

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Pediatría

“Eficacia del tratamiento con piel quimérica cultivada de las lesiones cutáneas en pacientes con epidermolisis bullosa distrófica recesiva”.

TESIS DOCTORAL

Juan José Vázquez Estévez

Madrid 2012

INDICE

1.- JUSTIFICACION DE LA TESIS	7
2.- INTRODUCCION	
2.1.- Definición	10
2.2.- Clasificación y bases moleculares de la Epidermolisis Bullosa	13
2.3.- Características epidemiológicas de la Epidermolisis Bullosa	23
2.3.1.- Prevalencia e incidencia de cada tipo y subtipo de Epidermolisis Bullosa	26
2.4.- Diagnóstico	30
2.4.1.- Estudios histopatológicos para el diagnóstico de la Epidermolisis Bullosa	30
2.4.2.- Características de la microscopía óptica en la Epidermolisis Bullosa	31
2.4.3.- Cartografía antigénica	33
2.4.4.- Microscopía electrónica en el diagnóstico de la Epidermolisis Bullosa	34
2.4.5.- Ventajas e inconvenientes de la microscopía electrónica para el diagnóstico de la Epidermolisis Bullosa	38
2.4.6.- Forma no habitual de herencia: isodisomía uniparental (IDUP)	40

2.4.7.- Mosaicismo genético en la Epidermolisis Bullosa	43
2.4.8.- El mosaicismo revertiente en la Epidermolisis Bullosa	45
2.4.9.- Mosaicismo y genoterapia natural	53
2.4.10.- Diagnóstico genético prenatal en la Epidermolisis Bullosa	55
2.4.11.- Diagnóstico genético preimplantacional	62
2.4.12.- Diagnóstico prenatal incruento	68
2.4.13.- Diagnóstico prenatal: práctica clínica	70
2.5. Manifestaciones clínicas	
2.5.1.- Manifestaciones cutáneas generales	71
2.5.2.- Nevos en la epidermolisis bullosa	78
2.5.3.- El cáncer en la epidermolisis bullosa	79
2.5.4.- Complicaciones oftalmológicas	83
2.5.5.- Complicaciones otorrinolaringológicas	86
2.5.6.- Lesiones orales	89
2.5.7.- Complicaciones gastrointestinales	91
2.5.8.- Complicaciones musculoesqueléticas	95
2.5.9.- Complicaciones internas	100

2.6. Tratamientos	
2.6.1.- Tratamiento y prevención de heridas	103
2.6.2.- Manejo del dolor	108
2.6.3.- Tratamiento del prurito	113
2.6.4.- Intervenciones quirúrgicas	116
2.6.5.- Soporte nutricional	122
3.- HIPOTESIS	135
4.- OBJETIVOS	138
5.- MATERIAL Y METODOS	139
5.1.- Diseño del estudio	139
5.2.- Selección de los pacientes	140
5.3.- Criterios de inclusión	140
5.4.- Criterios de exclusión	141
5.5.- Duración de la investigación	142
5.6.- Descripción del tratamiento	143
5.7.- Diagrama de estudio	144
5.8.- Idoneidad de las medidas	157
5.9.- Variables de eficacia	157
5.10.- Determinaciones de laboratorio	158
5.11.- Exploración física	159
5.14.- Aspectos éticos	159

5.15.- Comité ético de investigación	160
5.16.- Consentimiento informado	160
5.17.- Método estadístico utilizado	161
5.18.- Tamaño y potencia de la muestra	164
6.- RESULTADOS	165
6.1.- Pacientes del estudio	165
6.2.- Muestras analizadas	166
6.3.- Características demográficas	167
6.4.- Resultados de eficacia	169
6.5.- Análisis secundarios de eficacia	171
6.6.- Persistencia histológica de fibroblastos	172
6.7.- Persistencia de fibroblastos alogénicos	173
6.8.- Integración y eficacia del implante	178
6.9.- Longitud y anchura de los tratamientos	180
6.10.- Evaluación global del efecto	181
6.11.- Respuesta clínica global	182
6.12.- Complicaciones durante la investigación	183
6.13.- Análisis de acontecimientos	184
6.14.- Signos vitales y hallazgos físicos	185

7.-	DISCUSION	186
8.-	CONCLUSIONES	193
9.-	BIBLIOGRAFIA	194

1.- Justificación de la Tesis:

La epidermólisis bullosa (EB) es una enfermedad hereditaria que afecta a la epidermis y a la dermis y que se incluye dentro de las enfermedades llamadas “mecanobullosas”. La causa de esta enfermedad es una alteración de las proteínas de la unión dermo-epidérmica que provoca un fallo en la cohesión de estas dos estructuras provocando la formación de ampollas en la piel o en las mucosas ante un trauma leve. Esta enfermedad tiene una baja prevalencia y se estima que en España tiene una incidencia de 5,97 casos por millón de habitantes.

