

# EPIDERMOLYSIS BULLOSA, UMA SENTENÇA DE MORTE: TERAPIAS GENÉTICAS E CELULARES

## EPIDERMOLYSIS BULLOSA, A DEATH SENTENCE: GENE AND CELL THERAPY

### **Autores**

Bruna Luciano - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias - Instituto Politécnico de Castelo Branco, BSc

Francisco Rodrigues - Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) | Sport, Health & Exercise Unit (SHERU), Instituto Politécnico de Castelo Branco, PhD

Patrícia Coelho - Sport, Health & Exercise Unit (SHERU) | Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural) - Instituto Politécnico de Castelo Branco, PhD

### **Centro de execução do trabalho**

Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias  
Instituto Politécnico de Castelo Branco

### **Conflitos de interesse**

A equipa de investigação declara a não existência de conflitos de interesse na realização do estudo

### **Fontes de Financiamento**

Não existiu qualquer fonte de financiamento de contribuição para a realização do estudo

### **Contacto do autor responsável**

bruna.s.luciano@gmail.com

### **Tipo de artigo**

Artigo de Revisão

## Resumo

### Objetivo

Conhecer a fisiopatologia da doença, analisar as principais formas terapêuticas disponíveis bem como projetar o possível decurso da sua evolução.

### Materiais e Métodos

Foi elaborada uma abordagem aos vários tipos da doença e às terapias genéticas e celulares existentes de forma a poder compará-las e analisá-las adequadamente através de uma revisão da literatura.

### Resultados Principais

Como todo o tipo de terapias e drogas, as utilizadas na Epidermolysis Bullosa apresentam aspetos positivos e negativos que devem ser tidos em conta antes da sua utilização num paciente com EB. Assim, uma gestão das vantagens e desvantagens é crucial para o mantimento do bem-estar do paciente. Nenhuma das terapêuticas encontradas na revisão da literatura se apresentam com um potencial de cura.

### Conclusão

A sensibilização da população relativamente a esta patologia é essencial, assim como a promoção do interesse no desenvolvimento técnico e científico das terapias existentes e de novas terapias.

### Palavras-chave

Epidermolysis Bullosa (C16.131.831.493); Mutações (G05.365.590); Terapia genética (E02.095.301); Terapia celular (E02.095.147)

## Abstract

### Objective

To know the pathophysiology of the disease, to analyse the main available therapeutic forms as well as to project the possible course of its evolution.

### Materials and Methods

An approach to the various types of the disease and to existing genetic and cellular therapies was developed in order to be able to compare and analyze them properly through a literature review.

### Main results

Like all types of therapies and drugs, those used in Epidermolysis Bullosa have positive and negative aspects that must be considered before their use in patients. The management of the advantages and disadvantages of this therapies is crucial for maintaining the patient's well-being. None of the therapies found in the literature review have a healing potential.

### Conclusion

Sensitizing the population regarding this pathology is essential, as well as promoting interest in the technical and scientific development of existing therapies and new therapies.

### Keywords

Epidermolysis Bullosa (C16.131.831.493); Mutations (G05.365.590); Gene Therapy (E02.095.301); Cell Therapy (E02.095.147).

## Introdução

Epidermolysis Bullosa (EB) é uma doença genética com cerca de 500.000 casos em todo o mundo (Eva M. Murauer, 2015). É uma doença rara da pele, caracterizada pela existência de fragilidade crónica e aparecimento de bolhas na pele que são induzidas por traumas mínimos (Chan, et al., 2019) (DEBRA, 2019).

Esta patologia traz complicações médicas gravíssimas, reduzindo a qualidade e esperança de vida do paciente. A sua raridade conduz à falta de conhecimentos científicos e ao fraco número de investigações e desenvolvimento de novas terapias, sendo o objetivo deste estudo compilar todas as informações existentes no domínio das terapias, e da fisiopatologia da EB.

Esta doença é causada por mutação genética em genes com a informação necessária para a produção de proteínas produzidas pela pele na zona de junção entre a epiderme e a derme (Heather I. Cohn, 2016). Como resultado destas alterações, proteínas e outras moléculas, tais como filamentos intermediários, hemodesmosomas e fibras de ancoragem (Patrícia Peking, 2017) funcionam anormalmente ou estão ausentes, levando à diminuição da resistência da pele.

O presente trabalho pretende não só dar a conhecer esta patologia rara à comunidade científica, como fomentar a investigação da mesma e reunir um conjunto de informação pertinente de diversos autores, de modo a fazer uma revisão da literatura sobre a mesma. O artigo será composto por diversos capítulos, entre eles a metodologia usada, a revisão da literatura (que inclui as principais características, tipos e subtipos da doenças e as diversas formas terapêuticas e suas vantagens e desvantagens), e por fim a discussão/conclusão.

