

# EPIDERMOLISIS BULLOSA (EB): PATOGÉNESIS, ASPECTOS CLÍNICOS, DIAGNÓSTICOS Y GENÉTICOS, BASE MOLECULAR, ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, MANEJO DEL PACIENTE CON EB E IMPLICACIONES TRANSLACIONALES DEL ANÁLISIS DE MUTACIONES

E. Bermejo<sup>1</sup>, J.J. Marco<sup>2</sup>, L. Paisán<sup>3</sup>, V. Félix<sup>4</sup>, V. Marugán<sup>5</sup>, H. Huertas<sup>6</sup>, P. Aparicio<sup>7</sup>, A. Sanchis<sup>8</sup>, F. Centeno<sup>9</sup>, A. Ayala<sup>10</sup>, J.L. Pérez<sup>11</sup>, A. Peñas<sup>12</sup>, J.L. Gomar<sup>13</sup>, M.M. Lertxundi<sup>14</sup>, E. Burón<sup>15</sup>, M.S. Vázquez<sup>16</sup>, H. Gómez<sup>17</sup>, J.M. Barcia<sup>18</sup>, F. Hernández<sup>19</sup> y M.L. Martínez-Frías<sup>1,20</sup>

<sup>1</sup>ECEMC. Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid. <sup>2</sup>Sº de Pediatría, Hospital Arnau de Vilanova, Lleida. <sup>3</sup>Sº de Pediatría, Hospital de Donostia, San Sebastián (Guipúzcoa). <sup>4</sup>Sº de Pediatría, Hospital Virgen de la Salud, Toledo. <sup>5</sup>Sº de Pediatría, Hospital General Virgen de la Concha, Zamora. <sup>6</sup>Sº de Pediatría, Hospital Gutiérrez Ortega, Valdepeñas (Ciudad Real). <sup>7</sup>Sº de Pediatría, Hospital General Yagüe, Burgos. <sup>8</sup>Sº de Pediatría, Hospital Dr. Peset, Valencia. <sup>9</sup>Sº de Pediatría, Hospital Río Hortega, Valladolid. <sup>10</sup>Sº de Neonatología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. <sup>11</sup>Sº de Pediatría, Hospital Civil de Basurto, Bilbao (Vizcaya). <sup>12</sup>Sº de Pediatría, Hospital Virgen del Castillo, Yecla (Murcia). <sup>13</sup>Sº de Pediatría, Hospital SAS de La Línea de la Concepción, La Línea de la Concepción (Cádiz). <sup>14</sup>Sº de Pediatría, Hospital Ntra. Sra. de la Antigua, Zumárraga (Guipúzcoa). <sup>15</sup>Sº de Neonatología, Hospital Clínico Universitario, Valladolid. <sup>16</sup>Sº de Neonatología, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Albacete. <sup>17</sup>Sº de Pediatría, Hospital Comarcal de Llerena, Llerena (Badajoz). <sup>18</sup>Sº de Pediatría, Hospital Universitario Materno Infantil Virgen de la Arrixaca, Murcia. <sup>19</sup>Sº de Pediatría, Hospital Infanta Margarita, Cabra (Córdoba). <sup>20</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

## Summary

**Title: Epidermolysis bullosa (EB): Pathogenesis, clinical, diagnostic and genetic aspects, molecular basis, epidemiological aspects, management of patients with EB and translational implications of mutation analysis**

Under the term "Epidermolysis Bullosa" (EB), there is a heterogeneous group of vesicular disorders that are generally congenital and of genetic origin, and affect skin and often mucosae. It is remarkable the extreme fragility of these epithelia; the vesicles arise spontaneously as well as induced by even slight trauma or the influence of high temperatures. Their content is sero-hemorrhagic and in the scarring can be very difficult. As a consequence of the scarring processes, joint contractures and fusion of digits (pseudo-syndactyly) can occur. Pathogenetically, EB is caused by abnormal blistering at the basement membrane zone in the dermal-epidermal attachment zone and its surroundings. This is due to alterations in the attachment complexes, and some mutations have been identified in a total of 10 genes expressed in such level. Four main types of EB can be distinguished (simple, junctional, dystrophic and hemidesmosomal), depending on the level at which the cleavage that forms the bulla takes place, although about 30 subtypes have been described. The clinical characteristics or optic microscopy are not adequate for diagnosis, and it is mandatory to perform electron microscopy, immunofluorescent and immunohistochemical studies, as well as mutation analysis if available. Regarding the epidemiological aspects, in the Spanish Collaborative Study of Congenital Malformations (ECEMC), since 1976 up to December 2004, a total of 2,204,264 liveborn infants were controlled and, among them 27 cases have been identified, for a minimum frequency of 0.12 per 10,000 (95% confidence interval:0.08-0.18). It seems generally accepted that the determination of the frequency of EB is subject to multiple biases and registration of cases is always incomplete. We have also reviewed the issues related to management of EB patients by clinicians.

## Introducción

Bajo la denominación "Epidermolysis Bullosa" (EB) se encuadran un grupo *heterogéneo* de trastornos ampollosos, generalmente congénitos y de origen genético, que afectan a la piel y, con frecuencia, a las mucosas, siendo destacable la extremada fragilidad de estos epitelios. Las ampollas se forman espontáneamente y su aparición se ve favorecida por traumatismos, incluso leves, o por la influencia de tem-

peraturas elevadas. El contenido de dichas ampollas es sero-hemorrágico y en su evolución pueden presentar cicatrización muy dificultosa. Como consecuencia de los problemas de los procesos de cicatrización se pueden producir contracturas articulares y fusiones de dedos (pseudosindactilia).

En realidad, etimológicamente, la denominación "epidermolysis" es incorrecta, puesto que la citolisis de la epidermis no se observa en todos los tipos de EB. Tampoco el

término "bullosa" es plenamente acertado, puesto que en muchos casos no se observan bullas, sino erosiones. Sin embargo, el amplio uso de esta terminología ha determinado su vigencia hasta la actualidad.

Queremos destacar el carácter *heterogéneo* de la EB, que es aplicable tanto a sus características clínicas como a las histológicas, a su gravedad, pronóstico y modo de herencia, según los tipos, tal como detallaremos a lo largo de este capítulo. La gran variedad de tipos de EB que hoy día se pueden distinguir (cerca de 30), ha generado la existencia de múltiples sistemas de clasificación de este grupo de patologías, que varían en función a los criterios taxonómicos aplicados en cada uno de tales sistemas. En general, los criterios más frecuentemente utilizados son: el tipo de lesiones, sus características histológicas, su localización anatómica, la posibilidad de cicatrización, la edad de aparición de las lesiones, las variaciones estacionales y el modo de herencia. A estos criterios se ha añadido más recientemente el tipo de mutación génica. Entre los diferentes sistemas de clasificación, uno de los más aceptados, probablemente por la relativa sencillez de su uso en la práctica clínica diaria, es el adoptado por el Subcomité de Diagnóstico y Clasificación del Registro Nacional Estadounidense de Epidermolisis Bullosa [Fine y cols., 2000], que tiene la ventaja adicional de estar sujeto a revisiones periódicas, en base a los nuevos conocimientos.