La integridad de la piel es fundamental para evitar las agresiones externas y esta integridad depende de la unión dermoepidérmica y expresamente de la lámina basal donde se localizan los complejos de anclaje que garantizan la adhesión de las células epiteliales a la matriz de la dermis. Desde el punto de vista ultraestructural la lámina basal es una bicapa constituida por la lámina lúcida y la lámina densa. A su vez los complejos de anclaje están constituidos por hemidesmosomas, filamentos de anclaje y fibrillas de anclaje. El principal componente de las fibras de anclaje es el colágeno tipo VII y los queratinocitos son la fuente principal del colágeno que se localiza en la unión dermoepidérmica. La ausencia de colágeno tipo VII va a ser responsable de la desestructuración de esta zona provocando el tipo de EB distrófica y que ha sido el motivo de estudio de este trabajo.

Actualmente los estudios de biología molecular y genética han permitido determinar que en la EB existen mutaciones que van a provocar la alteración estructural de la unión dermo-epidérmica y también permiten determinar según el tipo de mutación, la gravedad clínica, el fenotipo y la historia natural de la

enfermedad. El conocimiento de estas mutaciones ha permitido clasificar mejor la enfermedad, así como establecer el consejo genético y un correcto diagnóstico prenatal.

La biopsia cutánea nos permite establecer el diagnóstico de seguridad y va a ser la microscopía electrónica y la inmunofluorescencia lo que permitirá establecer el nivel de formación de ampollas y consecuentemente el tipo o subtipo de EB. De esta forma podemos identificar una EB simple cuando las ampollas se encuentran a nivel de la capa basal de la epidermis, una EB juntural cuando las ampollas están en la unión dermo-epidérmica y una EB distrófica si se producen a nivel de la dermis.

En la actualidad no existe un tratamiento específico de la EB. Los tratamientos actuales tienen como objetivo evitar la formación de ampollas ante el mínimo trauma, proporcionar las mejores condiciones de cicatrización de las heridas, evitar las infecciones, controlar el dolor y tratar las posibles complicaciones. Un aspecto muy importante es mantener un buen estado nutricional para proporcionar una adecuada cicatrización de las heridas. En los pacientes pediátricos la gastrostomía para alimentación ha demostrado ser altamente eficaz, mejorando mucho el estado general de los pacientes y disminuyendo las complicaciones.

Conocimientos más explícitos de las bases moleculares y genéticas de la EB han permitido diseñar estrategias terapéuticas nuevas. Actualmente se ha demostrado que las mutaciones en el gen COL7A1, que codifica el colágeno VII, dan lugar a la EB distrófica. En estudios experimentales se ha comprobado que la inyección intradérmica de colágeno tipo VII humano recombinante puede restaurar las fibrillas de anclaje y evita la aparición de ampollas. También

sabemos que las células de piel humana cultivada pierden sus antígenos de superficie HLA y se hacen menos inmunogénicas, este tipo de cultivos se han implantado en pacientes con EB distrófica sin evidencia de rechazo. El empleo de estos cultivos ha permitido emplear con seguridad fibroblastos alogénicos para corregir el defecto de los fibroblastos autólogos en pacientes con EB distrófica recesiva.

Estos estudios son los que proveen la base científica necesaria para sospechar que el tratamiento con equivalentes cutáneos quiméricos obtenidos por ingeniería tisular, autólogos a nivel epidérmico y alógenos a nivel dérmico, pueden permitir tratar con más eficacia las lesiones cutáneas favoreciendo la cicatrización, acelerando la epitelización y evitando la formación de ampollas.

2.- Introducción:

2.1.- Definición:

El término *epidermólisis bullosa (EB) hereditaria* se aplica a un grupo de enfermedades hereditarias que se manifiestan con la formación de ampollas y erosiones en la piel y en las mucosas donde se han producido traumatismos leves, por lo que se incluyen en las denominadas «enfermedades mecanobullosas». Koeber en 1886 usa por primera vez el término EB [1], aunque ya otros autores habían descrito cuadros clínicos compatibles con esta enfermedad [2]. La nomenclatura utilizada en la actualidad está basada en cada una de las nuevas formas clínicas de esta enfermedad permitiendo identificar a los pacientes que padecen EB, desde los puntos de vista fenotípico, ultraestructural, antigénico y, más recientemente, molecular.