## Metodos

A revisão da literatura foi desenvolvida com consulta e seleção na base de artigos PubMed e Science Direct, de artigos científicos através de palavras-chave: Epidermolysis Bullosa; Epidermolysis Bullosa Gene Therapy; In vivo gene therapy; Epidermolysis Bullosa Cell Therapy; microneedle; Drug Delivery. Foram ainda consultados estudos académicos nomeadamente teses de mestrado, presentes em repositórios de institutos de ensino superior, e a página oficial da Associação Portuguesa de Epidermolysis Bullosa. Foram selecionados 29 artigos publicados entre os anos de 1987 e 2020, Tabela 1. Foi dada preferência a bibliografia publicada entre 2010 e 2020.

**Tabela 1** - Bibliografia consultada para execução da revisão bibliográfica. Elaboração própria.

TÍTULO ARTIGO/ NOME WEBSITE	AUTOR E ANO	SECÇÃO DO ARTIGO
Epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy	(C. Chiaverini, 2010)	Revisão da Literatura- EBJ
Occupational therapy for epidermolysis bullosa: clinical practice guideline	(Chan, et al., 2019)	Revisão da Literatura- EB
Epidermolysis bullosa: molecular pathology of connective tissue components in the cutaneous basement membrane zone	(Cristina Has, 2018)	Revisão da Literatura- EB
Debra- associação portuguesa de epidermólise bolhosa	(DEBRA, 2019)	Revisão da Literatura- EB; Terapia Celular.
Hydrodynamic gene delivery in human skin using a hollow microneedle device	(Dul, et al., 2017)	Terapia genética in vivo- microagulhas
The keio journal of medicine	(Eva M. Murauer, 2015)	Revisão da Literatura- EB; Terapia Genética ex vivo
Inherited epidermolysis bullosa	(Fine, 2010)	Revisão da Literatura- SK;
Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostics and new clinical phenotypes	(Fischer, 2018)	Revisão da Literatura- EB
Advancement in management of epidermolysis	(Heather I. Cohn, 2016)	Revisão da Literatura- EB
Gene therapy	(High & Roncarolo, 2019)	Terapia Genética; Terapia Genética in vivo;
Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow	(Jakub Tolar, 2008)	Terapia Celular- Transplante de medula óssea;
Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification	(Jo-David Fine, 2014)	Revisão da Literatura- EB
Genotype, clinical course, and therapeutic decision making in 76 infants with severe generalized junctional epidermolysis bullosa	(Johanna Hammersen, 2016)	Transplante de medula óssea;
Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa	(John E. Wagner, 2010)	Transplante de medula óssea;
Stem cell therapy for epidermolysis bullosa- does it work?	(Katsuto Tamai, 2010)	Transplante de medula óssea;
Mechanisms of fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysis bullosa: high stability of collagen vii favors long-term skin integrity	(Kern, et al., 2009)	Terapia Celular- Injeções de Fibroblastos;
First-in-human mutation-targeted siRNA phase ib trial of an inherited skin disorder	(Leachman, et al., 2009)	Terapia Genética in vivo- injeções intradérmicas.
Cultured allogeneic fibroblast injection vs. fibroblasts cultured on amniotic membrane scaffold for dystrophic epidermolysis bullosa treatment	(Moravvej, et al., 2017)	Revisão da Literatura- EBD Terapia Celular- Injeções de Fibroblastos;
Functional therapies for cutaneous wound repair in epidermolysis bullosa	(Patricia Peking, 2017)	Revisão da Literatura- EB, EBS, EBI, EBD, SK;
Terapia Genética in vivo- injeções intradérmicas; microagulhas; nano partículas e bombardeamento de partículas. Junctional epidermolysis bullosa	(Pfender & Lucky, 2018)	Revisão da Literatura- EBJ
Advanced technology for delivering therapeutic	(Prabu, Suriyaparakash, & Thirumurugan, 2017)	Nano Partículas e Bombardeamento de Partículas.
Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery	(Prow, et al., 2011)	Terapia Genética in vivo- Nano Partículas e Bombardeamento de Partículas.
Bp180 gene delivery in junctional epidermolysis bullosa	(Seitz, 1999)	Terapia Genética in vivo;
Uso de terapia celular com células-tronco nas especialidades médicas no brasil: revisão sistemática	(Silva Barbosa, Menezes, & Emanuelli, 2018)	Terapia Celular
Transdermal delivery of functional collagen via polyvinylpyrrolidone microneedles	(Sun, et al., 2015)	Terapia Genética in vivo- Microagulhas.
Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue	(Susana Ortiz-Urda, 2003)	Terapia Celular- Injeções de Fibroblastos;
Efficient gene reframing therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa with crisp/cas9	(Takashima, et al., 2019)	Terapia Genética ex vivo
Newer treatment modalities in epidermolysis bullosa	(Tuderman, 2020)	Transplante de medula óssea;
Microneedles: a smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system	(Waghule, et al., 2019)	Terapia Genética in vivo- Microagulhas.
Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication	(Y Barrandon, 1987)	Terapia Genética ex vivo

## Revisão da Literatura

### Fisiopatologia da EB

A classificação mais atual da EB foi desenvolvida em 2014, designando um total de 18 genes relacionados com os diferentes subtipos desta doença (Jo-David Fine, 2014), sendo eles: Epidermolysis Bullosa Simples (EBS), Epidermolysis Bullosa juncional (EBJ), Epidermolysis Bullosa distrófica (EBD) e o Síndrome de Kindler (SK). Esta classificação foi desenvolvida tendo em consideração o tipo de EB, o modo de hereditariedade, o mapeamento de antigénios através de técnicas de imunofluorescência e as mutações presentes em cada paciente (Jo-David Fine, 2014). Até à data, já foram identificados mais genes (Cristina Has, 2018) (Fischer, 2018).