Para poder comprender el origen de la heterogeneidad de la EB, a la que hemos hecho alusión más arriba, es preciso tener en cuenta la estructura histológica y la ultraestructura de la piel, que determinan la patogénesis de este grupo de alteraciones.

## Histología y ultraestructura de la piel. Patogénesis de la Epidermolisis Bullosa (EB)

Recordemos en primer lugar que la piel, histológicamente, está constituida por 3 capas: *Epidermis*, que es la capa más superficial, *Dermis*, que queda inmediatamente por debajo de la anterior, e *Hipodermis*, que es la capa más profunda. Los procesos patogénicos que conducen a la EB tienen lugar por encima de la hipodermis y consisten en la separación anormal de estratos que en condiciones normales permanecen unidos. En la Figura 1 mostramos un esquema de la ultraestructura de las dos capas más superficiales de la piel, epidermis y dermis, y en la parte derecha de dicho esquema hemos indicado los tipos principales de EB, dependiendo del nivel en el cual se produce el clivaje anormal de los tejidos. En la parte inferior de la epidermis, los *queratinocitos* se mantienen unidos entre sí mediante los *desmosomas*, y se unen a la *membrana basal* subyacente

mediante *hemidesmosomas*. En esas uniones es fundamental la participación de una serie de filamentos que constituyen el *citoesqueleto*. Bajo la epidermis se encuentra la *membrana basal*, constituida a su vez por la *lámina lúcida* y la *lámina densa*, que se hallan unidas entre sí por los *filamentos de anclaje*. Bajo la membrana basal está la dermis, que mediante *fibrillas de anclaje* mantiene unida la membrana basal a la hipodermis. Por tanto, es fácil deducir que la integridad de la piel va a depender en gran medida de los filamentos, fibrillas y estructuras que mantienen unidas las distintas capas que la constituyen, y el hecho de que se altere alguno de sus componentes va a determinar la separación anormal de las mismas.

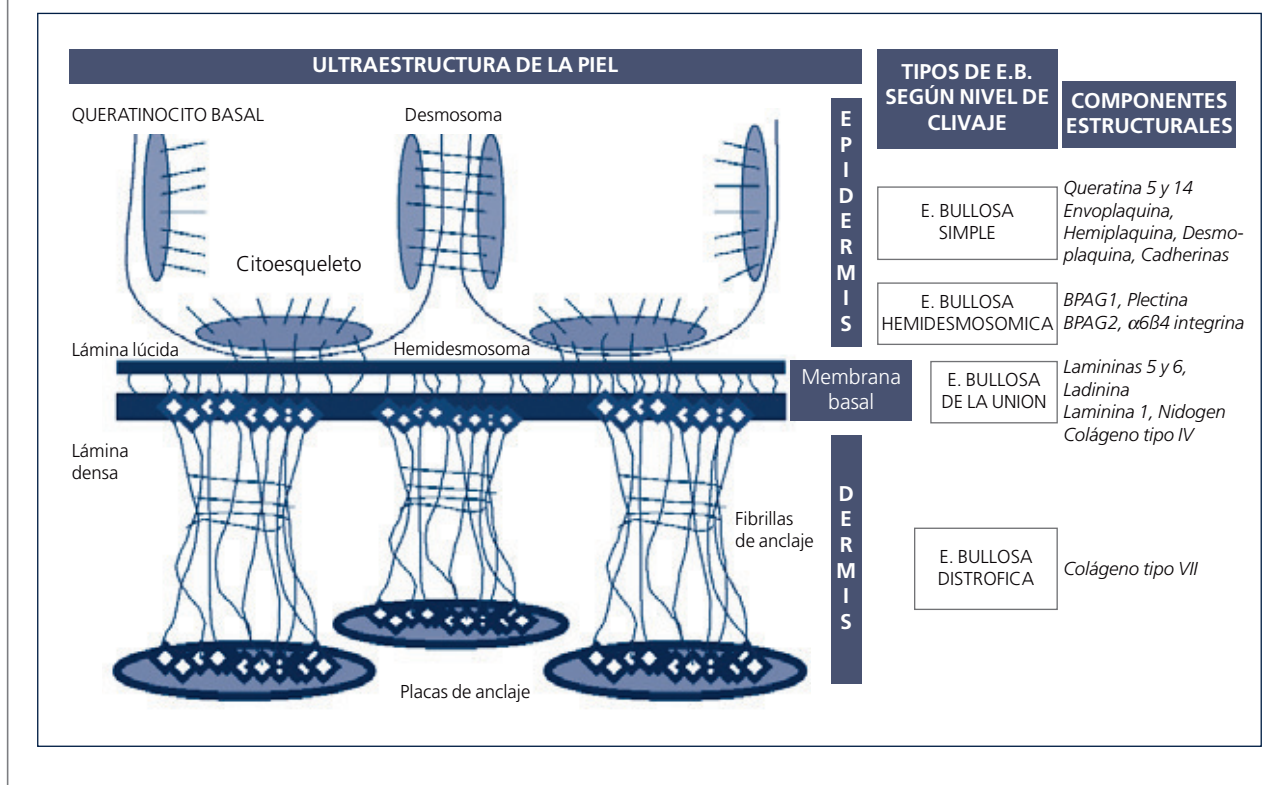
Tal como indicamos en la Figura 1, dependiendo del nivel en el cual se produce la separación patológica de las capas de la piel, se distinguen 3 tipos principales de EB:

- **Tipo I (EB simple):** Engloba las formas intraepidérmicas de EB, debidas a la fragilidad de los queratinocitos basales, en las que las ampollas se forman a nivel superficial. Todas las formas son no cicatrizantes, no suelen producir afectación extracutánea, y pueden tener herencia autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada a X.
- **Tipo II (EB de la unión, o juntural):** También denominada **atrófica** por las lesiones residuales a las que da lugar. Se produce por un fallo a nivel de la membrana basal que en condiciones normales une dermis y epidermis. Todos los subtipos que incluye tienen herencia autosómica recesiva.
- **Tipo III (EB distrófica):** Incluye las formas dérmicas de EB, en las que la separación tisular ocurre por debajo de la lámina densa, en la parte más superficial de la dermis. Dichas formas se manifiestan con atrofia de la piel y cicatrización. Pueden tener herencia autosómica dominante o recesiva.
- **Tipo IV (EB hemidesmosómica):** Esta cuarta categoría ha sido introducida recientemente, y en este caso la separación de los tejidos ocurre entre las células basales de la epidermis y la lámina lúcida, a nivel de los hemidesmosomas [Pulkkinen y Uitto, 1998]. Se han descrito formas de herencia autosómica dominante y recesiva.

