



## ARTIGO ORIGINAL

# Vantagens do sequenciamento completo do exoma sobre o imunomapeamento em 67 pacientes brasileiros com epidermólise bolhosa<sup>☆,☆☆</sup>



Samantha Vernaschi Kelmann <sup>ID a</sup>, Bruno de Oliveira Stephan <sup>ID a,\*</sup>,  
 Silvia Maria de Macedo Barbosa <sup>ID b</sup>, Rita Tiziana Verardo Polastrini <sup>ID b</sup>,  
 Zilda Najjar Prado de Oliveira <sup>ID c</sup>, Maria Cecília Rivitti-Machado <sup>ID c</sup>,  
 Gustavo Marquezani Spolador <sup>ID a</sup>, Rachel Sayuri Honjo <sup>ID a</sup>, Ken Saida <sup>ID d</sup>,  
 Naomichi Matsumoto <sup>ID d</sup> e Chong Ae Kim <sup>ID a</sup>

<sup>a</sup> Unidade de Genética, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>b</sup> Unidade de Dor e Cuidados Paliativos, Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>c</sup> Departamento de Dermatologia, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>d</sup> Departamento de Genética Humana, Yokohama City University Graduate School of Medicine Yokohama, Yokohama, Japão

Recebido em 14 de abril de 2023; aceito em 21 de julho de 2023

## PALAVRAS-CHAVE

Epidermólise bolhosa;  
 Exoma;  
 Genética

## Resumo

**Fundamentos:** A epidermólise bolhosa (EB) é caracterizada por fragilidade da pele e formação de bolhas. No Brasil, o diagnóstico geralmente é obtido por meio de imunomapeamento, que envolve a realização de biópsia de pele. Mais recentemente, o sequenciamento completo do exoma (WES, do inglês *whole exome sequencing*) tornou-se importante ferramenta para o diagnóstico dos subtipos de EB, fornecendo informações sobre o prognóstico, bem como possibilitando aconselhamento genético adequado às famílias.

**Objetivo:** Comparar os resultados do imunomapeamento e da análise molecular e descrever as características de uma coorte brasileira de pacientes com EB.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2023.07.002>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Kelmann SV, Stephan BO, Barbosa SMM, Polastrini RTV, Oliveira ZNP, Rivitti-Machado MC, et al. Advantages of whole-exome sequencing over immunomapping in 67 Brazilian patients with epidermolysis bullosa. An Bras Dermatol. 2024;99:350–6.

<sup>☆☆</sup> Trabalho realizado em sua maior parte em São Paulo, SP, Brasil, no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde o paciente frequentava a Unidade de Dor e Cuidados Paliativos Pediátricos e a Unidade de Genética; o imunomapeamento foi realizado pelo Departamento de Dermatologia da mesma instituição. Todos os testes genéticos foram realizados em colaboração com os colegas pesquisadores japoneses do Departamento de Genética Humana da Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japão.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [bruno.stephan@hc.fm.usp.br](mailto:bruno.stephan@hc.fm.usp.br) (B.O. Stephan).

**Métodos:** Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e WES utilizando amostras de sangue periférico. Os resultados do WES foram comparados aos obtidos nos testes de imunomapeamento no tecido obtido por biópsia de pele.

**Resultados:** Foram classificados 67 pacientes de 60 famílias: 47 pacientes com EB distrófica (EBD) recessiva, quatro com EBD dominante, 15 com EB simples (EBS) e um com EB juncional (EBJ). As novas variantes causativas foram: 10/60 (16%) em COL7A1 associada a EBD recessiva e três outras variantes em EBD dominante; uma variante homocigótica em KRT5 e outra variante homocigótica em PLEC, ambas associadas à EBS. O imunomapeamento estava disponível para 59 dos 67 pacientes, e o resultado foi concordante com os resultados do exoma em 37 (62%), discordante em 13 (22%) e inconclusivo em nove pacientes (15%).