A Epidermolysis Bullosa simples representa a forma mais frequente e é caracterizada por bolhas na epiderme. Este tipo é causado por variantes patogénicas dos genes KRT5 e KRT14 de herança dominante (Patricia Peking, 2017). Além de KRT5 e KRT14, outros genes estão associados a EBS, como o PLEC (Tabela 2). Mutações no PLEC, que levam ao mau funcionamento ou à ausência de plectina, estão ligadas a manifestações extracutâneas, como distrofia muscular e atresia pilórica, devido à falta de ligação dos hemodesmosomas aos filamentos intermediários (C. Chiaverini, 2010).

Um outro tipo é a Epidermolysis Bullosa juncional que é transmitido de modo recessivo e pode ser classificado como generalizado ou localizado. As principais variantes patogénicas encontram-se na Tabela 2. É caracterizada pela formação de bolhas na pele e nas mucosas, Tabela 3, (Pfender & Lucky, 2018), levando a feridas crónicas, perda de cabelo, distrofia ungueal, anormalidades dentárias e defeitos no esmalte. A formação de bolhas resulta principalmente da ausência ou diminuição da expressão da proteína laminina 332. Além desta, o colagénio tipo XVII também está associado à doença (Patricia Peking, 2017).

A Epidermolysis Bullosa distrófica pode ser transmitida de modo dominante ou recessivo. A dominante é causada principalmente por substituições de glicina dentro da cadeia  $\alpha 1$  em apenas um alelo de COL7A1, Tabela 2, e é caracterizada por aparecimento de bolhas, quistos e cicatrizes atróficas, principalmente nas extremidades, com perda frequente das unhas. Na Epidermolysis Bullosa distrófica recessiva, as especificações fenotípicas são causadas por mutações em ambos os alelos COL7A1 (Moravvej, et al., 2017). A presença generalizada de bolhas, crostas, erosões, cicatrização deformante das mãos e pés e contraturas articulares causam incapacidade funcional/motora importante. As complicações extracutâneas são comuns, entre as quais: envolvimento gastrointestinal/urogenital/ocular, anemia crónica, atraso de crescimento e risco elevado de desenvolvimento de carcinomas espinocelulares extremamente agressivos e eventualmente fatais (Patricia Peking, 2017).

O Síndrome de Kindler, outra forma de apresentação desta patologia, é causada pelas mutações no gene KIND1, Tabela 2, codificador da Kindlin-1, que afeta além da pele, a mucosa oral e urogenital, bem como o intestino. Este é um tipo de transmissão autossómica recessiva apresentando-se como o mais raro. As anormalidades da pele são descritas como bolhas generalizadas na pele, pigmentação típica, fotossensibilidade, atrofia da pele e cancro de pele (Fine, 2010). As complicações extracutâneas incluem colite grave, esofagite e estenose uretral (Patricia Peking, 2017).

Na Tabela 2 estão expostas diversas características da EB, incluindo tipos, subtipos, genes mutados, tipos de mutações conhecidas, o comprometimento da pele (mais aprofundada na Tabela 3), e modo de transmissão.

**Tabela 2** - Principais características da EB, seus tipos e subtipos. Adaptado de (Jo-David Fine, 2014) (Tuderman, 2020). Legenda: EBS- Epidermolysis Bullosa Simples; EBJ- Epidermolysis Bullosa Juncional; DEB- Epidermolysis Bullosa Distrófica; MS- Mutação Missense; Del- deleção; Indels- Pequena deleção/inserção; NS- Mutação sem sentido; Spl- Mutação na zona do splicing; Ins- Inserção.

Tipo EB	Subtipos EB	Genes Mutados	Tipos de mutações conhecidas	Comprometimento da pele	Herança
EBS	Suprabasal EBS	TGM5	MS, Del, Indels	Clivagem intra epidérmica da pele	Autossômica da pele dominante
		DSP	NS, Del, MS		
		PKP1	Spl, NS, Del, Indels, Ins		
		JUP	NS, Spl		
	Basal EBS	KRT5	MS, Del, Spl, NS, Indels		
		KRT14	MS, Del, NS, Spl, Indels, Ins		
		EXPH5	Del, NS, Ins		
		PLEC	NS, Del, Ins, Spl, Indels, MS		
	DST	NS			
EBJ	EBJ Generalizada	LAMA3	NS, Del, Spl	Clivagem da pele na lamina lúcida ou na zona da membrana basal.	Autossômica recessiva
		LAMB3	NS, Del, Spl, Ins		
		LAMC2	NS, Del, Spl, Indels		
	EBJ Localizada	LAMA3	MS, NS, Spl, Ins		
		LAMB3	MS, NS, Spl, Del, Ins, Indel		
		LAMB2	NS, Del, Indels, Ins, Spl		
		COL17A1	NS, Del, Spl, Ins, MS		
		ITGB4	NS, MS, Del, Spl, Ins, Indels		
		ITGA6	NS, MS, Del, Spl, Ins, Indels		
		ITGA3	MS, Del, Spl		
LAMA3A	Ins, NS				
DEB	RDEB	COL7A1	NS, Del, Spl, Ins, Indels, MS	Clivagem na zona da membrana basal da sub lamina densa	Autossômica recessiva Autossômica dominante
	DDEB	COL7A1	MS, Spl, Del		
Síndrome de Kindler	-----	FERMT1 (KIND1)	NS, Del, Spl, Ins, Indels a qualquer nível	Bolhas e clivagem	Autossômica recessiva