## Aspectos clínicos, diagnósticos y genéticos de la EB

Tradicionalmente, los pacientes con EB eran clasificados en base a sus características clínicas y, en los mejores casos, por las características histológicas de la piel, estudiadas mediante microscopía óptica. De este modo, se distinguían básicamente los 3 primeros tipos generales de EB a los que hacíamos referencia en el epígrafe anterior. Sin embargo, es

FIGURA 1. Ultraestructura de la piel y tipos de Epidermolisis bullosa según nivel de clivaje (Modificado de Uitto y Christiano [1992]).



importante tener en cuenta que ni las características clínicas, ni siquiera la microscopía óptica, son suficientes o adecuadas para un diagnóstico correcto. En consecuencia, hoy día es obligado efectuar, al menos, el estudio histológico mediante microscopía electrónica y técnicas inmunohistoquímicas (con una serie de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el colágeno VII, laminina-5, colágeno XVII, queratinas 5 y 14, plectina, e integrina  $\alpha6\beta4$ ). En la Figura 2 mostramos los algoritmos que, combinando la ultraestructura de la piel y un número limitado de hallazgos clínicos, cutáneos y/o extracutáneos, permiten delimitar distintos tipos y subtipos de EB. Así, sobre esa base, dados los grandes avances en el estudio molecular que ha proporcionado nuevas herramientas diagnósticas, y que ya está disponible en algunos países para muchos de los tipos de EB, se puede dirigir el estudio molecular hacia la detección de un espectro más reducido de mutaciones concretas, entre las múltiples ya conocidas. No obstante, hemos de destacar que en el momento actual está claro que la predicción del fenotipo a partir del conocimiento del genotipo puede ser impo-

sible, ya que una misma mutación puede dar lugar a diversos fenotipos.

En la Tabla 1 mostramos, comparativamente, los hallazgos más destacados en los tipos principales de EB, según los datos aportados por Fine y cols. [2000], basados en la información generada por el NEBR (*National Epidermolysis Bullosa Registry*).

En la Tabla 2 se puede consultar la relación de patologías con las que debe hacerse el diagnóstico diferencial de la EB en el neonato.

Por lo que respecta a los genes responsables de la aparición de la EB, también existe heterogeneidad. Hasta el momento, se han identificado varios, cuyas localizaciones cromosómicas resumimos a continuación, según los tipos principales de EB:

- EB simple: 8q24, 12q13, 17q12-q21
- EB hemidesmosómica: 1q25-q31, 1q32, 10q24.3, 17q11-qter, 18q11.2
- EB de la unión, o juntural: 1q25-q31, 1q32, 18q11.2
- EB distrófica: 3p21.3

TABLA 1  
HALLAZGOS COMPARATIVOS EN LOS TIPOS PRINCIPALES DE EB [Modificado de Fine y cols., 2000]

	EB SIMPLE		EB DE LA UNIÓN		EB DISTROFICA			
	WEBER-COCKAYNE	KÖBNER	DOWLING-MEARA	HERLITZ	NO-HERLITZ	DOMINANTE	HALLOPEAU-SIEMENS	NO-HALLOPEAU-SIEMENS
Modo de herencia	AD*	AD	AD	AR	AR	AD	AR	AR
Edad de comienzo	Infancia	Nacimiento	Nacimiento	Nacimiento	Nacimiento	Nacimiento	Nacimiento	Nacimiento
Distribución cutánea	Palmas y plantas	Generalizada	Generalizada	Generalizada	Generalizada	Generalizada	Generalizada	Generalizada
Hallazgos cutáneos (frecuencia) <sup>†</sup>								
- Ampollas	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%
- Milia	1-5%	10,1-25%	10,1-25%	5,1-10%	5,1-10%	50,1-75%	75,1-100%	75,1-100%
- Atrofia	10,1-25%	50,1-75%	25,1-50%	50,1-75%	50,1-75%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%
- Uñas distroóficas/ausentes	10,1-25%	50,1-75%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%	75,1-100%
- Tejido granular	<1%	1-5%	No	50,1-75%	10,1-25%	No	10,1-25%	10,1-25%
- Alt. Scalp	<1%	5,1-10%	1-5%	10,1-25%	25,1-50%	10,1-25%	25,1-50%	10,1-25%
- Queratoderma palmopl.	Callosidades	Callosidades	A menudo confluyente	No	No	No	No	No
- Otros	No	No	Ampoll. agrup. herpetiforme	No	No	No	No	No
Inducción de ampollas	Variable	Común	Común	Frecuente	Frecuente	Variable	Frecuente	Frecuente
Afectación extracutánea <sup>†</sup>								
- Anemia	1-5%	10,1-25%	5,1-10%	50,1-75%	5,1-10%	10,1-25%	75,1-100%	25,1-50%
- Retraso crecimiento	<1%	1-5%	10,1-25%	25,1-50%	10,1-25%	1-5%	75,1-100%	10,1-25%
- Cavidad oral								
- Alt. tej. blandos	25,1-50%	50,1-75%	25,1-50%	50,1-75%	75,1-100%	50,1-75%	75,1-100%	75,1-100%
- Hipoplasia de esmalte	10,1-25%	10,1-25%	10,1-25%	75,1-100%	75,1-100%	10,1-25%	10,1-25%	25,1-50%
- Caries	Frec. normal	Frec. normal	Frec. normal	Exceso	Exceso	Fr. Normal	Exceso	Frec. normal
- Tracto gastrointestinal	1-5%	10,1-25%	10,1-25%	25,1-50%	10,1-25%	10,1-25%	75,1-100%	25,1-50%
- Genitourinario	<1%	1-5%	1-5%	5,1-10%	5,1-10%	1-5%	1-5%	1-5%
- Ocular	<1%	1-5%	5,1-10%	25,1-50%	25,1-50%	No	50,1-75%	10,1-25%
- Pseudosindactilia	No	No	1-5%	5,1-10%	No	No	75,1-100%	25,1-50%
- Tracto respiratorio	<1%	1-5%	5,1-10%	25,1-50%	10,1-25%	No	1-5%	1-5%
Riesgo acumulativo (30 años) <sup>†</sup>								
- Carcinoma cél. escamosas	0	0	0	0	Raro	0	39,6%	14,3%
- Melanoma maligno	0	0	0	0	0	0,8%	2,5% (12 años)	0,7% (12 años)
- Carcinoma cél. basales	0	0	0	0	0	0,9%	0	0
- Muerte (todas las causas)	0,6%	0,6%	1,4%	42,2%	38,2%	0	38,7%	10%

AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva

\* Herencia recesiva descrita en, al menos, dos familias

† Frecuencia relativa basada en el estudio del NEBR (National Epidermolysis Bullosa Registry) [Fine y cols., 1999]

TABLA 2  
DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LA EB EN EL NEONATO

Acrodermatitis enterohéptica
Aplasia de cutis
Dermatosis erosiva con cicatrización flexible reticulada
Displasias ectodérmicas
— Síndrome de Hay-Wells
— Displ. ectodérmica con déficit de placofilina 1
Eritroderma ictiosiforme congénita bullosa
Incontinentia pigmentii
Ictiosis bullosa de Siemens
Paquioniquia congénita
Porfirias congénitas
Síndrome de Kindler
Síndrome de Mendes da Costa
Síndrome de "peeling"
Síndrome de Shabbir

## Base molecular de la EB

En la Tabla 3 mostramos la clasificación genético-molecular de la EB, según Uitto y Richard [2004], indicando el tipo de herencia descrita para cada una de las formas principales de EB, así como los genes mutados identificados, las proteínas afectadas por tales mutaciones, y las mutaciones características de cada una de ellas. En total, se han descrito mutaciones en 10 genes distintos con expresión en torno a la unión dermo-epidérmica.