Entre las complicaciones de los distintos tipos de EB se encuentran diversas manifestaciones extracutáneas, como son la formación de ampollas y zonas de erosión en la córnea y las mucosas, lesiones en el esmalte de los dientes, estenosis de las vías respiratorias o del aparato gastrointestinal y urogenital, atresia pilórica, distrofia muscular y cáncer. En los lactantes debe realizarse el diagnóstico diferencial entre las formas hereditarias de las enfermedades mecanobullosas y la epidermólisis bullosa adquirida [3], que puede presentarse tanto en niños como en adultos [4]. Esta enfermedad bullosa autoinmunitaria adquirida se debe a lesiones causadas por la acción de autoanticuerpos que reaccionan contra el colágeno de tipo VII, que es el principal constituyente de las fibrillas de anclaje de la dermis [5]. La importancia de esto radica en que la forma hereditaria de esta enfermedad se asocia a mutaciones en el gen que codifica el colágeno de tipo VII [6].

Las formas hereditarias de EB se clasifican actualmente en tres grupos principales: epidermólisis bullosa simple (EBS), epidermólisis bullosa juntural (EBJ) y epidermólisis bullosa distrófica (EBD). La EBS se caracteriza por la citólisis de los queratinocitos, la EBJ por la formación de hendiduras en la lámina lúcida (de ahí el término «juntural») y la EBD por la formación de ampollas por debajo de la lámina densa en la zona de la membrana basal dermoepidérmica [7, 8].

Se han detectado mutaciones en más de diez genes que codifican las proteínas estructurales en los queratinocitos o en las membranas basales de las uniones mucocutáneas y que contribuyen a la adherencia entre el epitelio y la membrana basal o la matriz extracelular situada debajo de éste. Si bien en algunos de los principales subtipos de EB la correlación fenotipo-genotipo es en cierta medida variable, los tipos de mutaciones y, en algunos casos, los sitios donde éstas se producen podrían estar asociadas a la gravedad de las manifestaciones clínicas de los distintos subtipos de EB.

Los avances recientes en los conocimientos sobre las bases genéticas de cada uno de los subtipos han hecho posible el establecimiento cada vez más rápido de diagnósticos fiables. Por otra parte, los conocimientos derivados de los análisis mutacionales son de vital importancia para el consejo genético eficaz. Si bien los especialistas se centran inicialmente en establecer un diagnóstico correcto y tratar de forma eficaz la piel afectada, con el paso del tiempo el tratamiento de las complicaciones extracutáneas se vuelve cada vez más importante para garantizar a estos pacientes la mejor calidad de vida posible. Debido a las diversas manifestaciones de las variantes hereditarias de EB, el tratamiento y el seguimiento debe llevarlos a cabo un equipo médico

multidisciplinar, formado por médicos y terapeutas de todas las especialidades con suficiente experiencia en el tratamiento de pacientes con esta enfermedad.

2.2.- Clasificación y bases moleculares de la epidermolisis bullosa hereditaria

En la clasificación de los tipos y subtipos de EB se tienen en cuenta el fenotipo, el tipo de herencia y el genotipo [7]. En la actualidad, la EB se clasifica en tres grupos principales: simple, juntural y distrófica, dependiendo de si la localización de las ampollas es intraepidérmica («epidermolítica»), en la lámina lúcida («lucidolítica») de la unión dermoepidérmica (UDE), o en la parte superior de la dermis papilar («dermolítica») justo por debajo de la UDE.