Podemos, deste modo, verificar que no mesmo subtipo de Epidermolysis Bullosa, existem diversos genes mutados e diferentes tipos de mutações que posteriormente comprometem a pele destes pacientes, Tabela 3.

**Tabela 3** - Sumário clínico dos diversos tipos de EB. Escala de frequências relativas: Ausente; Raro; 1+; 2+; 3+; 4+; Alto. Adaptado de (Jo-David Fine, 2014).

	EBS	EBJ	DDEB	RDEB	Kindler
<b>Bolhas</b>	4+	2 - 4+	2 - 3+	3 - 4+	Crianças 3+; Adulto 1+.
<b>Cicatriz atrófica</b>	Raro - 2+	Ausente - 3+	3 - 4+	3 - 4+	3+
<b>Indutibilidade de bolha</b>	Comum	2+ - 4+	Variável	Alto	Variável
<b>Pseudosyndactyly (deformação de mãos e pés)</b>	Ausente	Ausente - 1+	Raro	Variável - 4+	2+

Nesta tabela facilmente compreendemos que cada tipo de Epidermolysis Bullosa possui um sumário clínico específico e característico, nomeadamente quando observamos a escala da frequência com que estas características clínicas aparecem nos pacientes. No entanto estas mesmas características variam de paciente para paciente.

## Formas Terapêuticas

Existem várias formas terapêuticas para o controlo da EB que depende da forma diagnosticada, entre elas está a terapia celular e a genética.

### Terapia Celular

A Terapia celular consiste na utilização de células tronco, fibroblastos ou células geneticamente alteradas que serão injetadas localmente ou sistematicamente no hospedeiro, resultando numa expressão temporária ou permanente da proteína específica que é defeituosa, permitindo a reparação de tecidos e órgãos lesados (DEBRA, 2019) (Silva Barbosa, Menezes, & Emanuelli, 2018). Dependendo do paciente e da forma diagnosticada poderá utilizar-se o transplante de medula óssea ou a injeção de fibroblastos.

#### Transplante de medula óssea

Certas células-tronco derivadas da medula óssea são capazes de se diferenciar em células epiteliais e podem contribuir para a cicatrização de feridas cutâneas. Foi realizada uma experiência num ratinho com Epidermolysis Bullosa distrófica recessiva (RDEB) e verificou-se que as células-tronco da medula óssea alogénicas migraram para a pele ferida e produziram a proteína VII do colagénio ausente (Jakub Tolar, 2008).

Transplante de medula óssea para pacientes com EB foi iniciado em 2007, e os resultados dos primeiros sete pacientes (RDEB) tratados foram publicados em 2010 (John E. Wagner, 2010). Dois dos sete pacientes morreram de complicações do procedimento, mas os cinco restantes foram relatados por mostrar uma melhoria significativa na diminuição do número de bolhas e erosões. Este estudo revelou um aumento na expressão do colagénio tipo VII na zona da membrana basal cutânea tendo sido documentado em quatro dos cinco pacientes. Mesmo um paciente em que nenhum colagénio tipo VII estava presente apresentou melhoria clínica após o transplante. No entanto os conhecimentos atuais não providenciam uma cura para a doença (Tuderman, 2020), e todos os riscos deste procedimento devem ser discutidos tendo em conta o paciente (Katsuto Tamai, 2010)

Em pacientes com RDEB submetidos a transplante de medula óssea (TMO), foi detetada maior deposição de colagénio VII, explicando a melhoria observada da estabilidade da pele (Johanna Hammersen, 2016).

### Injeções de fibroblastos

Num estudo realizado por Susana Ortiz-Urda em 2003 verificou-se que com a injeção intradérmica de fibroblastos que sintetizam e secretam matriz celular, expressando o colagénio tipo VII, na pele íntegra de pacientes com EB distrófica recessiva, se observaram que essas células restauraram localmente a expressão do colagénio tipo VII in vivo e normalizaram aspetos clínicos da doença, incluindo bolhas subepidérmicas e defeitos das fibras de ancoragem (Susana Ortiz-Urda, 2003). Também o estudo de longo prazo de (Kern, et al., 2009) concluiu que a injeção intradérmica de fibroblastos em ratinhos aumentou o conteúdo de colagénio VII, que permaneceu estável e melhorou drasticamente a integridade da pele e resistência da forças mecânicas por pelo menos 100 dias.