El estudio molecular de la membrana basal y los estratos más próximos, permitió confirmar la presencia de diversas macromoléculas que garantizan el correcto anclaje de las distintas capas de la piel. Las mutaciones que impiden o alteran la formación de dichas macromoléculas dan lugar a las distintas formas de EB.

Las *queratinas* son una familia de unas 50 proteínas distintas que constituyen un citoesqueleto tridimensional y altamente dinámico en el espacio comprendido entre el núcleo y la membrana celular, confiriendo a los tejidos epiteliales integridad estructural, pero también flexibilidad. Los genes responsables de su formación se encuentran agrupados en 17q12-q21 y 12q11-q13. Las *queratinas 5 y 14* se combinan para formar los filamentos intermedios en los queratinocitos basales de la epidermis. La mayoría de los casos de **EB simple** se asocian con mutaciones, generalmente dominantes (aunque también las hay recesivas), de los genes que codifican para estas queratinas, dando lugar a alteraciones en las mismas que impiden el correcto ensamblaje de los filamentos que las constituyen [Lane, 1994; Cassidy y cols., 2002]. Existe una moderada correlación entre los distintos fenotipos englobados en la EB simple, y los dominios funcionales de *KRT5* y *KRT14* en los que ocurre la mutación

[Irvine y McLean, 2003]. Las mutaciones que afectan a las regiones más conservadas de las queratinas, situadas en sus extremos, producen las formas más graves de EB simple, como la de tipo Dowling-Meara. Las mutaciones que afectan a zonas alejadas de esos extremos dan lugar a fenotipos menos graves, como el de la forma de EB simple tipo Weber-Cockayne. Los pacientes con mutaciones en el exón 1 de *KRT5* (P25L, con sustitución de una prolina por leucina) [Utam y cols., 1996], que es la región que codifica el segmento aminoterminal de la queratina 5, presentan pigmentación moteada debido a un incremento en el número de melanosomas en los queratinocitos basales [Nobuhara, 2003], así como de macrófagos dérmicos y células de Schwann. También se han identificado mutaciones autosómicas recesivas en *KRT14* que dan lugar a un fenotipo más o menos grave de tipo Dowling-Meara, o de tipo Köbner.

La **EB hemidesmosómica** se produce como consecuencia de mutaciones que afectan a las proteínas intracelulares integrantes de los *hemidesmosomas* [Pulkkinen y Uitto, 1998]. Estos están constituidos por 4 tipos de proteínas: BPAG1 (de la familia de la plaquina), BPAG2 (también conocida como colágeno XVII o COL17A1), las subunidades  $\alpha 6$  y  $\beta 4$  de la integrina (que contribuye al anclaje de los queratinocitos basales a la membrana basal), y la plectina (que tiene homología con la desmoplaquina). En el momento actual se distinguen 4 tipos de EB hemidesmosómica: la generalizada atrófica benigna (GAB o GABEB), la EB con atresia pilórica, la EB con distrofia muscular, y la variante de Ogná. Se han encontrado mutaciones en los genes que codifican para 3 de las proteínas asociadas estructuralmente a los hemidesmosomas (Tabla 3). En la forma GAB se han identificado varias mutaciones distintas en el gen *BPAG2/COL17A1* [Schumann y cols., 1997], pero no se ha observado una estricta correlación entre el genotipo y el fenotipo, y aunque generalmente se hereda de forma recesiva, también se ha identificado una mutación dominante en un alelo de *COL17A1*, por sustitución de una glicina en uno de los alelos mientras en el otro alelo hay un codón de finalización prematura (PTC son su siglas en inglés) [McGrath y cols., 1996]. La forma de EB con atresia pilórica está producida por diversos tipos de mutaciones en alguno de los genes que codifican para las subunidades  $\alpha 6$  y  $\beta 4$  de la integrina (ITGA6 y ITGB4) [Pulkkinen y cols, 1998], fundamentalmente de la  $\beta 4$ . En el caso de la forma de EB con distrofia muscular, hay una ausencia total (demostrada por inmunofluorescencia) de plectina, que es una proteína que interactúa con los filamentos intermedios, pero que también se expresa en células y tejidos como el sarcolema del músculo; el fallo es debido a mutaciones en el gen *PLEC1* [Chavanas y cols., 1996]. En la variante de Ogná, se trata de la mutación R2110W de sentido incorrecto (*missense*) en ese mismo gen, que no produce fenotipo patológico en el tejido muscular.

TABLA 3  
CLASIFICACION GENETICO-MOLECULAR DE LA EB [Uitto y Richard, 2004]

TIPO DE EB	HERENCIA	GENES MUTADOS	PROTEINAS AFECTADAS	MUTACIONES CARACTERISTICAS
SIMPLE -Dowling-Meara -Weber-Cockayne -Köbner -Pigmentación moteada	AD/AR AD AD/AR AD	KRT5, KRT14	Queratinas 5 y 14	Mis (AD), PTC/PTC (AR) Mis (AD), Mis/Mis, PTC/Mis (AR) Mis (AD), PTC/PTC, Mis/Mis, Spl/Spl (AR) P25L-KRT5
HEMIDESMOSOMICA -GAB (o GABEB) -Con atresia pilórica -Con distrofia muscular -De Ogna	AR (AD) AR AR AD	COL17A1 ITGA6, ITGB4 PLEC1 PLEC1	Colágeno XVII Integrina $\alpha 6\beta 4$ Plectina Plectina	PTC/PTC, PTC/Mis, Mis/Mis PTC/PTC, PTC/Mis, Mis/Mis PTC/PTC, PTC/Mis, Mis/Mis R2110W
DE LA UNION  -Herlitz -No Herlitz	  AR AR	LAMA3, LAMB3, LAMC2	Subunidades $\alpha 3, \beta 3, \gamma 2$ de laminina	  PTC/PTC PTC/Mis, in-frame del/in-frame del
DISTROFICA -Hallopeau-Siemens -Mitis -Dominante	AR AR AD	COL7A1	Colágeno VII	PTC/PTC, PTC/GS Mis/Mis, GS/GS GS

AD: autosómica dominante; AR: autosómica recesiva; GAB: generalizada atrófica benigna; GS: mutación por sustitución de glicina; in-frame del: delección *in-frame*; Mis: Mutación *missense*; PTC: codón de terminación prematura; Spl: mutación *splice site*.

