) Am J Hum Genet 55, 289;
<i>COL7A1</i> , c.5819C>T, p.Pro1940Leu	2	0.019	Varki (2007) J Med Genet 44, 181
<i>COL7A1</i> , c.6022C>T, p.Arg2008Cys	2	0.019	Kon (1998) J Invest Dermatol 111, 534
<i>COL7A1</i> , c.6082G>A, p.Gly2028Arg **	2	0.019	Lee (2000) Arch Dermatol Res 292, 159
<i>COL7A1</i> , c.6501G>A, p.(Pro2167=)	2	0.019	Christiano (1996) Am J Hum Genet 58, 671
<i>COL7A1</i> , c.6527dupC, p.Gly2177fs	2	0.019	Hovnanian (1997) Am J Hum Genet 61, 599
<i>COL7A1</i> , c.7249C>T, p.Gln2417Ter	2	0.019	Whitlock (1999) J Invest Dermatol 113, 673
<i>COL7A1</i> , c.7864C>T, p.Arg2622Trp	2	0.019	Gardella (2002) J Invest Dermatol 119, 1456
COL7A1, c.8109+1G>T, p.?	2	0.019	This study
COL7A1, c.8191G>T, p.Gly2731Cys	2	0.019	This study

<i>COL7A1</i> , c.58_70delCGAGTGCGAGCCC, p.Arg20fs	1	0.009	Cuadrado-Corrales (2010) Hum Genet 127, 117
<i>COL7A1</i> , c.189delG, p.Leu64fs	1	0.009	Christiano (1997) J Invest Dermatol 109, 390
<i>COL7A1</i> , c.553C>T, p.Arg185Ter	1	0.009	Hovnanian (1997) Am J Hum Genet 61, 599
<i>COL7A1</i> , c.676C>T, p.Arg226Ter	1	0.009	Christiano (1996) J Invest Dermatol 106, 679
<i>COL7A1</i> , c.2767G>A, p.Gly923Arg	1	0.009	Abu Sa'd, (2006) J Invest Dermatol 126, 777
<i>COL7A1</i> , c.4027C>T, p.Arg1343Ter	1	0.009	Hovnanian (1994) Am J Hum Genet 55, 289
<i>COL7A1</i>, c.4288G>T, p.Gly1430Ter	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.4378C>T, p.Gln1460Ter	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.5097+1G>A, p.? **	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.5124+1G>A, p.?	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.5132_5133insTCACC, p.Gly1712fs	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.5282G>A, p.Gly1761Asp	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.5308G>C, p.Gly1770Arg **	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.5321C>A, p.Pro1774His **	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.5449C>T, p.Gln1817Ter	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.5576_5577delAA, p.Lys1859fs	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.5737G>T, p.Gly1913Cys	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i> , c.5820G>A, p.(Pro1940=)	1	0.009	Terracina, (1998) J Invest Dermatol 106, 679
<i>COL7A1</i> , c.6016G>A, p.Gly2006Ser	1	0.009	Mallipeddi (2003) Br J Dermatol 149, 810
<i>COL7A1</i> , c.6044G>A, p.Gly2015Glu**	1	0.009	Hammami-Hauasli (1998) J Biol Chem 273, 19228
<i>COL7A1</i> , c.6100G>A, p.Gly2034Arg	1	0.009	Kon (1997) J Invest Dermatol 109, 684
<i>COL7A1</i>, c.6100_6120delGGGGAGCCTGGAAAG CCTGGT, p.Gly2034_Gly2040del **	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i> , c.6205C>T, p.Arg2069Cys	1	0.009	Kahofer (2003) Pediatr Dermatol 20, 243
<i>COL7A1</i> , c.6698G>A, p.Gly2233Asp	1	0.009	Almaani (2009) Acta Derm Venereol 89, 6
<i>COL7A1</i>, c.6937G>A, p.Gly2313Arg	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.7246G>A, p.Gly2416Ser	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i> , c.7344G>A, p.(Val2448=)	1	0.009	Gardella (1996) Am J Hum Genet 59, 292
<i>COL7A1</i> , c.7411C>T, p.Arg2471Ter	1	0.009	Christiano (1996) Am J Hum Genet 58, 671
<i>COL7A1</i>, c.7420C>T, p.Arg2474Cys	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i> , c.7738C>T, p.Arg2580Cys	1	0.009	***
<i>COL7A1</i>, c.7756C>T, p.Gln2586Ter	1	0.009	This study
<i>COL7A1</i>, c.7814G>T, p.Gly2605Val	1	0.009	This study

Total alleles:	106		
----------------	------------	--	--

Novel variants are highlighted in bold.

* Variants found in both RDEB and DDEB patients.