Em 2017 foi realizado um estudo (Moravvej, et al., 2017) em clínica que comparava os efeitos da injeção intradérmicas de uma cultura alogénica de fibroblastos na cicatrização de feridas em pacientes com EBDR, com fibroblastos semeados em matriz de membrana amniótica (FAMS), e um tratamento padrão de feridas com gases de vaselina (controlo). Dos 7 pacientes recrutados, três foram submetidos à injeção de fibroblastos, três foram tratados com FAMS, e um foi tratado com as gases. Após 12 semanas de tratamento, os tamanhos das feridas tratadas com as injeções diminuíram significativamente em comparação com as tratadas com FAMS.

### Terapia Genética

A terapia genética consiste em desenvolver métodos que insiram gene selvagem nas células do paciente, permitindo deste modo que a célula produza a proteína correta e em quantidade adequada para melhorar ou curar os sintomas da doença (High & Roncarolo, 2019).

### Terapia genética ex vivo

O desenvolvimento de abordagens terapêuticas funcionais para EB tem-se concentrado principalmente em estratégias de aplicação ex vivo. As células-tronco epidérmicas, que residem no bulbo do folículo piloso, na glândula sebácea e na camada basal da epiderme, mantêm a sua renovação contínua.

Existem três tipos de clones dos queratinócitos com diferentes capacidades de multiplicação: Holoclones, paraclones e os meroclones. Os holoclones são células-tronco da epiderme e do folículo piloso, representando todas as características das células-tronco, incluindo alta capacidade proliferativa com capacidade de autorrenovação (Y Barranton, 1987). Potencialmente, toda a epiderme humana pode ser construída por um holoclone. Assim, o ponto crucial para alcançar efeitos terapêuticos permanentes é o direcionamento de células-tronco epidérmicas humanas, que podem ser isoladas de pequenas amostras de pele tomadas por meio de biópsias, e expandidas *in vitro* para formar uma lâmina epidérmica transplantável (Patricia Peking, 2017)).

Um dos métodos de terapia genética *ex vivo* mais promissoras, é o uso de estratégias virais para corrigir a pele nos pacientes com EB (Eva M. Murauer, 2015) Inicialmente são retiradas células de pele do paciente e um vírus é modificado em laboratório, sendo introduzida uma nova informação genética no mesmo para a produção da proteína defeituosa ou em falta no indivíduo. De seguida, é adicionado o vírus modificado às células do paciente, que mais tarde se irão desenvolver e multiplicar com a informação genética anteriormente introduzida. Finalmente, as células modificadas são introduzidas no paciente e o organismo começará a produzir a proteína em falta.

Embora este tipo de terapia não consiga curar completamente todos os sintomas da EB, traz algumas vantagens importantes, entre elas: a diminuição da perda de fluidos corporais, reduzindo também a perda de proteínas e peptídeos; o encerramento de feridas, que melhora a defesa do organismo contra infeções, e a prevenção do aparecimento de cancro, que ocorre em duas das variantes da EB (juncional e distrófica) (Eva M. Murauer, 2015).

Existem algumas preocupações relativamente ao uso deste tipo de terapias, devido ao potencial de genotoxicidade, a possibilidade de existir uma resposta imunológica do organismo do paciente contra a proteína recém-produzida, e o elevado período de tempo para a renovação parcial da pele (Eva M. Murauer, 2015).

Segundo um estudo de (Takashima, et al., 2019), foi aplicada uma terapia de “reenquadramento genético” a uma mutação frameshift recorrente no COL7A1, que resulta num codão de terminação prematuro. A CRISPR/Cas9 direcionada para o local específico da mutação, foi entregue aos fibroblastos de pacientes com Epidermolysis Bullosa Distrófica Recessiva. Após genotipagem de um grande número de clones de fibroblastos com genes editados, foi identificado um número significativo (17/50) de clones nos quais a mutação no COL7A1 foi corrigida. A COL7A1 reformulada estava funcional, demonstrado pela formação de tripla hélix *in vitro*, estando ainda corretamente distribuída na zona da membrana basal do ratinho. Os resultados deste estudo sugerem que este tipo de terapia genética pode ser eficiente neste tipo de mutações.

### **Terapia genética *in vivo***

A terapia genética *in vivo* assemelha-se à entrega de outros tipos de agentes farmacológicos na medida em que é injetado um vetor diretamente no paciente (High & Roncarolo, 2019).

No estudo de (Seitz, 1999), foi usado um vetor de expressão retroviral para BP180, no qual a transferência deste gene resultou na melhoria da adesão celular em pele com JEB *in vitro*, além de restaurar a expressão da proteína BP180 na zona da membrana basal na pele regenerada *in vivo*, em ratinhos. Estudos com uso de terapia genética *in vivo* em pacientes com EB em fase clínica ainda não foram descritos.