Los *filamentos de anclaje* están compuestos por laminina 5, y la **EB de la unión, o juntural**, se origina a nivel de la lámina lúcida, como consecuencia de mutaciones (*LAMA3*, *LAMB3* y *LAMC2*) en los genes que codifican para las cadenas o subunidades  $\alpha 3, \beta 3, \gamma 2$  de la laminina 5, de modo que tales subunidades no se forman, o lo hacen incorrectamente y no se pueden ensamblar de un modo adecuado para dar lugar al trímero de laminina [Colognato y Yurchenko, 2000]. En los casos con este tipo de EB se demuestra la ausencia de esta proteína. Más de la mitad de los casos de EB de la unión están producidos por una o dos mutaciones recurrentes en R635X y R42X del gen *LAMB3* [Nakano y cols., 2000], por lo que son de mucha utilidad, tanto con fines diagnósticos en niños y adultos, como en el diagnóstico prenatal. En el tipo Herlitz, las mutaciones en el gen que da lugar a la laminina 5 tienen como consecuencia la ausencia total de expresión de la misma en los tejidos. También por lo que respecta al tipo Herlitz, se ha descrito isodisomía parental materna (en relación con *LAMB3*) o paterna (en relación con *LAMC2*) de un segmento del cromosoma 1. Por lo que se refiere al tipo No-Herlitz de EB, el problema también reside en mutaciones en los genes de la laminina 5 [Nakano y cols., 2002], de modo que algunos filamentos de anclaje tienen reducida su función.

Las *fibrillas de anclaje* que mantienen unida la membrana basal a la hipodermis están constituidas por colágeno VII (COL7A1), y todas las mutaciones responsables de la **EB distrófica** afectan, hasta donde se sabe hoy día, a este tipo de colágeno [Uitto y Pulkkinen, 2001], de modo que las fibrillas están alteradas en mayor o menor medida, e incluso ausentes, como ocurre en las formas recesivas, en las que los codones de terminación prematura dan lugar a la ausencia de colágeno en los tejidos. No se ha observado heterogeneidad de locus, y existe una clara correlación genotipo-fenotipo. Las mutaciones que producen sustituciones de glicina en la región de triple hélice pueden impedir el correcto ensamblaje de la molécula de colágeno VII, dando lugar a las formas dominantes de EB distrófica. Estas sustituciones de glicina también se observan en la forma pretibial de EB, en el síndrome de Bart y en la EB simple superficialis [Martínez-Mir y cols., 2002], por lo que se pueden considerar alélicas a la EB distrófica dominante.

Con los datos que mostrábamos en la Figura 2 y en las Tablas 1 y 3, aunque puede haber subtipos de EB coincidentes en muchas características, es posible encuadrar el primer diagnóstico de prácticamente cualquier paciente con EB, y pueden ser de gran ayuda para los clínicos que han de dirigir las pautas a seguir con el fin de intervenir precozmente y favorecer el establecimiento de la mejor situación sa-

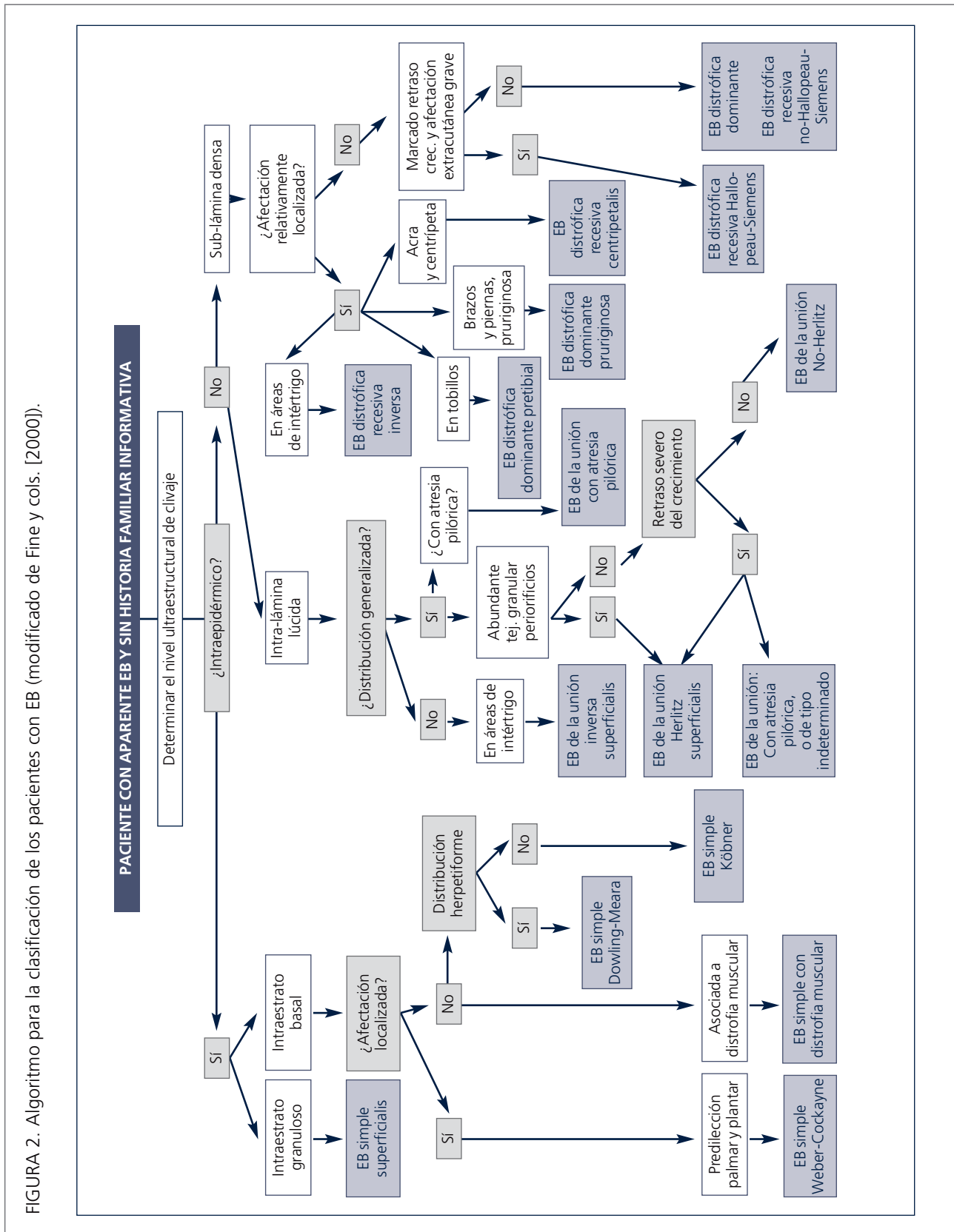


FIGURA 2. Algoritmo para la clasificación de los pacientes con EB (modificado de Fine y cols. [2000]).

nitaria de los niños afectados, así como evitar consecuencias discapacitantes irreversibles, aunque ese primer diagnóstico deba ser complementado con el estudio del genotipo, si ello es posible.

