

EPIDERMÓLISE BOLHOSA DISTRÓFICA: RELATO DE UM CASO BRASILEIRO

Dystrophic epidermolysis bullosa: report of a brazilian case

Isabelle Rego Barros¹

Salmo Raskin¹

Lilian Pereira-Ferrari¹

Resumo

Epidermólise Bolhosa representa um grupo heterogêneo de patologias genéticas que causam bolhas e cortes em resposta ao mínimo trauma mecânico na pele. As várias formas de Epidermólise Bolhosa podem ser agrupadas em três tipos principais; Epidermólise Bolhosa Simplex, Epidermólise Bolhosa Distrófica (forma dominante ou recessiva) e Epidermólise Bolhosa Juncional. Esta condição pode variar de relativamente leve, a uma doença incapacitante e, às vezes, fatal. Epidermólise Bolhosa Distrófica é a forma mais grave deste grupo de doenças, apresentando uma frequência estimada de 1: 35.000 nascidos vivos na população mundial. Epidermólise Bolhosa Distrófica é uma doença genética herdada causada por mutações que afetam a função correta do gene do colágeno tipo VII (COL7A1). Este gene codifica para uma proteína que dá forma às microestruturas responsáveis por manter as camadas da pele unidas. Alterações neste gene resultam na adesão defeituosa e na formação das bolhas. Pesquisas no gene COL7A1 concluíram que cada paciente tem sua própria mutação genética, freqüentemente tendo como resultado um fenótipo clínico variável. Neste trabalho, nós descrevemos o diagnóstico clínico e os achados moleculares de uma paciente brasileira.

Palavras-chave: COL7A1; Doença de bolhas da pele; Epidermólise bolhosa distrófica.

Abstract

Epidermolysis Bullosa is a group of genetic disorders causing blistering and shearing of the skin from even the gentlest friction, often from everyday activities. The various forms of Epidermolysis Bullosa can be grouped into three main types: Simplex Epidermolysis Bullosa, Dystrophic Epidermolysis Bullosa (dominant or recessive form) and Junctional Epidermolysis Bullosa. This condition can vary from a relatively mild to an incapacitating, and sometimes fatal, disorder. Dystrophic Epidermolysis Bullosa is the severe form of Epidermolysis Bullosa affecting 1 in 35,000 live births over the world's population. Dystrophic Epidermolysis Bullosa is an inherited genetic disorder caused by mutations affecting the correct function of the collagen type VII gene (COL7A1). This gene encodes for a protein forming microstructures, responsible for keeping the layers of the skin together. Defects in the gene, result in defective adhesion and in the formation of blisters. Research into COL7A1 has concluded that patients have their own genetic mutation, often resulting in variable clinical phenotype. In this paper we describe the clinical diagnosis and the molecular findings of a Brazilian patient.

Keywords: COL7A1; Skin-blistering disorder; Dystrophic epidermolysis bullosa.

¹ Curso de especialização em Genética Humana – PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.
Endereço para correspondência:
Salmo Raskin, MD, Alameda Augusto Stelfeld, 1516, Curitiba, Paraná, Brasil, 80730-150, Fone: 55-41-3232-6838, Fax: 55-41-3232-5206, E-mail: genetika@genetika.com.br.

Introdução

Epidermólise Bolhosa (EB) representa um grupo heterogêneo de patologias mecano-bulosas, com severidade clínica altamente variável, podendo apresentar herança autossômica recessiva ou autossômica dominante (FINE et al., 1991; CHRISTIANO et al., 1996). A EB é dividida tradicionalmente em três grandes categorias baseadas no nível de separação do tecido dentro da zona da membrana basal (BMZ) (UITTO; CHRISTIANO, 1992). Na forma simples (EBS), a separação do tecido ocorre dentro dos queratinócitos basais no lado epidérmico da membrana basal; na forma juncional (EBJ), a formação da bolha ocorre dentro da membrana lúcida do lado dérmico-epidérmico basal próprio da lamina; e na forma distrófica grave (EBD), a segmentação do tecido ocorre no lado dérmico da BMZ cutânea (PULKKINEN; UITTO, 1999).

O progresso na definição da base molecular de diversas formas da EB é ilustrado melhor pelas variantes distróficas de EB (EBD), um subgrupo da doença que possui padrão de herança autossômico recessivo ou autossômico dominante (UITTO; CHRISTIANO, 1994).