A eficiência do fornecimento de moléculas e a exposição à dor dos pacientes durante e após o tratamento, devem ser levados em consideração neste tipo de tratamento (Patricia Peking, 2017). Devido à progressão no desenvolvimento de várias tecnologias, como geração de vetores virais otimizados para segurança e moléculas modificadoras de genoma / RNA, são necessários métodos de aplicação *in vivo* apropriados para fornecer genes através do estrato córneo para as camadas de pele favorecidas. De seguida são abordados três métodos de aplicação *in vivo*.

### **Injeções intradérmicas e intravenosas**

A injeção é uma maneira rápida, barata e eficiente de distribuir quase todo o tipo de moléculas no corpo

organismo humano. Em relação à terapia na EB, estes tipos de injeções foram usadas principalmente para terapias celulares como a injeção de fibroblastos alogénicos, células tronco mesenquimais e células da medula óssea, melhorando a cicatrização de feridas em pacientes com a doença. A injeção intradérmica é administrada diretamente nas feridas da pele do paciente ou nas bordas. Além disso tem apenas um pequeno raio de difusão, o que não é útil para grandes áreas. Já na injeção intravenosa, há redução da dor e uma melhoria da estabilidade geral da pele, mas a sua aplicação direta na corrente sanguínea pode ter complicações mais graves (Patricia Peking, 2017).

A injeção de moléculas na pele ou corrente sanguínea nos pacientes como terapia para EB ainda não foi realizada, mas existem dados pré-clínicos (Patricia Peking, 2017). Injeções intradérmicas de siRNA para tratamento da genodermatose Pachyonychia Congenita, foram aplicadas com sucesso num paciente, indicando uma possível adaptação para formas de EB (Leachman, et al., 2009).

### Microagulhas

Inicialmente, foram produzidas microagulhas para o pré-tratamento da pele, a fim de torná-la mais permeável a drogas. Mas outros tipos foram desenvolvidos ao longo do tempo, como as microagulhas revestidas, microagulhas poliméricas revestidas e ainda microagulhas ocas. As aplicações aprovadas deste tipo de terapia são diversas, podendo ser usada com oligonucleotídeos, vacinas, péptidos, hormonas, cosméticos e terapia analgésica (Waghule, et al., 2019). Segundo (Sun, et al., 2015) a administração de colagénio VII à base de microagulhas pode resultar na cicatrização da EBD. A entrega de ADN plasmídeo com recurso a microagulhas ocas em pele humana excisada já é possível e a expressão genética eficiente era predominantemente visível na epiderme (Dul, et al., 2017). O facto das microagulhas serem minimamente invasivas e acompanhadas de dor reduzida para os pacientes, leva a uma melhoria do bem-estar e da segurança do paciente durante o tratamento. Este modo de aplicação exhibe um elevado potencial para fornecer moléculas terapêuticas para EB de forma eficiente (Patricia Peking, 2017).

### Nano partículas e Bombardeamento de partículas

Para além das técnicas já descritas, existem outras promissoras, tais como o uso de nano partículas e o bombardeamento de partículas, que ainda estão numa fase experimental e não iniciaram ensaios clínicos em humanos (Patricia Peking, 2017). Sabe-se, no entanto, que o bombardeamento de partículas através de uma “pistola de genes”, contém partículas de ouro revestidas com ADN que penetram nas células do tecido alvo através da aceleração de alta velocidade de gás pressurizado nas esferas de ouro. Já no que diz respeito às nano partículas, estas são usadas como veículos de entrega de moléculas terapêuticas, como drogas (Prow, et al., 2011) (medicamentos com propriedades anti-inflamatórias, tais como corticosterona e ácido flufenâmico) e genes (Prabu, Suriyaprakash, & Thirumurugan, 2017), bem como para engenharia de tecidos, principalmente quando injetado no corpo para capturar os vasos sanguíneos antes de chegar ao local alvo. Estas são fabricadas a partir de material orgânico, inorgânico ou polimérico e têm um comportamento rápido de absorção e libertação. Os vetores virais e não virais são dois tipos usados na entrega de genes usando plasmídeos de DNA, RNA e siRNA. São usadas para o desenvolvimento de terapias para neoplasias, diabetes Mellitus, alergias, infeções e inflamações. Segundo um estudo de (Prow, et al., 2011), estrato córneo da pele saudável fornece uma barreira natural contra a penetração de partículas, mas especialmente na pele doente, como é o caso em EB, a entrega de nano partículas terapêuticas parece representar uma opção promissora para o tratamento desta patologia.

### Vantagens e desvantagens

Na tabela 4, estão apresentadas de forma esquemática os vários aspetos de cada uma das terapias abordadas, as suas vantagens e desvantagens, devendo alertar-se para o facto de nenhuma das terapêuticas abordadas se apresentar com um potencial de cura.

**Tabela 4** - Vantagens e desvantagens no uso das terapias genéticas e celulares na EB. Adaptado de (Patricia Peking, 2017) (Eva M. Murauer, 2015).