### Implicaciones translacionales del análisis de mutaciones y futuro de la EB

El estado actual de conocimientos con respecto a las mutaciones relacionadas con la EB tiene importantes implicaciones translacionales, en el sentido de que permite proporcionar a muchos pacientes y a sus familias un diagnóstico molecular que, por tanto, es objetivo y más certero que el diagnóstico clínico e histológico/inmunohistoquímico. Contar con dicho diagnóstico puede facilitar conocer el pronóstico, los riesgos de recurrencia, los riesgos de transmisión de los genes responsables de la EB, y las posibilidades de diagnóstico prenatal mediante el estudio del ADN.

El diagnóstico prenatal se ha venido haciendo en familias de riesgo en determinados países, desde hace ya más de dos décadas, utilizando la combinación de técnicas ul-

traestructurales e inmunohistoquímicas sobre muestras procedentes de biopsia fetal [Holbrook y cols., 1993; Eady, 1998; Holbrook y cols., 1999], para los casos de EB distrófica y juntural (de la unión), y algunos tipos de EB simple (Dowling-Meara y el tipo recesivo sin distrofia muscular) y para la EB con distrofia muscular. La biopsia, que no está exenta de riesgo para la integridad, e incluso para la supervivencia fetal, se realiza en una fase ya avanzada del desarrollo prenatal, alrededor de la semana 16-18. Más recientemente, se viene realizando el diagnóstico prenatal molecular ya a partir de la semana 10 de gestación, mediante el estudio de vellosidades coriales (también con ciertos riesgos), o a partir de la semana 15 mediante amniocentesis [Pfundner y cols., 2003], con lo que se puede evitar la biopsia de piel fetal.

En el caso de la EB distrófica se puede realizar el análisis directo de la mutación, o el estudio de ligamiento, puesto que no hay evidencias de heterogeneidad de locus. Por el contrario, en el caso de la EB simple y de la EB de la unión, la situación es diferente, dado que hay una considerable heterogeneidad de locus y el mismo fenotipo puede estar producido por diversas mutaciones en genes distintos. En la actualidad también se está trabajando para hacer posible el

FIGURA 3. Imágenes de varios casos de EB de la unión y EB distrófica registrados en el ECEMC.





diagnóstico prenatal no invasivo en fases tempranas de la gestación mediante el estudio de ADN fetal presente en la circulación materna [Uitto y cols., 2003].

Otra de las implicaciones del estudio de las mutaciones, es que sienta las bases para el diagnóstico genético preimplantatorio mediante el análisis de blastómeros, lo cual podría evitar la gestación de fetos afectados y la subsecuente interrupción de muchas de tales gestaciones [McGrath y Handyside, 1998; Cserhalmi-Friedman y cols., 2000].

Hemos de destacar que la identificación de muchos genes implicados en el origen de las diversas formas de EB, así como otras enfermedades de la piel, no sólo tiene importancia con fines diagnósticos, sino que ha permitido esclarecer los procesos patogénicos por los que éstas se producen. El estudio de la correlación entre los distintos genotipos y fenotipos ha conducido a una mejor comprensión del complejo papel de los genes en la estructura y fisiología de la piel. A pesar del rápido avance en el conocimiento de la patogenia molecular de la EB, ésta no ha conducido, por el momento, a soluciones definitivas para su tratamiento.

A grandes rasgos, la epidermis consiste en un epitelio estratificado compuesto por queratinocitos que se encuentran sobre un compartimento de células troncales en constante regeneración. La terapia génica puede ser considerada como uno de los tratamientos potenciales. El cultivo *ex vivo* de células troncales epidérmicas humanas y el empleo de vectores para transferencia de genes, pueden llegar a "corregir" genéticamente los queratinocitos, de modo que adquieren propiedades de adhesión también correctas. En este sentido, se ha progresado mucho en los últimos 10 años, de modo que la modificación de genes en células troncales, en combinación con las técnicas de ingeniería de tejidos podría representar una opción realista para los pacientes con EB, aunque aún queda bastante camino por recorrer [Ferrari y cols., 2005].

## Aspectos epidemiológicos de la EB. Casos registrados en el ECEMC

Por lo que respecta a su frecuencia, hay que tener en cuenta que muchos de los casos más leves de EB no son notificados en la mayoría de los registros y centros. Según los datos generados por el *National Epidermolysis Bullosa Registry* (NEBR) de Estados Unidos, se producen 50 casos por cada millón de nacidos vivos. De ellos, aproximadamente el 92% son casos de EB simple, el 5% tienen EB distrófica, el 1% EB de la unión (juntural), y el 2% no clasificados. Los pacientes con la forma hemidesmosómica, probablemente representan mucho menos del 1% del total de casos con EB. La frecuencia global, también según datos del NEBR, podría

ascender hasta 54 casos por millón de nacidos vivos en Noruega, siendo inferiores las cifras registradas en Croacia (9,6 casos por millón de nacidos vivos) y Japón (7,8 casos por millón). Según DEBRA (*Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association*), la prevalencia en Escocia [Horn y cols., 1994] sería de 31 casos por millón. En Irlanda, sin embargo, según Humphries y cols. [1996], la estimación sería de 1/80.000. De todos modos, está ampliamente admitido que la determinación de la frecuencia de EB está sujeta a múltiples sesgos y el registro de los casos es siempre incompleto.

En el Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC), en el período comprendido entre Abril de 1976 y Diciembre de 2004, registramos un total de 27 casos con EB entre un total de 2.204.264 recién nacidos vivos controlados, o lo que es lo mismo, 12 casos por millón de nacidos vivos, con un intervalo de confianza (al 95%) entre 8 y 18. Hay que tener en cuenta que el período de observación del ECEMC son las primeras 72 horas de vida, por lo que una cierta proporción de casos, en los que las primeras manifestaciones se produzcan después de dicho período, no van a ser registrados. Una dificultad importante, a la hora de analizar los casos con EB, proviene del hecho de que en muchos de ellos no se dispone del estudio histológico de microscopía electrónica y otros estudios complementarios (bien por no contar con dichos resultados, o por no haber sido realizados). De los 27 casos, 1 tenía EB simple (de tipo indeterminado), 4 tenían EB con atresia pilórica, 3 tenían EB juntural (de la unión) de tipo no determinado, 1 tenía EB distrófica de Hallopeau-Siemens, 4 EB distrófica recesiva, 1 EB distrófica de tipo indeterminado, y otros 13 EB de tipo no determinado (5 de los cuales eran compatibles con un patrón de herencia recesiva).