**Limitações do estudo:** Embora a EB seja doença rara, para fins estatísticos, o número de pacientes avaliados por essa coorte ainda pode ser considerado limitado; por outro lado, houve diferença significativa entre a proporção dos tipos de EB (apenas um caso com EBJ, contra mais de 50 com EBD), o que infelizmente representa viés de seleção. Além disso, para um pequeno subconjunto de famílias, a segregação (geralmente por meio do sequenciamento de Sanger) não era uma opção, seja em virtude do *status* de genitor(a) falecido(a) ou desconhecido(a) – principalmente o pai.

**Conclusão:** Embora o imunomapeamento tenha sido útil em serviços onde os estudos moleculares não estavam disponíveis, esse método invasivo pode fornecer diagnóstico errado ou resultado inconclusivo em cerca de 1/3 dos pacientes. Este estudo mostra que o WES é método eficaz para o diagnóstico e aconselhamento genético de pacientes com EB.

© 2024 Sociedade Brasileira de Dermatologia. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Introdução

A epidermólise bolhosa (EB) inclui um grupo de doenças genéticas caracterizadas por fragilidade cutânea grave e bolhas recorrentes.<sup>1,2</sup> A maioria dos casos tem início logo após o nascimento ou na primeira infância, embora a idade de início das lesões cutâneas seja variável. As lesões cutâneas geralmente ocorrem por trauma mínimo. Como a membrana basal é frágil e facilmente danificada na EB, há fluxo constante e posterior acúmulo de líquido extracelular na clivagem gerada entre epiderme e derme.

No geral, a EB compreende um grupo de doenças congênitas raras causadas por variantes patogênicas em quase 20 genes relacionados à expressão de proteínas relacionadas à aderência da pele, especialmente aquelas localizadas na zona da membrana basal. A prevalência é estimada em aproximadamente 8,22:1.000.000 e a incidência nos EUA é considerada de 19,6:1.000.000 de recém-nascidos, com números semelhantes em outros países e aparentemente sem grande distinção entre etnias. Mais de 30 tipos diferentes de EB foram descritos, com tentativa recente de dividi-los em quatro grandes grupos (2020): EB simples (EBS), EB distrófica (EBD), EB juncional (EBJ) e a forma híbrida, também conhecida como síndrome de Kindler (EBK). Tal classificação é baseada principalmente no padrão de herança (autossômica dominante ou recessiva), na gravidade do fenótipo e na análise histopatológica/imunomapeamento.

A análise com microscopia eletrônica e, posteriormente, o imunomapeamento a partir de uma biópsia de pele, eram o antigo método de referência para o diagnóstico de EB. Embora ambos consigam identificar o nível cutâneo onde está situada a clivagem da bolha (intradérmica ou subepidérmica) na maioria das vezes, não há indicação certa do gene afetado e, portanto, do padrão de herança de cada

paciente. Além disso, a biópsia de pele é procedimento invasivo (com necessidade de anestesia local e posterior sutura), e quando seus resultados são inconclusivos, muitas vezes há atraso e necessidade de uma segunda amostra, o que pode ser particularmente problemático em pacientes com EB.<sup>3</sup>

Nesse cenário, a análise molecular tornou-se ferramenta importante para diagnóstico mais preciso da EB, especialmente dada a recente consolidação e o acesso mais fácil às técnicas de sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*).<sup>4-8</sup> Aqui são comparados os resultados do imunomapeamento e do WES de uma coorte brasileira de 67 pacientes com EB.

## Método

### Informações clínicas

Foram estudados 67 pacientes de 60 famílias com diferentes tipos de EB, todos atendidos na Unidade de Dor e Cuidados Paliativos Pediátricos, na Unidade de Genética do Instituto da Criança e no Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Um protocolo clínico foi elaborado considerando história familiar, exame físico e dermatológico, evolução clínica e outros eventos clínicos importantes. Foram coletados o *pedigree* e feito o registro fotográfico de todas as famílias.