A epidermólise bolhosa distrófica é causada por mutações no gene do colágeno tipo VII humano (COL7A1). A organização de íntron/exon de COL7A1 demonstra ter 118 éxons, maior número de éxons do que qualquer gene previamente descrito. O COL7A1 tem 31.132 pb, do local do início da transcrição ao local da poliadenilação, é aproximadamente três vezes o tamanho do mRNA do colágeno tipo VII. Os íntrons do COL7A1 são pequenos, sendo que o menor destes tem somente 71 nucleotídeos, é o menor íntron já relatado em um gene do colágeno, e somente um íntron do COL7A1 tem mais de 1 kb de comprimento. Todos os éxons na região codificante da tripla hélice do COL7A1 que não começam com as seqüências que correspondem às imperfeições da tripla hélice, começam com códons de resíduos de Gli da repetição Gli-X-Y. Isto é remanescente da estrutura fibrilar dos genes do colágeno. Além disso, a região codificante da tripla hélice do COL7A1 contém muitos éxons de tamanhos recorrentes (por exemplo, 25 éxons possuem 36 bp, 12 éxons possuem 45 bp, 8 éxons possuem 63 bp), sugerindo uma origem evolutiva distinta dos genes não-fibrilares do colágeno. Seqüências da porção 5' do

COL7A1 são apresentadas junto com uma seqüência intergênica, de 3766 pb, que separa COL7A1 do gene subsequente, o qual codifica a proteína I do complexo do citocromo bc1. A região do promotor COL7A1 apresenta ausência de homologia com regiões promotoras de outros genes expressados na pele (CHRISTIANO et al., 1994a).

A posição genômica do gene do colágeno tipo VII (COL7A1) foi determinada por hibridação cromossômica *in situ* com o DNA K-131. Os resultados mapearam o gene COL7A1 no locus 3p21 (PARENTE et al., 1991). O colágeno de tipo VII foi identificado como o componente de proteína de ancoramento de fibrilas em 1986 (BURGESON, 1993). Mutações neste gene foram relatadas primeiramente em 1993 (Christiano, 1993; Hilal, 1993), sendo que em 1999, 172 mutações tinham sido relatadas (WHITTOCK et al., 1999).

O colágeno de tipo VII é o principal componente colágeno de ancoramento das fibrilas, estruturas acessórias que estabilizam a associação da membrana basal cutânea à derme subjacente. Ele é expresso tanto por queratinócitos epidérmico quanto por fibroblastos dérmicos (GRAS et al., 2001).

Ambas as formas, autossômicas dominantes e recessivas de EBD são causadas por mutações no gene COL7A1 (HOREV et al., 2003; WOODLEY et al., 2003).

O local e a natureza das mutações determinam o fenótipo clínico que varia extensamente de uma doença relativamente leve, herdado tipicamente por herança autossômica dominante, a uma condição grave de mutilação herdada por herança autossômica recessiva (HOREV et al., 2003).

As BMZ dos pacientes com EBD são caracterizadas pela falta ou pela diminuição do ancoramento das fibrilas (BRIGGAMAN; WHEELER, 1975). Anormalidades neste ancoramento de fibrilas têm sido observado ao microscópio de eletrônico de transmissão, as quais podem morfológicamente ser alteradas, reduzidas em número ou inteiramente ausente nos pacientes afetados com EBD (TIDMAN; EADY, 1985; MACGRATH et al., 1993).

Apesar de existirem duas formas de epidermólise bolhosa, uma dominante e uma recessiva, ambas ocorrem devido a mutações no mesmo gene e é provável que as mutações com expressões heterozigóticas produzam uma mudan-

ça no produto do gene que causa o suicídio da proteína. Por outro lado, as mutações recessivas podem causar uma mudança no produto do gene de tal natureza que todo o produto do gene deve ser do tipo mutante para que o fenótipo seja expresso (OMIM * 120120).

O quadro clínico da EBD dominante varia de um fenótipo mais leve, expresso por bolhas localizadas em pontos de trauma até o mais grave, em que ocorrem bolhas generalizadas e subsequentemente cicatrização (DAS; SAHOO, 2004). Na EBD dominante, todas as mutações relatadas até agora resultam em substituição de glicina na região tripla-helicoidal (CHRISTIANO et al., 1996).

A maioria dos pacientes com EBD recessiva é heterozigota composta, portadora de duas mutações diferentes no gene COL7A1, como mostrado por análises de mutação Uitto et al. (1994) e estudos haplotípicos (WINBERG et al., 1997). Em mutilações severas da EBD, ambas as mutações resultam freqüentemente em PTC, níveis baixos de mRNA e falta da proteína do colágeno VII na pele (CHRISTIANO et al., 1994b).