## Guías para el manejo del paciente con EB

Ante un niño (recién nacido o no) con una posible EB, debe realizarse un cuidadoso examen físico, en el que se evalúen todas las áreas cutáneas y mucosas (conjuntival, respiratoria, oral, anal y genital). En dicha evaluación ha de tenerse en cuenta el tamaño, localización y características de las lesiones, así como la afectación de pelo y uñas, así como los dientes en pacientes más mayores. Durante la infancia pueden presentarse graves problemas, ya que la formación de ampollas, fundamentalmente en las formas de afectación generalizada, puede verse complicada por infección y, en muchos casos, sepsis e incluso muerte. Con frecuencia tienen lugar además complicaciones esofágicas (estenosis, formación de membranas, dificultad o dolor al tragar, especialmente los alimentos sólidos), tráqueo-larín-

geas (oclusión súbita de la tráquea, dificultad respiratoria de gravedad variable, que puede conducir incluso a la muerte por asfixia), músculo-esqueléticas (fundamentalmente contracturas y pseudo-sindactilia, que es común en la EB distrófica de Hallopeau-Siemens, suele ser recurrente y puede producir gran discapacidad), y formación de tumores, destacando especialmente el carcinoma de células escamosas (produciéndose frecuentemente varios tumores primarios, de carácter muy agresivo, con recurrencia local y a veces metástasis, teniendo mala respuesta a quimio y radioterapia), el melanoma maligno (con un riesgo significativo en la infancia en pacientes con EB distrófica AR) y el carcinoma de células basales (cuyo riesgo aumenta a partir de los 40 años, fundamentalmente en la EB simple generalizada).

Por todo esto, se debe establecer una actuación anti-paliadora para paliar los efectos. En general, en el paciente con EB se debe procurar:

- Protección frente a traumas mecánicos que pudieran producirse por el roce de la pinza del cordón umbilical (que debe atarse con nudos), con la banda de identificación del recién nacido, cintas adhesivas, ropas inadecuadas, chupetes o pendientes.
- Extremar las precauciones en caso de que sea necesario intubar al paciente o al introducir sondas, y hacerlo sólo en caso de extrema necesidad.
- Protección frente a altas temperaturas.  
Drenaje de ampollas y protección frente a infecciones.
- Uso de ropas con tejidos adecuados (de Mepitel, N-terface, gasa impregnada en vaselina o Xeroform, etc). Procurar que el bebé no permanezca desnudo, para así evitar lesiones por roce.
- Evitar el contacto con juguetes o estructuras que pudieran precipitar la formación de ampollas.  
Paliar el dolor y prevenir la inflamación.
- Identificar precozmente las complicaciones esofágicas, tráqueo-laríngeas y músculo-esqueléticas, con el correspondiente tratamiento quirúrgico si aparecen y fuera preciso.
- Vigilar la aparición de déficit de hierro y anemia.
- Corregir deficiencias nutricionales.
- Resolver el problema de la ingestión de alimentos en casos con dificultad para la deglución o con lesiones esofágicas.
- Prevenir o resolver situaciones de estreñimiento.
- Teniendo en cuenta que ni la microscopía óptica, ni las características clínicas son suficientes o adecuadas para un diagnóstico correcto, es obligado efectuar primero el estudio histológico mediante microscopía electrónica y técnicas inmunohistoquímicas, para posteriormente tra-

tar de definir el genotipo mediante el estudio de mutaciones, si es posible realizarlo.

- Proporcionar asesoramiento genético e información a la familia en lo que respecta a los cuidados que precisará el paciente y el pronóstico posible de la enfermedad.
- Vigilar aparición de tumores y, en su caso, establecer el tratamiento más adecuado (quirúrgico, quimioterapia/radioterapia).
- Si es preciso, instaurar la fisioterapia más adecuada a cada caso.
- Vigilar la buena salud buco-dental.
- Establecer contacto con asociaciones/grupos de apoyo.

### Laboratorios donde se efectúa el estudio molecular de la EB

Desafortunadamente, por lo que hemos podido saber, en ningún laboratorio español se realiza en el momento actual el estudio molecular de la EB.

#### • Laboratorios europeos en los que se realiza el diagnóstico molecular de los tres tipos principales de EB

(según la información que figura en la base de datos de Orphanet: [www.orpha.net](http://www.orpha.net)). Indicamos a continuación, por países, las personas de contacto y su correspondiente dirección de correo electrónico entre paréntesis:

- Alemania (Freiburgo):  
Dr. Christina HAS  
(eb-zentrum@haut.ukl.uni-freiburg.de)
- Austria (Salzburgo):  
Pr. Johann BAUER  
(jo.bauer@salk.at)
- Francia (Niza):  
Dr. Guerrino MENEGUZZI  
(meneguzz@unice.fr)
- Francia (París):  
Dr. Catherine PROST  
(prost.francois@free.fr)  
Dr. Claudine BLANCHET-BARDON  
(claudine.blanchet-bardon@sls.aphp.fr)
- Italia (Roma):  
Dr. Daniele CASTIGLIA  
(d.castiglia@idi.it)
- Suiza (Lausanne):  
Dr. Marcel HUBER  
(marcel.huber@chuv.hospvd.ch)

Aparte de los laboratorios europeos mencionados, en la Universidad Thomas Jefferson, de Filadelfia (Estados Unidos), existe un departamento de Dermatología y Biología cutánea, dirigido por el Prof. Jouni UITTO (Jouni.Uitto@mail.tju.edu), con una amplísima experiencia

y que ha contribuido de forma muy relevante a la investigación sobre la EB, y en el que también se realiza el diagnóstico molecular.

• **Laboratorios en los que se realiza el estudio de la EB simple y la EB distrófica (según datos de Orphanet):**

— Francia (Toulouse):  
Prof. Patrick CALVAS  
(calvas.p@chu-toulouse.fr)

• **Laboratorios en los que se realiza únicamente el estudio de la EB simple (también según datos de Orphanet):**

— Alemania (Colonia):  
Dr. Bernhard KORGE  
(b.korge@uni-koeln.de)

— Italia (Roma):  
Dr. Francesco FIORENTINO  
(fiorentino@laboratorio-genoma.it)

— Reino Unido (Dundee):  
Dr. David BATY  
(david.u.baty@tuht.scot.nhs.uk)

• **Laboratorios en los que se lleva a cabo únicamente el estudio de la EB distrófica:**

— Italia (Brescia):  
Prof. Sergio BARLATI  
(barlati@med.unibs.it)

Otra dirección importante a tener en cuenta es la del NEBR (National Epidermolysis Bullosa Registry):  
e-mail: EB\_registry@med.unc.edu

## Recursos para pacientes

Aparte de toda la ayuda que les puedan prestar los servicios médicos especializados, en España existe la **“Asociación de Epidermolisis Bullosa de España”** (AEBE), que desarrolla una importante actividad, y cuyos datos de contacto son los siguientes: C/Real. Conjunto Puertogolf, Apt. 36. 29660-Nueva Andalucía. Marbella (Málaga). Teléfono y FAX: 952 816 434. e-mail: aebe@aebe-debra.org

AEBE dispone también de página web, cuyo acceso es: <http://www.aebe-debra.org>

Además, existe la **“Asociación de Epidermolisis Bullosa de Cataluña”**, cuya dirección y teléfono de contacto son los siguientes: Gran Vía de las Corts Catalanes 562, principal 2ª. 08011-Barcelona. Teléfono: 93 451 5550.

## Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado con una ayuda de la “Fundación 1000 sobre defectos congénitos”

## Referencias

- Cassidy AJ, Lane EB, Irvine AD, McLean WHI (2002). The human intermediate filament mutation database <http://www.interfil.org> edn, Dundee, UK.
- Chavanas S, Pulkkinen L, Gache Y, Smith FJD, McLean WHI, Uitto J, Ortonne JP, Meneguzzi G (1996). A homozygous mutation in the PLEC1 gene in patients with epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J Clin Invest* 98:2196-2200.
- Cognato H, Yurchenco PD (2000). Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218-234.
- Cserhalmi-Friedman PB, Tang Y, Adler A, Krey L, Grifo JA, Christiano AM (2000). Preimplantation genetic diagnosis in two families at risk for recurrence of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol* 9:290-297.
- Eady RAJ (1998). Epidermolysis bullosa. En: Champion RH, Burton JL, Edling FJG, editors. *Textbook of dermatology*. 6th ed. Oxford: Blackwell Science. P.437-447 y 1817-1844.
- Ferrari S, Pellegrini G, Mavilio F, De Luca M (2005). Gene therapy approaches for epidermolysis bullosa. *Clin Dermatol* 23(4):430-436.
- Fine J-D, Bauer EA, McGuire J, Moshell A, editores (1999). Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Fine J-D, Eady RAJ, Bauer EA, Briggaman RA, Bruckner-Tuderman L, Christiano A, Heagerty A, Hintner H, Jonkman M, McGrath J, McGuire J, Moshell A, Shimizu H, Tadini G, Uitto J (2000). Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the Second International Consensus Meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol* 42:1051-1066.
- Holbrook KA, Smith LT, Elias S (1993). Prenatal diagnosis of genetic skin disease using fetal skin biopsy samples. *Arch Dermatol* 129:1437-1454.
- Holbrook KA, Fine JD, Elias S, Christiano AM (1999). Prenatal diagnosis of inherited epidermolysis bullosa: ultrastructural, antigenic, and molecular approaches. En: Fine J-D, Bauer EA, McGuire J, Moshell A, editors (1999). Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry. Baltimore: Johns Hopkins University Press. P. 351-373.
- Horn HM, Tidman MJ, Priestley GC (1994). The National Epidermolysis Bullosa Register: preliminary Scottish data. *Clin Exper Dermatol* 19:443.
- Humphries MM, Mansergh FC, Kiang AS, Jordan SA, Sheils DM, Martin MJ, Farrar GH, Kenna PF, Young MM, Humphries P (1996). Three keratin gene mutations account for the majority of dominant simplex epidermolysis bullosa cases within the population of Ireland. *Hum Mutat* 8(1):57-63.
- Irvine Ad, McLean WH (2003). The molecular genetics of the genodermatoses: progress to date and future directions. *Br J Dermatol* 148:1-13.
- Lane EB (1994). Keratin diseases. *Curr Opin Genet Derm* 4:412-418.
- Martínez-Mir A, Liu J, Gordon D, Weiner MS, Ahmand W, Fine JD, Ott J, Gilliam TC, Christiano AM (2002). EB simplex superficialis resulting from a mutation in the type VII collagen gene. *J Invest Dermatol* 118:547-549.
- McGrath J, Gatalica B, Li L, Dunnill MGS, McMillan JR, Christiano AM, Eady RAJ, Uitto J (1996). Compound heterozygosity for a dominant glycine substitution and a recessive internal duplication mutation in the type XVII collagen gene results in junctional epidermolysis bullosa and abnormal dentition. *Am J Pathol* 148:1787-1796.

- McGrath JA, Handyside AH (1998). Preimplantation genetic diagnosis of severe inherited skin diseases. *Exp Dermatol* 7:65-72.
- Nakano A, Pfindner E, Pulkkinen L, Hashimoto I, Uitto J (2000). Herlitz junctional epidermolysis bullosa: Novel and recurrent mutations in the LAMB3 gene and the population carrier frequency. *J Invest Dermatol* 115:493-498.
- Nakano A, Chao S-C, Pulkkinen L, Murrel D, Bruckner-Tuderman L, Pfindner E, Uitto J (2002). Laminin 5 mutations in junctional epidermolysis bullosa: Molecular basis of Herlitz vs. Non-Herlitz phenotypes. *Hum Genet* 110:41-51.
- Nobuhara S (2003). The head domain of keratin 5 binds to a dynein light chain, the cytoplasmic motor cargo complex, and might be involved in the distribution of keratin filaments and melanosomes. *J Invest Dermatol* 121:0498A.
- Pfindner E, Nakano A, Pulkkinen L, Christiano AM, Uitto J (2003). Prenatal diagnosis for epidermolysis bullosa: A study of 144 consecutive pregnancies at risk. *Prenat Diagn* 23:447-456.
- Pulkkinen L, Rouan F, Brucker-Tuderman L, Wallerstein R, Garzon M, Brown T, Smith L, Carter W, Uitto J (1998). Novel ITGB4 mutations in lethal and non-lethal variants of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: Missense vs. Nonsense. *Am J Human Genet* 63:1376-1387.
- Pulkkinen L, Uitto J (1998). Hemidesmosomal variants of epidermolysis bullosa. Mutations in the  $\alpha 6\beta 4$  integrin and the 180-kD Dab-  
Ilos pemphigoid antigen/type XVII collagen genes. *Exp Derm* 7:46-64.
- Schuman H, Hammami-Hauasli N, Pulkkinen L, Mauviel A, Küster W, Lüthi U, Owaribe K, Uitto J, Bruckner-Tuderman L (1997). Three novel homozygous point mutations and a new polymorphism in the COL17A1 gene: Relation to biological and clinical phenotypes of junctional epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet* 60:1344-1353.
- Uitto J, Christiano AM (1992). Molecular genetics of the cutaneous basement membrane zone. Perspectives on epidermolysis bullosa and other blistering skin diseases. *J Clin Invest* 90:687-692.
- Uitto J, Pfindner E, Jackson LC (2003). Probing the fetal genome: Progress towards non-invasive prenatal diagnosis. *Trends Mol Med* 9:339-343.
- Uitto J, Pulkkinen L (2001). Molecular genetics of heritable blistering disorders. *Arch Dermatol* 137(11):1458-1461.
- Uitto J, Richard G (2004). Progress in epidermolysis bullosa: genetic classification and clinical implications. *Am J Med Genet* 131C:61-74.
- Utam J, Hutton E, Coulombe PA, Anton-Lamprecht I, Yu WC, Gedde-Dahl T Jr, Fine JD, Fuch E (1996). The genetic basis of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9079-9084.