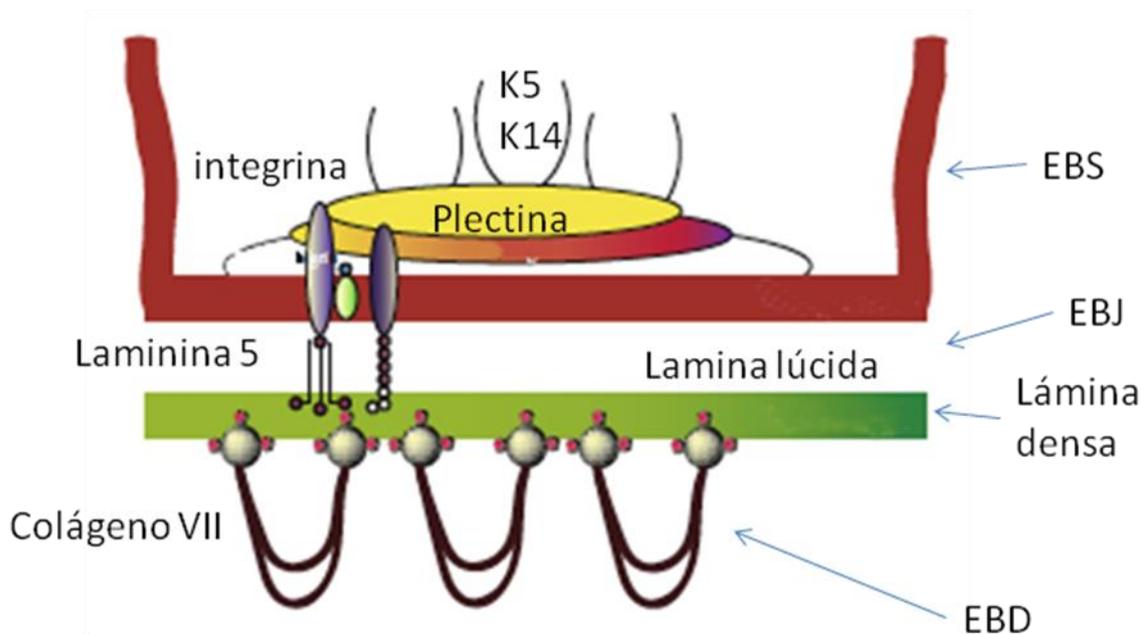


Fig. 1.- Representación esquemática de la unión dermoepidérmica y de la ubicación ultraestructural de las proteínas estructurales específicas afectadas en los pacientes con EB.

Epidermólisis bullosa simple (EBS):

La gran mayoría de EBS se transmiten de forma autosómica dominante. El subtipo más frecuente de EBS, conocida también como *enfermedad de Weber-Cockayne* (EBS-WC), se caracteriza por la presencia de ampollas principalmente en las palmas de las manos y las plantas de los pies, aunque también pueden presentarse en cualquier otra parte del cuerpo como consecuencia de traumatismos cutáneos de gran magnitud. Las manifestaciones clínicas de la EBS-WC suelen aparecer en lactantes, aunque en casos raros no se presentan hasta principios de la edad adulta. Las manifestaciones extracutáneas, aparte de las ampollas en la cavidad bucal que carecen de importancia clínica, son raras en los primeros años de la infancia [9, 10].



Figura 2: Paciente con enfermedad de Weber-Cockayne y con afectación característica en la planta de los pies.

Los dos tipos principales de EBS generalizada son la EBS de Koebner (EBS-K) y la EBS de Dowling-Meara (EBS-DM). En el caso de la EBS-K, las ampollas suelen estar presentes al nacer y pueden aparecer en la piel de cualquier parte del cuerpo. Cuando las ampollas se presentan en las

extremidades, suelen respetar las palmas de las manos y las plantas de los pies, a diferencia de lo que ocurre en la EBS-WC. La EBS de Dowling-Meara (EBS-DM) [11], el tipo más grave de las EBS autosómicas dominantes generalizadas, se caracteriza por la presencia de ampollas o vesículas agrupadas y distribuidas en forma de arco (de ahí que antiguamente se denominase *EBS herpetiforme*, ya que algunas lesiones son similares a las del herpes simple). Estos pacientes suelen presentar, además, hiperqueratosis palmo-plantar extensa o confluyente, distrofia ungueal, cicatrices atróficas, quistes miliares y afectación de las mucosas [7]. Algunos pacientes con EBS-DM también presentan retraso del crecimiento, estenosis laríngea [8] y muerte prematura [12, 13].

La mayoría de los subtipos de EBS se deben a mutaciones en los genes que codifican las queratinas K5 y K14 [14]. Estos defectos inhiben la formación de filamentos de queratina («tonofilamentos»), lo que aumenta la fragilidad del citoesqueleto y, como resultado de ello, se produce citólisis de queratocitos de la capa basal. De todos los tipos de EB, el que presenta la mejor correlación fenotipo-genotipo es la EBS [15].

Como es de esperar, la gravedad de la enfermedad depende también del carácter homocigótico (manifestaciones graves) o heterocigótico (manifestaciones menos graves) del defecto genético. Además, la clase de mutación puntual también determina la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo, la conversión de metionina en valina en la posición 119 (mutación W119V) en el gen que codifica la queratina 14 causa el tipo menos grave de la enfermedad (EBS-K), mientras que la mutación W119T (conversión de

metionina en tirosina) causa el tipo EBS-DM mucho más grave de la enfermedad [16, 17].