### Mapeamento por imunofluorescência

O imunomapeamento consiste em técnica de imunofluorescência indireta aplicada em fragmento de pele contendo uma bolha totalmente preservada, com análise da presença de antígenos na zona da membrana basal por meio da exposição a anticorpos monoclonais fluorescentes. Apenas

para lembrar, a imunofluorescência direta é restrita aos casos de EB autoimune adquirida (que não foram avaliados neste estudo) e, portanto, inútil para nossos pacientes com formas hereditárias de EB.

A maioria dos pacientes já havia sido submetida ao imunomapeamento no laboratório de Imunopatologia da instituição antes deste projeto. Aqui, os principais anticorpos utilizados foram anticorpo penfigoide bolhoso, anticorpo laminina, anticorpo colágeno tipo IV e anticorpo colágeno tipo VII. Cada um desses anticorpos é encontrado, respectivamente, nos seguintes locais da junção dermoepidérmica: hemidesmossomos, lâmina lúcida, lâmina densa e sublâmina densa.

Todas as análises de imunomapeamento foram realizadas e revisadas pelo dermatologista chefe do laboratório de Imunopatologia. Por fim, destaca-se o fato de que quatro famílias foram incluídas nas etapas finais do estudo e, portanto, não foram submetidas ao imunomapeamento; além disso, havia quatro parentes de três famílias nas quais os casos índices já tinham resultados de imunomapeamento e moleculares disponíveis; portanto, para esses oito pacientes, foi realizada apenas a confirmação molecular.

### Análise molecular e classificação de variantes

O sequenciamento completo do exoma (WES, do inglês *whole-exome sequencing*) foi realizado para todas as 60 famílias; amostras de sangue foram coletadas do probando e de seus pais, mas a análise preliminar concentrou-se principalmente no probando afetado. Após a identificação da(s) variante(s) candidata(s) no índice, a segregação foi então realizada por sequenciamento de Sanger nos pais (geralmente saudáveis); no caso de irmãos afetados, essa abordagem também era realizada. Todos os testes genéticos foram realizados pelos parceiros investigadores japoneses em Yokohama.

As variantes foram interpretadas e classificadas de acordo com as diretrizes de interpretação de variantes do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG; 2015). O caso somente foi considerado diagnosticado quando foram observadas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em um gene associado ao fenótipo do indivíduo estudado, com zigosidade compatível e em padrão de herança adequado.

## Resultados

### Achados clínicos

Achados clínicos típicos, como bolhas difusas, estavam presentes na maioria dos pacientes (48 de 67). Os sintomas e a idade de aparecimento eram obviamente variáveis, mas a maioria apresentava lesões cutâneas típicas desde os primeiros dias de vida. Como esperado para doença autossômica, não havia predomínio de gênero, com 34 mulheres e 33 homens no presente grupo. Além disso, ocorreram quatro óbitos entre os casos de EBD recessiva, todos com 20 anos ou menos, falecidos por sepse seguida de falência de múltiplos órgãos.

### Epidermólise bolhosa distrófica – COL7A1

A grande maioria dos pacientes (47/67) apresentava variantes no gene *COL7A1* associadas à herança autossômica recessiva; havia apenas três famílias com recorrência e irmãos afetados (total de sete pacientes). Dado que o diagnóstico específico de EB foi sugerido em apenas 29 dos 46 pacientes submetidos ao imunomapeamento nesse subconjunto (essa técnica não estava disponível para cinco indivíduos), a concordância com o WES foi de 63% para esse tipo de EB.

De acordo com a literatura, o fenótipo nesses casos tende a ser mais grave; a maioria dos pacientes nasceu a termo com aparecimento de bolhas nos primeiros 2 dias de vida; apenas dois deles nasceram sem unhas; todos referiram prurido intenso, e outros sintomas importantes eram comuns: dor crônica (78%), desnutrição (71,5%), anemia (48,9%), estenose esofágica com necessidade de dilatação (59,6%) e atraso no desenvolvimento (36%). Dentre eles, três pacientes evoluíram com neoplasia maligna de células escamosas, dois deles na região do calcâneo. Como esperado, as quatro mortes em todo o grupo foram de pacientes com EBD recessiva.