Além da pele e do sistema musculoesquelético, uma variedade de outros órgãos pode estar afetada nos pacientes com o EBD, especialmente aqueles com forma recessiva da EBD. Além de bolhas, outras doenças de pele, como neoplasma cutâneo, eczema, dermatite atópica e alergias são observadas em pacientes com EBD. Os órgãos mais comumente afetados em pacientes com EBD são os dentes, o trato gastrointestinal, o trato respiratório superior, o trato geniturinário, os olhos e o sistema cardiovascular (DAS; SAHOO, 2004).

A Epidermólise Bolhosa Recessiva tipo Hallopeau-Siemens (HS-REBD) ocorre geralmente devido à presença de mutações que conduzem a um PTC em ambos os alelos, o que resulta na ausência de COLVII e ancoramento de fibrilas na junção dérmica/epidérmica da pele do paciente. As formas mais leves da Epidermólise Bolhosa Recessiva conhecida como sendo tipo não-Hallopeau-Siemens (nHS-REBD) derivam de combinações de tipos diferentes de mutações (PTC, *missense*, *splicing*) conduzindo à expressão alterada, mas parcialmente funcional, das moléculas de COLVII e ancoramento de fibrilas. As manifestações variáveis da doença dependem completamente da segunda mutação (GARDELLA et al., 2002).

Neste artigo, nós apresentamos o caso de uma paciente brasileira com características clíni-

cas sugestivas de EBD e confirmação diagnóstica por meio de rastreamento de mutações no gene.

Relato de Caso

A paciente brasileira T.V., do sexo feminino, oito anos de idade, foi encaminhada ao Hospital de Clínicas com 21 dias de idade, apresentando história de bolhas nos membros e de ausência de pele no terço inferior da perna e no pé. Não há nenhuma história similar da doença em sua família. Foram observadas bolhas de tamanhos diferentes nos braços, nos pés e no tronco. T.V. apresentou também áreas brilhantes vermelhas no terço inferior da perna e do pé e redução do diâmetro da perna com atrofia dos dedos.

Com sete meses, além das bolhas, apresentou distrofia da 1.^a e 2.^a unhas das mãos. Após tratamento apropriado, o ferimento no terço inferior da perna esquerda apresentou acentuada melhora com aumento do diâmetro da perna e maior mobilidade dos dedos.

Na evolução, apresentou algumas infecções secundárias, dificuldade de deglutição, sendo encaminhada para orientação gastroenterológica e mais tarde para a correção das aderências e da posição viciosa do dedo. Neste momento, foi diagnosticada com EBD.

Sua primeira consulta com um geneticista foi aos seis anos de idade, quando foi diagnosticada com EBD recessivo, uma vez que ambos os pais são normais e não há nenhum outro membro afetado da família. Foram realizadas análises moleculares, na região COL7A1 do gene, e a mutação Q2417X (Whitlock et al., 1999) foi encontrada no gene do colágeno VII, confirmando o diagnóstico. A segunda mutação não foi encontrada até a presente data. A análise molecular foi realizada no Departamento de Dermatologia e Biologia Cutânea da Universidade de Thomas Jefferson, usando a seguinte metodologia: PCR para amplificar todos os 118 éxons do COL7A1 e análise dos heteroduplexes por dHPLC (*denaturing high-performance liquid chromatography*, cromatografia líquida desnaturante de alta *performance*) para identificar anormalidades. Além disso, foi realizado seqüenciamento para confirmar mutações.

Discussão

A Epidermólise Bolhosa (EB) é um grupo heterogêneo de doenças bolhosas hereditárias que podem potencialmente apresentar risco de morte a recém-nascidos e crianças. O diagnóstico exato em recém-nascidos pode ser difícil e depende de uma combinação de técnicas clínicas, histológicas e moleculares (DAS; SAHOO, 2004).

A investigação molecular cuidadosa de EBD recessiva tem implicações importantes para o aconselhamento genético e para o desenvolvimento de correção genética. Estes resultados permitem o diagnóstico pré-natal em famílias de risco (aquelas que têm ao menos uma criança afetada). O teste baseado na busca de mutações no DNA fetal pode ser executado a partir da 10ª semana de gestação. A identificação precisa das mutações permite também a definição da terapia gênica específica para a alteração em questão. O conhecimento da consequência das mutações a nível protéico (detectável contra a proteína não detectável) também é importante para definir a metodologia de terapia gênica a ser utilizada, a fim de restaurar a expressão normal introduzindo uma cópia do gene normal do colágeno VII em células epidérmicas (HOVNANIAN, 2001).