Existe un tipo infrecuente de EBS denominado *EBS con distrofia muscular* (EBS-DM). La causa de este tipo de EBS es la presencia de codones de finalización precoz en el gen PLEC1, que codifica la proteína plectina, una proteína estructural de los hemidesmosomas y de los discos Z de los miocitos [18, 19]. Las ampollas se presentan desde el nacimiento, pero la distrofia muscular aparece más tarde (entre los 2 y 35 años de vida) [20]. La mayoría de los pacientes con EBS tienen una esperanza de vida igual a la del resto de la población, aunque se ha informado un aumento en la mortalidad en niños con EBS-DM. Estos últimos mueren en la tercera o la cuarta década de vida, a causa de la afectación muscular.

EB juntural

Existen dos subtipos principales de EB juntural y ambos se transmiten de forma autosómica recesiva. La forma generalizada más grave de este subtipo de EB se denomina *EBJ de Herlitz* (EBJ-H) [21], a la que solía llamarse *EB letal* debido al alto riesgo de muerte prematura que supone. La mayoría de los pacientes con EBJ generalizada presentan el tipo no Herlitz de esta enfermedad (EBJ-nH), antes denominada *EB atrófica generalizada benigna* (EBAGB) [22, 23].

La EB de Herlitz se produce por mutaciones homocigóticas en los genes LAMA3, LAMB3 y LAMC2, cada uno de los cuales codifica una de las tres cadenas del heterotrímetro laminina-332. La degradación del ARNm por mutaciones de parada de una de estas tres cadenas tiene como consecuencia

la ausencia total de esta proteína estructural vital de la membrana basal [24, 25].

Entre los signos habituales de la EBJ-H se encuentran la presencia de numerosas ampollas, erosiones y cicatrices atróficas en la piel, oncodistrofia (que provoca la destrucción total de las placas ungueales), quistes miliares, afección grave de las partes blandas de la cavidad bucal, lesiones hipoplásicas del esmalte de los dientes y caries. Un signo patognomónico de la EBJ-H es la presencia de una excesiva cantidad de tejido de granulación, de distribución simétrica, en la boca, la región central de la cara y la nariz, la región superior de la espalda, los huecos axilares y los pliegues ungueales. Entre las posibles complicaciones de esta enfermedad se encuentran anemia multifactorial intensa, retraso del crecimiento, erosiones y estenosis de las vías digestivas y afectación de las mucosas de las vías respiratorias superiores y del aparato genitourinario, los riñones, la parte externa de los ojos y, en raras ocasiones, las manos [26, 27]. La tasa de mortalidad de esta enfermedad es muy alta, en particular durante los primeros años de vida, como resultado del retraso del crecimiento, infecciones, neumonía y obstrucción laringotraqueal [28, 29].

Los subtipos EBJ-nH de la EB se deben a un conjunto de mutaciones heterocigóticas en los genes que codifican la laminina-332, o a mutaciones de parada homocigóticas [30], mutaciones de cambio de aminoácido o deleciones dentro del marco [31] en el gen COL17A1, que ocasiona la ausencia total o la reducción de la expresión del colágeno de tipo XVII, una proteína integrante de los filamentos de anclaje [32]. Los pacientes que padecen de EBJ-nH presentan ampollas de distribución generalizada, erosiones y costras en la piel, cicatrices atróficas, alopecia cicatricial, oncodistrofia o desprendimiento de las

uñas, lesiones hipoplásicas del esmalte de los dientes y caries. A diferencia de la EBJ-H, en estos pacientes las manifestaciones extracutáneas, excepto la estenosis laringotraqueal [33], son infrecuentes, y su esperanza de vida no suele afectarse.

Un subtipo muy infrecuente de EB juntural es la *EBJ con atresia pilórica* (EBJ-AP). Los pacientes que padecen esta enfermedad presentan ausencia genética de integrina $\alpha 6\beta 4$ funcional en los hemidesmosomas de las células epiteliales, las células de Schwann, los timocitos y los fibroblastos neuronales. Debido a la gravedad de la afectación cutánea y la presencia de afecciones extracutáneas (entre ellas, atresia pilórica y, en muchos casos, anomalías del aparato genitourinario), los niños que padecen EBJ-AP suelen fallecer en los primeros meses de vida. Recientemente se ha dado a conocer un nuevo subtipo, menos grave y no letal de esta enfermedad, causado por una mutación heterocigótica compuesta [34].



Figura 3: Radiografía simple en paciente con epidermólisis bullosa juntural y atresia pilórica.