Por outro lado, quatro dos pacientes com EBD apresentaram variantes no gene *COL7A1* associadas a padrão autossômico dominante; todos eram casos esporádicos em suas respectivas famílias. Em contraste com a forma recessiva, os achados clínicos aqui podem ser considerados geralmente leves: as bolhas não apareceram até aproximadamente 2 meses de vida e eram generalizadas em três pacientes, enquanto confinadas às mãos e pés (forma acral) em apenas um indivíduo; havia perda parcial de unhas, mas nenhum paciente apresentou pseudosindactilia.

### Epidermólise bolhosa simples – KRT5/KRT14/PLEC

Apesar de ser o tipo mais comum de EB, a EBS representou a minoria dos pacientes (15 pacientes, 12 famílias). Dos sete diferentes genes associados a essa forma da doença, foram identificadas mutações apenas nos genes *KRT5*, *KRT14* e *PLEC*. Considerando que o diagnóstico específico de EBS foi indicado em apenas oito dos 12 pacientes submetidos ao imunomapeamento nesse grupo (três indivíduos não foram investigadas por essa técnica, pois eram familiares do caso índice), a concordância com o WES foi de quase 67% para esse tipo de EB.

Dos seis pacientes com variantes do gene *KRT5*, todos apresentaram bolhas nos primeiros 10 dias de vida, principalmente nas extremidades, acompanhadas de dor crônica, prurido e sudorese; todos apresentavam algum grau de perda ungueal nos dedos das mãos ou dos pés, e um deles também apresentava dentes frágeis, mas nenhum deles apresentava estenose esofágica. Havia quatro famílias com a forma autossômica dominante da doença, enquanto outras duas manifestaram padrão autossômico recessivo. Ainda assim, não houve diferença clínica significativa entre os dois padrões de herança.

Em relação aos seis pacientes com variantes no gene *KRT14*, todos também apresentaram bolhas nos primeiros dias de vida e metade manifestou sudorese e anemia na primeira infância, mas curiosamente nenhum se queixou de

prurido; nenhum paciente apresentou pseudosindactilia ou milia. Todos manifestaram padrão autossômico dominante, mas três eram da mesma família (pai e dois filhos de mães diferentes).

Por fim, havia três pacientes com variantes do gene *PLEC*, todos manifestando bolhas nas primeiras horas de vida. As lesões ocorreram principalmente nas extremidades, com presença de milia de pequeno grau, mas os pacientes evoluíram com peso e estatura normais; dois deles foram submetidos à dilatação esofágica por estenose e um apresentou pseudosindactilia nos pés. Todas essas famílias manifestaram a forma autossômica recessiva da doença; duas dessas famílias apresentavam mutações em homozigose, enquanto a restante apresentava variantes em heterozigose composta.

### Epidermólise bolhosa juncional – COL17A1

O único caso de EBJ foi uma menina com variantes homozigotas no gene *COL17A1*, filha de pais consanguíneos; como o imunomapeamento desse caso isolado também indicou EBJ, a correspondência de ambas as técnicas para essa forma da doença foi de 100% para esse tipo de EB. O fenótipo da paciente poderia ser caracterizado como moderado; ela apresentou bolhas desde o terceiro dia de vida e também referia dores crônicas e prurido constante. Aos 16 anos, a paciente apresentava dificuldade para caminhar, acompanhada de anemia leve e desnutrição. O exame dermatológico revelou bolhas localizadas principalmente em áreas com dobras (braços, joelhos, pés), sem milia, e os cabelos eram finos e frágeis; notavelmente, as unhas dos dedos dos pés estavam ausentes.

### Achados genéticos

Foram estudados 67 pacientes de 60 famílias com diferentes tipos de EB, todos atendidos no hospital da instituição.

Nesse cenário, havia 47 pacientes (43 famílias) com EB recessiva, quatro pacientes com EB dominante, 15 pacientes (12 famílias) com EBS e uma paciente com EBJ. Das 60 variantes diferentes em genes relacionados à EB observadas nos pacientes, 15 nunca foram publicadas na literatura, que seja de conhecimento dos autores: dez associadas à EBD recessiva, três à EBD dominante e duas à EBS. A maioria delas era de mutações nulas (variantes *nonsense*, *frameshift* ou site de *splice* canônico), com apenas três variantes *missense*. Os detalhes estão descritos nos materiais suplementares.