A ausência de outros membros da família afetados não estabelece, por si só, o modo de transmissão como autossômico recessivo, porque a identificação de pessoas afetadas aparentemente isoladas pode também ser o resultado de uma mutação espontânea ou de penetrância incompleta de uma característica autossômica dominante (DAS; SAHOO, 2004).

Embora somente um número limitado de mutações seja conhecido, é grande a heterogeneidade molecular do EBD, sendo que a combinação de duas mutações diferentes leva a diferentes consequências nos polímeros do colágeno VII, os quais são relacionadas às grandes variedades de fenótipos biológicas e clínicas. Neste contexto, determinadas situações mais simples podem ser preditas: as mutações que conduzem a duas terminações prematuras do códon (PTC) da tradução causam um fenótipo severo de mutilação; um PTC em combinação com uma outra mutação pode causar um fenótipo grave ou leve de EBD, dependendo da segunda mutação (WINBERG et al., 1997).

Como ainda não foi detectada a segunda mutação no gene do colágeno tipo VII, não podemos afirmar que o fenótipo de T.V. é apresentado somente por causa do produto da mutação de Q2417X.

Este trabalho ressalta a importância da caracterização molecular completa (triagem das mutações), tanto para melhor definir a correlação genótipo/fenótipo, como para possibilitar um aconselhamento genético e um prognóstico mais acurado.

Referências

BRIGGAMAN, R.A.; WHEELER, C.E. Jr. The epidermal-dermal junction. **J Invest Dermatol**, 65(1):71-84, 1975.

BURGESSON, R.E. :Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. **J Invest Dermatol**, 101(3):252-5, 1993.

CHRISTIANO, A.M.; ANHALT, G.; GIBBONS, S.; BAUER, E.A.J. Premature termination codons in type VII collagen gene (COL7A1) underlie severe, mutilating recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Genomics**, 21, 160-168, 1994b.

CHRISTIANO, A.M.; ANTON-LAMPRECHT, I.; AMANO, S.; EBSCHNER, U.; BURGESSON, R.E.; UITTO, J. Compound heterozygosity for COL7A1 mutations in twins with dystrophic epidermolysis bullosa: a recessive paternal deletion / insertion mutation and a dominant negative maternal glycine substitution result in a severe phenotype. **Am J Hum Genet**, 56, 682-693, 1996a.

CHRISTIANO, A.M.; GREENSPAN, D.S.; HOFFMAN, G.G.; ZHANG, X.; TAMAI, Y.; LIN, A.N.; DIETZ, H.C.; HOVNANIAN, A.; UITTO, J. A missense mutation in type VII collagen in two affected siblings with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Nat Genet**, 4(1):62-6, 1993.

CHRISTIANO, A.M.; HOFFMAN, G.G.; CHUNG-HONET, L.C.; LEE, S.; CHENG, W.; UITTO, J.; GREENSPAN, D.S. Structural organization of the human type VII collagen gene (COL7A1), composed of more exons than any previously characterized gene. **Genomics**, 21(1):169-79, 1994a.