EB distrófica

La EB distrófica (EBD) se produce por mutaciones en el gen COL7A, que codifica el colágeno de tipo VII, el principal componente de las fibrillas de anclaje de la membrana basal [35, 36]. En el gen COL7A1 pueden producirse innumerables tipos de mutaciones. En cada persona, las mutaciones y las combinaciones alélicas en este gen son específicas de su familia. Si bien la correlación fenotipo-genotipo es variable, el tipo de mutaciones y la ubicación del sitio donde éstas se producen en el gen COL7A1 permiten predecir la gravedad de las manifestaciones clínicas.

La EBD se clasifica en dos subtipos principales, dependiendo del tipo de herencia. Esta enfermedad se transmite, bien de forma autosómica dominante (EBDD), bien de forma autosómica recesiva (EBDR) [7]. Este último subtipo se subdivide en dos tipos: uno grave, la EBDR de Hallopeau-Siemens (EBDR-HS), y uno menos grave, la EBDR no Hallopeau-Siemens (EBDR-nHS).

Tabla 1.- Clasificación de la epidermólisis bullosa:

Tipos EB	Transmisión	Proteína	Gen	Cromosoma
SIMPLES				
<i>Localizadas</i>				
(manos-pies)	AD	K5, K14	KRT5,KRT14	12q11-q13
Weber-Cockayne				17q12-q21
<i>Generalizadas</i>				
EBS (Koebner)	AD	K5, K14		
EBS Herpetiforme (Dowling-Meara)	AD	K5, K14		
EBS con pigmentación moteada	AD	K5		
EBS con distrofia muscular	AR	Plectina	PLEC1	8q24
EBS superficial	AD			
JUNTURALES				
<i>Localizadas</i>				
Inversa	AR			
Acral	AR	Laminina 5		
Aparición tardía	AR			
<i>Generalizadas</i>				
Herlitz	AR	Laminina 5	LAMA 3 LAMB 3 LAM C2	18q11.2 1q32 1q25-q31
No Herlitz	AR	BP 180 Laminina 5	BPAG 2 LAMB 3	10q24.3 1q32
Con atresia pilórica	AR	Integrina A6β4	ITGA 6 ITGB 4	17q25 2q24-q31
DISTROFICAS				
<i>localizadas</i>				
Inversa	AR			
Acral	AR			
Pretibial	AD			
Centrípeta	AD			
<i>Generalizadas</i>				
RECESIVA	AR	Colágeno VII	COL7A1	3q21.1
Hallopeau-Siemens	AR	Colágeno VII		
No Hallopeau-Siemens	AR			
DOMINANTES				
EBD dominantes	AD	Colágeno VII		
EBD transitoria del recién nacido	AD			

Desde un punto de vista clínico, la EBDD se caracteriza por la aparición recurrente de ampollas, quistes miliares y cicatrices atróficas, en particular en las extremidades. En la mayoría de los pacientes con EBDD la afectación cutánea es generalizada. Las manifestaciones extracutáneas, excepto la afección esofágica son infrecuentes. El defecto genético que da lugar a la EBDD es la sustitución de la glicina en el dominio colagenoso de la cadena pro- α del homotrímero que codifica el colágeno de tipo VII, lo que a su vez desestabiliza la triple hélice [35]. Puesto que tanto los alelos anómalos como los normales se expresan por igual, el funcionamiento del 12,5% de las fibrillas de anclaje permanece intacto, a lo cual se debe el curso relativamente leve de la EBDD.

Los defectos genéticos como, por ejemplo, las mutaciones de cambio de aminoácido y las deleciones dentro del marco, presentes en los pacientes con los tipos más leves de EBDR no Hallopeau-Siemens, afectan el ensamblaje y la agregación de los polipéptidos de colágeno de tipo VII en las fibrillas de anclaje. Esto causa una reducción del número de fibrillas de anclaje o alteraciones morfológicas en la piel de estos pacientes. La terminación prematura de ambos alelos, que causa ausencia total del colágeno de tipo VII y de fibrillas de anclaje, es la causa de base de la EBDR-HS. La presencia generalizada de ampollas, erosiones, costras, cicatrices atróficas, oncodistrofia y desprendimiento de las uñas, pseudosindactilia mutilante en las manos y los pies [37], y contracturas en manos, pies, codos y rodillas que causan discapacidad funcional, son signos habituales de este tipo grave de EB. Las complicaciones extracutáneas son frecuentes en los pacientes con EBDRHS, entre las cuales se encuentran las afecciones gastrointestinales [38] y

urogenitales [39, 40], de la parte externa de los ojos [41], anemia crónica, retraso del desarrollo [42] y un riesgo muy elevado de cáncer de gran malignidad de células escamosas [43].