### Imunomapeamento

O imunomapeamento estava disponível em 59 desses pacientes; oito do total de 67 pacientes não puderam prosseguir para investigação com biópsia de pele. Houve concordância entre os resultados do imunomapeamento e do exoma em 37 (62%) desses casos, enquanto em 13 (22%) foi provado que o imunomapeamento estava errado pela análise molecular. Além disso, houve nove pacientes (15%) nos quais os resultados do imunomapeamento foram inconclusivos, como mostrado nas tabelas 1 e 2. Portanto, de um total de 22 paci-

**Tabela 1** Comparação geral da confirmação diagnóstica por sequenciamento completo do exoma e imunomapeamento em pacientes com epidermólise bolhosa

Sequenciamento completo do exoma	Imunomapeamento
59/59 pacientes confirmados (100%)	37/59 pacientes confirmados (62,7%)

entes, o imunomapeamento estabeleceu diagnóstico errado ou nenhum diagnóstico em 37%.

Por fim, foi realizada a análise de concordância quantificada em relação ao imunomapeamento dos 50 pacientes que receberam resultados positivos (38) ou negativos (12), quando comparados com os resultados do WES. Embora o teste Kappa tenda a subestimar o nível de concordância em relação a doenças raras, nesse caso ele foi igual a  $-0,261$  (intervalo de confiança de 95% de  $-0,388$  a  $-0,135$ ), indicando não haver concordância entre esses dois exames.

### Discussão

Houve claro predomínio de EBD (associada à mutação no gene *COL7A1*), com 51 dos 67 pacientes (76%) apresentando esse tipo de doença, que geralmente representa fenótipo mais grave, principalmente na forma autossômica recessiva. Considerando que os pacientes deste estudo frequentavam o grupo de Dor e Cuidados Paliativos, já era esperada elevada frequência de gravidade; ainda assim, a contagem total de mortes em pacientes com menos de 20 anos se destaca das taxas de mortalidade brasileiras e globais relatadas, talvez indicando a falta de apoio adequado e intenso ao cuidado desses pacientes em alguns hospitais locais. Fora isso, os fenótipos foram semelhantes aos descritos na literatura para cada respectivo gene.

Em relação à história familiar, é importante ressaltar que ela mostrou certo viés, visto que 11 das 60 famílias apresentavam algum nível de consanguinidade; particularmente, oito desses casos apresentavam mutações em homozigose no gene *COL7A1*. Ainda assim, as formas autossômicas recessivas da doença eram a maioria mesmo nas famílias sem consanguinidade, com 41 famílias apresentando variantes em heterozigose composta (o que significa que o paciente recebeu variante deletéria diferente no mesmo gene de cada progenitor saudável). Como esperado para as formas autossômicas dominantes, houve maioria de seis casos de mutações *de novo* em heterozigose, não herdadas de nenhum dos pais; a transmissão vertical foi observada em apenas duas famílias, o que significa que a criança e seu pai ou mãe eram ambos afetados.

A análise com microscopia eletrônica era o antigo método de referência para o diagnóstico de EB, mas seus altos custos e a dificuldade de acesso (poucos centros dispõem desse equipamento e talvez ainda menos pessoas tenham experiência em utilizá-lo) determinaram gradativamente seu declínio.