- CHRISTIANO, A.M.; MCGRATH, J.A.; TAN, K.C.; UITTO, J. Glycine substitutions in the triple-helical region of type VII collagen result in a spectrum of dystrophic epidermolysis bullosa phenotypes and patterns of inheritance. **Am J Hum Genet**, 58(4):671-81, 1996b.
- DAS, B.; SAHOO, S. Dystrophic Epidermolysis Bullosa. **Journal of Perinatology**, 24(1), 41-47, 2004.
- FINE, J.D.; BAUER, E.A.; BRIGGAMAN, R.A.; CARTER, D.M.; EADY, R.A.; ESTERLY, N.B.; HOLBROOK, K.A.; HURWITZ, S.; JOHNSON, L.; LIN, A.; *et al.* Revised clinical and laboratory criteria for subtypes of inherited epidermolysis bullosa. A consensus report by the Subcommittee on Diagnosis and Classification of the National Epidermolysis Bullosa Registry. **J Am Acad Dermatol**, 24(1):119-35, 1991.
- GARDELLA, R.; ZOPPI, N.; ZAMBRUNO, G.; BARLATI, S.; COLOMBI, M. Different phenotypes in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients sharing the same mutation in compound heterozygosity with two novel mutations in the type VII collagen gene. **British Journal of Dermatology**, 147:450-457, 2002.
- GRAS, M.P.; VERRECCHIA, F.; UITTO, J.; MAUVIEL, A. Downregulation of human type VII collagen (COL7A1) promoter activity by dexamethasone. **Experimental Dermatology**, 10(1), 28-34, 2001.
- HILAL, L.; ROCHAT, A.; DUQUESNOY, P.; BLANCHET-BARDON, C.; WECHSLER, J.; MARTIN, N.; CHRISTIANO, A.M.; BARRANDON, Y.; UITTO, J.; GOOSSENS, M.; *et al.* A homozygous insertion-deletion in the type VII collagen gene (COL7A1) in Hallopeau-Siemens dystrophic epidermolysis bullosa. **Nat Genet**, 5(3):287-93, 1993.
- HOREV, L.; WARAN LALIN, T.; MARTINEZ-MIR, A.; BAGHERI, B.A.; TADIN-STRAPPS, M.; SCHNEIDERMAN, P.I.; GROSSMAN, M.E.; BICKERS, D.R.; CHRISTIANO, A.M. Identification of mutations in the COL7A1 gene in a proband with mild recessive dystrophic epidermolysis bullosa and aortic insufficiency. **Clin Exp Dermatol**, 28(1):80-4, 2003.
- HOVNANIAN, A. Improved molecular diagnosis of DEB and ex-vivo genetic complementation for RDEB using COL7A1 full length cDNA. 2001
- <http://www.debra-international.org/a_hovnan1a.htm>.
- MCGRATH, J.A.; ISHIDA-YAMAMOTO, A.; O'GRADY, A.; LEIGH, I.M.; EADY, R.A. Structural variations in anchoring fibrils in dystrophic epidermolysis bullosa: correlation with type VII collagen expression. **J Invest Dermatol**, 100(4):366-72, 1993.
- PARENTE, M.G.; CHUNG, L.C.; RYYNANEN, J.; WOODLEY, D.T.; WYNN, K.C.; BAUER, E.A.; MATTEI, M.G.; CHU, M.L.; UITTO, J. Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, 88(16):6931-5, 1991.
- PULKKINEN, L.; UITTO, J. Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. **Matrix Biol**, 18(1):29-42, 1999.
- TIDMAN, M.J.; EADY, R.A. Evaluation of anchoring fibrils and other components of the dermal-epidermal junction in dystrophic epidermolysis bullosa by a quantitative ultrastructural technique. **J Invest Dermatol**, 84(5):374-7, 1985.
- UITTO, J.; CHRISTIANO, A.M. Molecular basis for the dystrophic forms of epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen gene. **Arch Dermatol Res**, 287(1):16-22, 1994.
- UITTO, J.; CHRISTIANO, A.M. Molecular genetics of the cutaneous basement membrane zone. Perspectives on epidermolysis bullosa and other blistering skin diseases. **J Clin Invest**, 90(3):687-92, 1992.
- UITTO, J.; PULKKINEN, L.; CHRISTIANO, A.M. Molecular basis of the dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen and kalinin (laminin 5) genes. **J Invest Dermatol**, 103, 39S-46S, 1994.
- WHITTOCK, N.V.; ASHTON, G.H.; MOHAMMEDI, R.; MELLERIO, J.E.; MATHEW, C.G.; ABBS, S.J.; EADY, R.A.; MCGRATH, J.A. Comparative mutation detection screening of the type VII collagen gene (COL7A1) using the protein truncation test, fluorescent chemical cleavage of mismatch, and conformation sensitive gel electrophoresis. **J Invest Dermatol**, 113(4):673-86 entitled, 1999.

WINBERG, J.O.; HAMMAMI-HAUASLI, N.; NILSSEN, O.; ANTON-LAMPRECHT, I.; NAYLOR, S.L.; KERBACHER, K.; ZIMMERMANN, M.; KRAJCI, P.; GEDDE-DAHL, T.Jr; BRUCKNER-TUDERMAN, L. Modulation of disease severity of dystrophic epidermolysis bullosa by a splice site mutation in combination with a missense mutation in the COL7A1 gene. **Hum Mol Genet**, 6(7):1125-35, 1997.

WOODLEY, D.T.; KRUEGER, G.G.; JORGENSEN, C.M.; FAIRLEY, J.A.; ATHA, T.; HUANG, Y.; CHAN, L.; KEENE, D.R.; CHEN, M. Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. **J Invest Dermatol**, 121(5):1021-8, 2003.

Recebido em / *Received in*: 02.09.2004

Aceito em / *Accepted in*: 05.10.2004