2.3. Características epidemiológicas de la epidermólisis bullosa hereditaria

Aún se sabe poco acerca de las características epidemiológicas de la epidermólisis bullosa y ello se debe a que no existen requisitos de obligado cumplimiento a nivel nacional para la declaración de enfermedades dermatológicas, excepto las consideradas transmisibles, como la sífilis.

En los Estados Unidos se logró obtener datos fiables sobre la prevalencia y la incidencia de la EB hereditaria tras la creación del Registro Nacional de EB en 1986 [43]. Este proyecto, financiado por los National Institutes of Health y ya con 21 años de existencia, tiene como objetivos principales la identificación, inclusión, registro y valoración de todos los pacientes con EB hereditaria, residentes en los Estados Unidos. Se utilizaron la búsqueda de casos y la recopilación de datos, aplicando rigurosamente principios epidemiológicos convencionales, y los datos fueron posteriormente analizados.

Antes del análisis de los datos recopilados por el NEBR, abundaban en la literatura médica algunas ideas erróneas sobre la EB. Estas ideas eran el resultado comprensible de las impresiones clínicas obtenidas por médicos que comunicaban su propia experiencia con un número limitado de pacientes con EB, la mayoría de ellos con formas graves de la enfermedad. Se pensaba, por ejemplo, que ciertas razas eran más propensas a padecer EB que otras, debido a los pocos casos comunicados en afroamericanos. Más tarde se comprobó que esto se debía a las grandes diferencias existentes en cuanto al grado de acceso a la atención sanitaria y, más importante aún, a la posibilidad de ser remitido a un dermatólogo o a un especialista en genética clínica, y no a

diferencias genéticas inherentes relativas a la propensión a padecer esta enfermedad. Otra creencia errónea era, por ejemplo, que la mayoría de los casos de EB juntural (EBJ) y EB distrófica recesiva (EBDR) correspondían a los subtipos de Herlitz (EBJ-H) y Hallopeau-Siemens (EBDR-HS), respectivamente, y que estos dos subtipos muy a menudo causaban la muerte en los primeros años de vida. También se pensaba que la EB simple (EBS) no era tan frecuente como hoy sabemos que es, debido a que sólo una minoría de los pacientes con EBS acudía al dermatólogo para el diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

Prevalencias estimadas

Antes de que se llevaran a cabo los análisis de los datos obtenidos en el estudio de la población del NEBR, los datos disponibles correspondían a cifras mucho menores de pacientes con EB procedentes de Escandinavia, Irlanda del Norte, Croacia, Japón y Columbia Británica. Los resultados de muchas de estas estimaciones diferían de forma considerable, debido, en parte, al tamaño más pequeño de las muestras utilizadas y al empleo de métodos mucho menos rigurosos de inclusión de los pacientes. En Noruega, las estimaciones de prevalencia en 1995 de la EBS (todos los tipos), la EBS-K y la EBS-WC fueron de 23 a 42, 1,4 a 6,9 y 14,5 a 20 por millón de habitantes, respectivamente, dependiendo de la manera en que se clasificaran los diferentes subtipos de EBS [44]. Por el contrario, entre 1962 y 1984, la prevalencia de EBS en Irlanda del Norte se calculó en alrededor de 28 por millón de habitantes [45]. En 1995, la prevalencia en Noruega de EBJ, EB distrófica, EBDR y EBDR-HS fue de aproximadamente 2, 10, 2.3 y 0.7 pacientes por millón de habitantes,

respectivamente [45]. En 1990, la prevalencia de EBDR-HS en Croacia se calculó en 9,6 por millón de habitantes [46]. En Japón, a partir de los datos obtenidos en encuestas realizadas en varios hospitales en 1983 a menos de 400 pacientes, se informó que la prevalencia de EBS, EBJ, EBDD y EBDR fue de 0.29 a 0.40, 0.015 a 0.020, 0.11 a 0.15 y 0.15 a 0.20 por millón de habitantes, respectivamente.

Probablemente la prevalencia estimada más fiable antes de la creación del NEBR fuera la de Columbia Británica, calculada a partir de los datos contenidos en un registro estatal de vigilancia sanitaria. En dicha población, Sybert y cols. calcularon que la prevalencia general de EB durante el período de 1952 a 1989 había sido de 9,9 por millón de habitantes [47].