Como mencionado anteriormente, até recentemente o método de referência para o diagnóstico era o imunomapeamento em biópsia de pele. Embora geralmente ele consiga identificar o nível cutâneo onde ocorreu a clivagem com

**Tabela 2** Comparação detalhada entre resultados de sequenciamento completo do exoma e imunomapeamento em pacientes com epidermólise bolhosa

Família	Paciente	Etiologia genética (WES)	Imunomapeamento	Correspondência
1	1	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
	2	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Inconclusivo	ND
	3	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Inconclusivo	ND
2	4	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
	5	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Não realizado	ND
3	6	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	+
	7	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
4	8	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
5	9	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
6	10	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
7	11	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
8	12	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
9	13	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
10	14	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
11	15	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
12	16	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
13	17	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
14	18	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
15	19	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
16	20	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
17	21	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
18	22	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
19	23	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
20	24	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
21	25	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
22	26	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
23	27	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
24	28	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
25	29	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AR	+
26	30	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
27	31	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
28	32	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
29	33	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
30	34	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
31	35	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
32	36	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
33	37	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBJ	—
34	38	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	—
35	39	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Inconclusivo	ND
36	40	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Inconclusivo	ND
37	41	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Inconclusivo	ND
38	42	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Inconclusivo	ND
39	43	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Não realizado	ND
40	44	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	EBD (sem especificação)	+
41	45	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Não realizado	ND
42	46	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Não realizado	ND
43	47	EBD AR ( <i>COL7A1</i> )	Não realizado	ND
44	48	EBD AD ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	+
45	49	EBD AD ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	+
46	50	EBD AD ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	+
47	51	EBD AD ( <i>COL7A1</i> )	EBD AD	+
48	52	EBS AD ( <i>KRT5</i> )	EBS	+
	53	EBS AD ( <i>KRT5</i> )	Não realizado	ND
49	54	EBS AR ( <i>KRT5</i> )	EBS	+
50	55	EBS AR ( <i>KRT5</i> )	EBS	+
51	56	EBS AD ( <i>KRT5</i> )	EBS	+

Tabela 2 (Continuação)

Família	Paciente	Etiologia genética (WES)	Imunomapeamento	Correspondência
52	57	EBS AD ( <i>KRT5</i> )	Inconclusivo	ND
53	58	EBS AD ( <i>KRT14</i> )	EBS	+
	59	EBS AD ( <i>KRT14</i> )	Não realizado	ND
54	60	EBS AD ( <i>KRT14</i> )	Não realizado	ND
	61	EBS AD ( <i>KRT14</i> )	EBS	+
55	62	EBS AD ( <i>KRT14</i> )	EBS	+
56	63	EBS AD ( <i>KRT14</i> )	EBD AD	—
57	64	EB AR ( <i>PLEC</i> )	EBS	+
58	65	EBS AD ( <i>PLEC</i> )	Inconclusivo	ND
59	66	EBS AR ( <i>PLEC</i> )	Inconclusivo	ND
60	67	EBJ ( <i>COL17A1</i> )	EBJ	+

AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva; EBD, epidermólise bolhosa distrófica; EBJ, epidermólise bolhosa juncional; EBS, epidermólise bolhosa simples; ND, não disponível; WES, sequenciamento completo do exoma.

formação da bolha (intradérmica ou subepidérmica), não consegue indicar com certeza o gene afetado e, portanto, o padrão de herança de cada paciente. Além disso, é procedimento invasivo (com necessidade de anestesia local e posterior sutura) e os resultados não raramente são inconclusivos, sendo muitas vezes necessária uma segunda biópsia cutânea, o que pode ser particularmente problemático em pacientes com EB.

Atualmente, a análise molecular tornou-se ferramenta importante para diagnóstico mais preciso da EB. Não é novidade que seu uso tem sido fortemente recomendado não só por sua precisão e potencial menor custo, mas também porque evita danos à pele de pacientes tão vulneráveis, já que funciona bem com apenas uma gota de sangue ou até mesmo com pequena quantidade de saliva do paciente.

Contudo, é importante apontar algumas desvantagens em relação ao diagnóstico genético da EB. Em primeiro lugar, métodos mais generalizados e recursos insuficientes destinados a testes moleculares, particularmente em regiões distantes. Além disso, há pelo menos 18 genes associados aos diversos tipos de EB, com mais de 1.000 mutações diferentes descritas; a abordagem anterior com sequenciamento de Sanger de um gene ou mesmo mutações específicas conhecidas pode não garantir a confirmação da etiologia, muitas vezes representando um caminho longo e mais caro para o diagnóstico.