	TIPO DE TERAPIA	VANTAGENS	DESvantagens
<b>TERAPIA CELULAR</b>	Transplante de medula óssea	Melhoria clínica Aumento da expressão de colagénio; Diminuição do número de bolhas; Diminuição de erosões.	Potenciais complicações do procedimento; Morte relatada em pacientes; Não é uma potencial cura.
	Injeções de fibroblastos	Aumento da expressão de colagénio; Sintetiza e secreta matriz celular; Diminui o número de bolhas; Aumento de fibras de ancoragem.	Processo doloroso; Pequeno raio de difusão; Não é uma cura.
<b>TERAPIA GENÉTICA</b>	Ex vivo com estratégias virais	Diminuição da perda de fluídos corporais; Diminuição da perda de proteínas e péptidos; Encerramento de feridas; Aumento da defesa do organismo; Prevenção no aparecimento de cancro de pele.	Potencial de genotoxicidade; Possibilidade de resposta imune à proteína recém-produzida; Processo demorado; Não é uma cura.
	In vivo- injeções intradérmicas	Aplicação de vetores virais diretamente no paciente; Mais rápido, barato e eficiente.	É extremamente doloroso para o paciente; Pequeno raio de difusão; Não é uma cura.
	In vivo- injeções intravenosas	Diminuição da dor sentida pelo paciente; Melhora a estabilidade geral da pele. (Pouco) doloroso para o paciente;	Complicações mais graves; Não é uma cura.
	Microagulhas	Melhora o bem-estar do paciente; Minimamente invasiva. Dor reduzida; Entrega ADN plasmídeo; Expressão genética visível.	Dor (reduzida); Não é uma cura.

## Discussão/ Conclusão

Da análise da patogénese e do tipo de terapias encontradas na revisão da literatura para a EB percebermos que existem, tal como todo em outro tipo de terapias e drogas utilizadas, aspetos positivos e negativos que devem ser tidos em conta antes da utilização de qualquer uma das técnicas referenciadas num paciente com EB. Deve ser realizada uma gestão das vantagens e desvantagens da terapia a ser usada pelo clínico em concordância com o doente e é crucial manter o bem-estar do paciente de forma a evitar quaisquer erros que possam advir da forma terapêutica selecionada. Embora os genes associados a esta patologia estejam reconhecidos e estudados, é possível que novos genes, mutações e fenótipos possam surgir. Antes do uso de qualquer terapia, deve ser feito um estudo

e ponderado todos os aspetos positivos e negativos e o impacto da terapia no paciente. Os pacientes com EB têm necessidades clínicas complexas durante todo o percurso da sua vida.

É essencial a sensibilização da população relativamente à EB, bem como a promoção do interesse em desenvolver o conhecimento técnico e científico não só de todas as terapias existentes, como também da própria fisiopatologia da doença.