** Variants found exclusively in DDEB alleles. All other variants (the ones without ‘*’) were present only in RDEB patients.

*** Unpublished. Submitted by Laboratory of Molecular and Cell Biology, Istituto Dermopatico dell Immacolata, Rome (Italy) at < www.col7a1.org >.

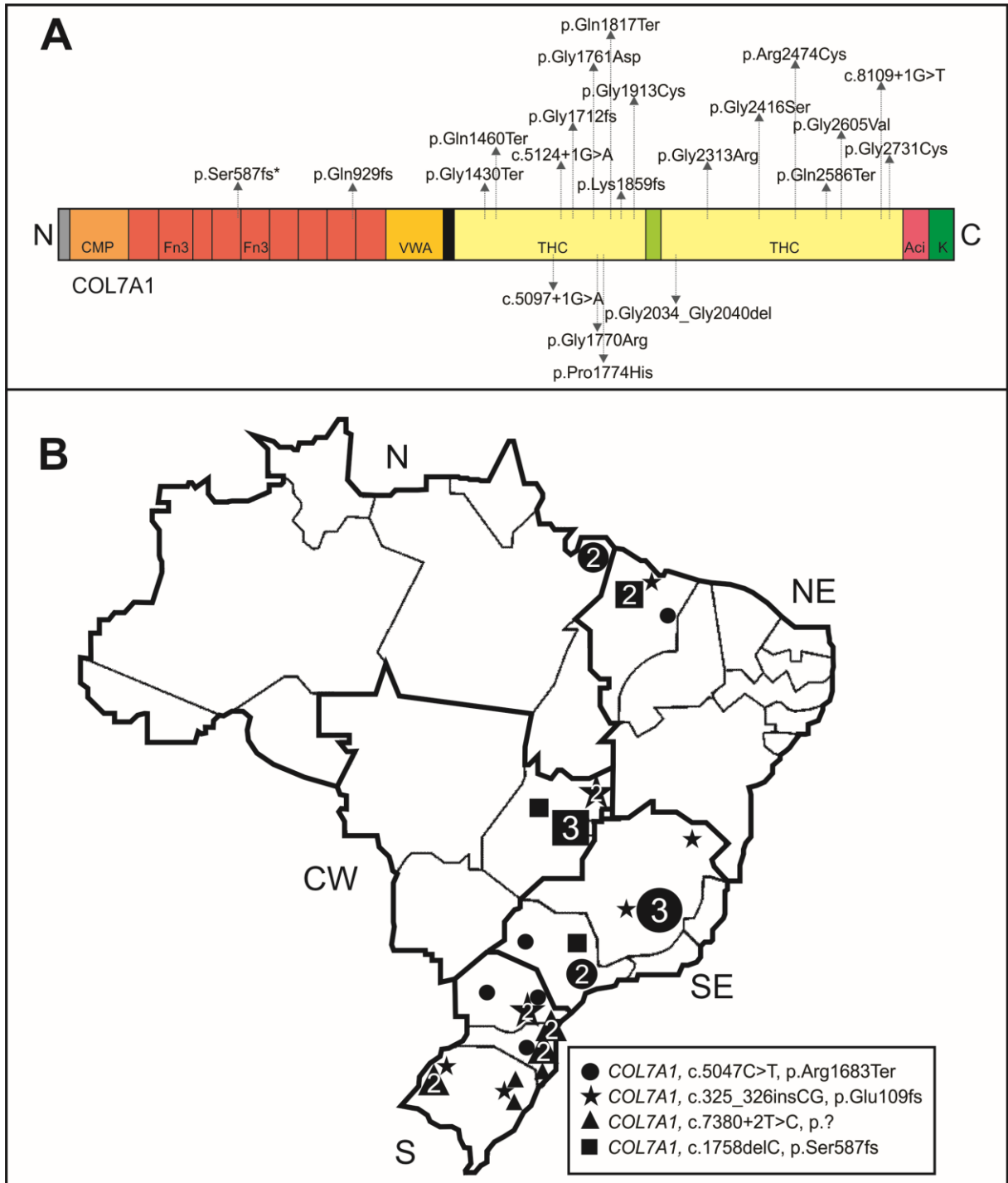


Figure 1. (A) The identified 21 novel *COL7A1* pathogenic/likely pathogenic variants. Upper variants were found in RDEB patients while the ones below were identified in DDEB. (* variant found in both RDEB and DDEB). CMP: cartilage matrix protein; Fn3: Fibronectin III-like domains; VWA: von Willebrand factor A domain; THC: triple helical collagenous domain; Acic: acidic; K: kunitz module; signal peptide in gray; cysteine & proline rich region in black; 39 amino acid ‘hinge’ region in light green. (B) 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.