Felizmente, os avanços da técnica de NGS agora podem fornecer análises simultâneas de um ou de centenas de genes, não apenas com o mesmo custo, mas também de maneira muito mais rápida e automática. Além disso, existe a possibilidade de coleta de amostras de sangue em centros de atenção primária à saúde ou mesmo a utilização de kits que utilizam saliva que pode ser coletada em casa, e esses materiais podem ser simplesmente enviados por correio para unidades de referência, representando óbvia expansão do leque de testes.

Aqui é importante ressaltar que o WES analisa não apenas genes relacionados à EB, mas na verdade todos os genes humanos. É claro que isso representa custo mais elevado para o teste quando comparado com um painel, mas ainda assim, na experiência dos autores, pode muitas vezes ser mais difícil para os laboratórios estabelecerem um painel de NGS direcionado menos dispendioso para uma única

condição, em vez de oferecer WES para vários pacientes com várias hipóteses genéticas (desde deficiência intelectual até baixa estatura). Considerando tudo isso, embora o presente estudo tenha utilizado o WES para análise genética, acredita-se que esses resultados possam ser aplicados a todas as técnicas de NGS, uma vez que mutações germinativas em genes relacionados à EB seriam detectadas pelo WES ou por um painel de NGS direcionado.

Apesar de inicialmente ser considerado mais caro que o imunomapeamento, é importante ressaltar que os custos do NGS vêm caindo constantemente nos últimos anos. Aliás, o potencial custo-efetividade do painel de NGS direcionado a genes relacionados à EB para diagnóstico em um país de dimensões continentais como o Brasil já foi sugerido por outro estudo recente.<sup>7</sup>

Por fim, a aplicação potencial da terapia genética a uma doença rara e, até agora, incurável, como a EB, não pode ser prejudicada. Apesar dos inúmeros desafios nesse caminho, mais de uma pesquisa mostrou resultados promissores na utilização dessas novas abordagens terapêuticas<sup>9-11</sup> em pacientes com diferentes tipos de EB. Como o conhecimento do genótipo é absolutamente necessário para esses casos selecionados, mais uma vez destaca-se que o imunomapeamento por si só não forneceria informações suficientes para decidir se um determinado paciente é elegível ou não para um tratamento específico. Por último, considerando a crescente disponibilidade e procura de fertilização *in vitro*,<sup>12</sup> o diagnóstico genético da EB também se torna ainda mais necessário.

## Conclusão

A EB contempla um grupo de dermatoses genéticas caracterizadas por fragilidade grave e bolhas recorrentes. Por ser doença congênita rara causada por mutações em múltiplos genes, o diagnóstico adequado pode ser um desafio por uma série de razões.

Embora o imunomapeamento tenha sido útil em serviços onde não há estudos moleculares disponíveis, a análise genética realizada por NGS mostrou maior taxa de diagnóstico. Além disso, todos os resultados positivos levarão à confirmação do padrão de herança de cada família, que muitas vezes o imunomapeamento não consegue prever. Além

disso, em um futuro não tão distante, será necessário o conhecimento do genótipo para decidir se determinado paciente é elegível ou não para formas específicas de terapia gênica e também para técnicas de reprodução assistida.

Por fim, conclui-se que o estudo molecular (seja com painel de NGS direcionado ou WES) é custo-efetivo para o diagnóstico de EB, não apenas por sua alta eficiência e precisão, mas também por dispensar a necessidade de biópsia de pele. Assim, considera-se que proporcionará aos pacientes melhor avaliação do prognóstico geral, diagnóstico genético pré-natal e aconselhamento genético.

## Suporte financeiro

Kim CA CNPQ 304897 / 2020-5; FAPESP 2019 / 21644-0.

Matsumoto N – recebeu suporte da Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) [números de concessão JP22ek0109486, JP22ek0109549, JP22ek0109493]; e Takeda Science Foundation.

## Contribuição dos autores

Samantha Vernaschi Kelmann: Contribuiu amplamente na concepção e planejamento do artigo, bem como na avaliação dermatológica e interpretação dos dados.