## Referências Bibliográficas

- C. Chiaverini, A. C. (28 de Abril de 2010). Epidermolysis Bullosa Simplex with Muscular Dystrophy. *Dermatologic clinics*, pp. 245-255. doi:10.1016/j.det.2010.01.001.
- Chan, J. M., Maksomski, S., Weisman, A., King, A., Shotwell, C., Bailie, C., . . . Khuu, P. (2019). Occupational therapy for epidermolysis bullosa: clinical practice guideline. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. doi:Orphanet Journal of Rare Diseases
- Cristina Has, A. N.-T. (3 de Abril de 2018). Epidermolysis bullosa: Molecular pathology of connective tissue components in the cutaneous basement membrane zone. *Matrix Biology*, p. 51. doi:10.1016/j.matbio.2018.04.001
- DEBRA. (2019). *O que é a EB?* Obtido de debra- Associação Portuguesa de Epidermólise Bolhosa: <https://debra.med.up.pt/sobre-a-eb/>
- DEBRA. (2019). *Terapêuticas em investigação*. Obtido de Associação Portuguesa de Epidermólise Bolhosa: <https://debra.med.up.pt/terapeuticas-em-investigacao/>
- Dul, M., Stefanidou, M., Porta, P., Serve, J., O'Mahony, C., Malissen, B., . . . Birchall, J. (2017). Hydrodynamic gene delivery in human skin using a hollow microneedle device. *Journal of controlled release*. doi:10.1016/j.jconrel.2017.02.028
- Eva M. Murauer, U. K. (2015). Advances in Gene/Cell Therapy in Epidermolysis Bullosa. *The Keio Journal of Medicine*, pp. 21-25. doi:10.2302/kjm.2014-0013-RE
- Fine, J. D. (2010). Inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. doi:10.1186/1750-1172-5-12
- Fischer, C. H. (20 de Abril de 2018). Inherited epidermolysis bullosa: new diagnostics and new clinical phenotypes. *Experimental Dermatology*, p. 17. doi:10.1111/exd.13668
- Heather I. Cohn, J. M. (1 de Agosto de 2016). Advancement in management of epidermolysis. *Current Opinion in Pediatrics*, pp. 507-516. doi:10.1097/MOP.0000000000000380
- High, K. A., & Roncarolo, M. G. (2019). Gene Therapy. *The new england journal of medicine*, 455-464. doi:10.1056/NEJMra1706910
- Jakub Tolar, A. I.-Y. (27 de Outubro de 2008). Amelioration of epidermolysis bullosa by transfer of wild-type bone marrow. *Blood Journal*, pp. 1167-1174. doi:10.1182/blood-2008-06-161299
- Jo-David Fine, L. B.-T. (29 de Junho de 2014). Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*, pp. 1-24. doi:10.1016/j.jaad.2014.01.903
- Johanna Hammersen, C. H.-B.-T. (29 de Junho de 2016). Genotype, Clinical Course, and Therapeutic Decision Making in 76 Infants with Severe Generalized Junctional Epidermolysis Bullosa. *Journal of Investigative Dermatology*, pp. 2150-2157. doi:10.1016/j.jid.2016.06.609.
- John E. Wagner, A. I.-Y. (12 de Agosto de 2010). Bone Marrow Transplantation for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *The New England Journal of Medicine*, pp. 629-639. doi:10.1056/NEJMoa0910501
- Katsuto Tamai, J. U. (30 de Setembro de 2010). Stem Cell Therapy for Epidermolysis Bullosa- Does it work? *Journal os Investigative Dermatology*, pp. 629-639. doi:10.1016/j.jid.2016.07.004.
- Kern, J. S., Loeckermann, S., Fritsch, A., Hausser, I., Roth, W., Magin, T. M., . . . Bruckner-Tuderman, L. (2009). Mechanisms of Fibroblast Cell Therapy for Dystrophic Epidermolysis Bullosa: High Stability of Collagen VII Favors Long-term Skin Integrity. *Molecular Therapy*, 1605-1615. doi:10.1038/mt.2009.144
- Leachman, S. A., Hickerson, R. P., Schwartz, M. E., Bullough, E. E., Hutcherson, S. L., Boucher, K. M., . . . Kaspar, R. L. (2009). First-in-human Mutation-targeted siRNA Phase Ib Trial of an Inherited Skin Disorder. *The American Society of Gene & Cell Therapy*. doi:10.1038/mt.2009.273
- Moravvej, H., F., A., M., N. H., Z., P., Z. A., N. M., & H. N. (2017). Cultured allogeneic fibroblast injection vs. fibroblasts cultured on amniotic membrane scaffold for dystrophic epidermolysis bullosa treatment. *British Journal of Dermatology*, 71- 79. doi: 10.1111/bjd.16338
- Patricia Peking, U. K. (15 de Dezembro de 2017). Functional therapies for cutaneous wound repair in epidermolysis bullosa. Elsevier- *Advanced Drug Delivery Reviews*, p. 35. doi:10.1016/j.addr.2017.12.003
- Pfender, E. G., & Lucky, A. W. (Dezembro de 2018). Junctional Epidermolysis Bullosa . *GeneReviews*.
- Prabu, S. L., Suriyaprakash, T. N., & Thirumurugan, R. (2017). Advanced Technology for Delivering Therapeutic. *Medicated Nanoparticle for Gene Delivery*. doi:10.5772/65709
- Prow, T. W., Grice, J. E., Lin, L. L., Faye, R., Butler, M., Becker, W., . . . Roberts, M. S. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 470-491. doi:10.1016/j.addr.2011.01.012
- Seitz, C. G. (1999). BP180 gene delivery in junctional epidermolysis bullosa. *Gene Therapy*, 42-47.
- Silva Barbosa, J. H., Menezes, R. A., & Emanuelli, I. P. (06 de Março de 2018). USO DE TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO NAS ESPECIALIDADES MÉDICAS NO BRASIL: REVISÃO SISTEMÁTICA. *Revista Uningá*, pp. 85- 100. doi:2318-0579
- Sun, W., Inayathullah, M., Manoukian, M. A., Malkovskiy, A. V., Manickam, S., Marinkovich, M., . . . Rajadas, J. (2015). Transdermal Delivery of Functional Collagen Via Polyvinylpyrrolidone Microneedles. *Ann Biomed Eng*. doi:10.1007/s10439-015-1353-0
- Susana Ortiz-Urda, Q. L. (15 de Janeiro de 2003). Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, pp. 251-255. doi:10.1172/JCI117193
- Takashima, S., Shinkuma, S., Fujita, Y., Nomura, T., Ujiie, H., Natsuga, K., . . . Shimizu, H. (2019). Efficient Gene Reframing Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa with CRISP/Cas9. *Journal of Investigating Dermatology*, 1711- 1721. doi:10.1016/j.jid.2019.02.015
- Tuderman, L. B. (2020). Newer Treatment Modalities in Epidermolysis Bullosa. *Indian Dermatology Online Journal*, 244-250. doi: 188.251.56.238
- Waghule, T., Singhvi, G., Dubey, S. K., Pandey, M. M., Gupta, G., Singh, M., & Dua, K. (2019). Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 1249- 1258. doi:10.1016/j.biopha.2018.10.078
- Y Barranton, H. G. (8 de Abril de 1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proceeding of The National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 2302-2306. doi:PMC304638