Bruno de Oliveira Stephan: Contribuiu amplamente na concepção e planejamento do artigo, bem como na análise genética e interpretação dos dados.

Silvia Maria de Macedo Barbosa: Contribuiu no seguimento clínico e manejo dos pacientes.

Rita Tiziana Verardo Polastrini: Contribuiu no seguimento clínico e manejo dos pacientes.

Zilda Najjar Prado de Oliveira: Contribuiu na execução e interpretação do imunomapeamento.

Maria Cecília Rivitti-Machado: Contribuiu na execução e interpretação do imunomapeamento.

Gustavo Marquezani Spolador: Contribuiu no aconselhamento e manejo genético dos pacientes.

Rachel Sayuri Honjo: Contribuiu na redação e revisão crítica do manuscrito.

Ken Saida: Contribuiu para a execução e interpretação dos testes moleculares.

Naomichi Matsumoto: Contribuiu na execução e interpretação dos testes moleculares.

Chong Ae Kim: Contribuiu para a redação e revisão crítica do manuscrito.

## Conflito de interesses

Nenhum.

## Apêndice. Material suplementar

Pode consultar o material adicional para este artigo na sua versão eletrônica disponível em [doi:10.1016/j.abdp.2024.02.005](https://doi.org/10.1016/j.abdp.2024.02.005).

## Referências

- Bardhan A, Bruckner-Tuderman L, Chapple ILC, Fine JD, Harper N, Has C, et al. Epidermolysis bullosa. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6:78.
- Has C, Bauer JW, Bodemer C, Bolling MC, Bruckner-Tuderman L, Diem A, et al. Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility. *Br J Dermatol*. 2020;183:614–27.
- Delgado-Miguel C, Miguel-Ferrero M, Lucas-Laguna R. Misdiagnosis in epidermolysis bullosa: yet another burden on patients and their families. *Actas Dermosifiliogr*. 2023. S0001-7310:00626-9.
- Mariath LM, Santin JT, Frantz JA, Doriqui MJR, Kiszewski AE, Schuler-Faccini L. An overview of the genetic basis of epidermolysis bullosa in Brazil: discovery of novel and recurrent disease-causing variants. *Clin Genet*. 2019;96:189–98.
- Mariath LM, Santin JT, Frantz JA, Doriqui MJR, Schuler-Faccini L, Kiszewski AE. Genotype-phenotype correlations on epidermolysis bullosa with congenital absence of skin: a comprehensive review. *Clin Genet*. 2021;99:29–41.
- Mariath LM, Santin JT, Schuler-Faccini L, Kiszewski AE. Hereditary epidermolysis bullosa: update on the clinical and genetic aspects. *An Bras Dermatol*. 2020;95:551–69.
- Mariath LM, Kiszewski AE, Frantz JA, Siebert M, Matte U, Schuler-Faccini L. Gene panel for the diagnosis of epidermolysis bullosa: proposal for a viable and efficient approach. *An Bras Dermatol*. 2021;96:155–62.
- Yao Y, Yang K, Qi KY, Zeng LX, Zhang GQ. Diverse clinical and genetic characteristics of six cases of inherited epidermolysis bullosa. *Exp Ther Med*. 2022;24:727.
- Subramaniam KS, Antoniou MN, McGrath JA, Lwin SM. The potential of gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*. 2022;186:609–19.
- Ryumina II, Goryunov KV, Silachev DN, Shevtsova YA, Babenko VA, Marycheva NM, et al. Pathogenetic therapy of epidermolysis bullosa: current state and prospects. *Bull Exp Biol Med*. 2021;171:109–21.
- Hou PC, Wang HT, Abhee S, Tu WT, McGrath JA, Hsu CK. Investigational treatments for epidermolysis bullosa. *Am J Clin Dermatol*. 2021;22:801–17.
- Christofolini DM, Ceroni JRM, Soares GG, Lamy GB, Calvo ACN, Santos TA, et al. Opções reprodutivas para pacientes com epidermólise bolhosa distrófica. *Einstein (São Paulo)*. 2019;17:eRC4577.