Incidencias estimadas

En 1983 en Noruega se comunicó que las incidencias de los subtipos Koebner, Dowling-Meara y Weber-Cockayne de EB simple eran de 2, 1.7 y como mínimo 6 por millón de nacidos vivos, respectivamente. Entre 1965 y 1994, las incidencias de EBJ (todos los subtipos) y de EBJ de Herlitz en Noruega y Suecia se estimaron en 7 y 4.6 por millón de nacidos vivos y superior a 8 y a 7.1 por millón de nacidos vivos, respectivamente. Entre 1947 y 1994, la incidencia de EBDR se calculó en 5.6 por millón de nacidos vivos. En un informe publicado en Croacia en 1990, se dio a conocer que la incidencia de EBDR-HS era de 19.2 por millón de nacidos vivos (uno de cada 52.000). En Columbia Británica, la incidencia de EB (todos los tipos) durante el período de 1952 a 1989 se estimó en 17.9 por millón de nacidos vivos.

2.3.1.- Prevalencia e incidencia de cada tipo y subtipo de EB:

En la Tabla 2 se resumen los datos de prevalencia e incidencia de cada tipo y subtipo de EB en Estados Unidos. Estos datos se obtuvieron mediante análisis de aproximadamente 1.700 pacientes incluidos en el NEBR durante sus primeros 10 años de existencia. La prevalencia estimada se calculó teniendo en cuenta la cantidad de pacientes incluidos en el NEBR y que estaban aún vivos en 1990, con el objetivo de poder utilizar datos procedentes del censo realizado en Estados Unidos en 1990. La incidencia estimada se calculó a partir de los datos obtenidos en un periodo de cinco años, de 1986 a 1990. Debido a la gravedad de la EBJ y de la EBDR, y a la disponibilidad de pruebas de diagnóstico gratis para el NEBR, probablemente casi todos los pacientes que padecían estos dos tipos principales de EB fueron diagnosticados e incluidos en este proyecto en el periodo de 1986 a 1996. Asimismo, es probable que se haya incluido en este estudio a la mayoría de los pacientes afectados de EBDD, y la mayoría de los pacientes con subtipos más graves de EBS. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de la EBS localizada suelen ser relativamente leves y, por tanto, muchos de estos pacientes no fueron detectados por el NEBR. Al calcular la prevalencia y la incidencia de la EBS, se partió de la hipótesis de que no más del 5% al 10% de todos los pacientes afectados de EBS habrían sido incluidos en el NEBR. Incluso esta cifra podría ser demasiado exagerada acerca del éxito de la inclusión de pacientes con este tipo importante de EB.

Tabla II.- Prevalencia e incidencia de la epidermólisis bullosa:

Tipos de EB	Prevalencia^a	Incidencia^b
EBS (todos subtipos)	4,60	10,75
EBS-WC	3,14	6,81
EBS, otro tipo	1,46	3,95
EBJ (todos subtipos)	0,44	2,04
EBJ-H	0,07	<0,41
EBJ, otro tipo	0,37	<2,04
EBDD	0,99	2,86
EBDR (todos subtipos)	0,92	2,04
EBDR-HS	0,42	0,41
EBDR, otro tipo	0,49	1,63
EB, (todos tipos)	8,22	19,60

La prevalencia global de la EB hereditaria en la población estadounidense fue de 8,22 por millón de habitantes. Las prevalencias de EBS, EBJ, EBDD y EBDR fueron de 10.75, 2.04, 2.86 y 2.04 por millón de habitantes, respectivamente. Las prevalencias de los principales subtipos se presentan en la Tabla 2. Hay que señalar que la cantidad de pacientes que padecían alguno de los principales subtipos de EB era tan pequeña que resultó imposible obtener valores fiables de prevalencia. Asimismo, la incidencia de EB hereditaria en la población estadounidense fue de 19.60. Sin embargo, estos datos están basados en el supuesto de haber captado prácticamente a todos los pacientes con EB, independientemente del subtipo, en la población del estudio del NEBR.

En varios otros países se han creado también registros de EB, entre ellos Italia [48], Alemania, Escocia [49] y Australia. En el año 2002, el registro italiano contenía 697 casos clasificables, la mayoría de los cuales padecían los tipos no simples de la enfermedad (EBJ, 10%; EB distrófica, 62%). En la cohorte de pacientes italianos, la prevalencia y la incidencia globales durante el

período de 1997 a 1998 fue de 10.1 por millón de habitantes y de 20.1 por millón de nacidos vivos, respectivamente.

Si bien la distribución de los tipos de EB incluidos en el registro italiano difiere de la de Estados Unidos, las tasas generales son notablemente similares a las informadas por el NEBR, lo cual indica que probablemente los datos obtenidos en Estados Unidos son comparables a los obtenidos al menos en Europa occidental, y probablemente en el resto del mundo. Sin embargo, es posible que en otras cohortes o en otros países estos resultados sean diferentes. Existen varias razones que podrían explicar dichas posibles diferencias. En primer lugar, la precisión de los datos epidemiológicos depende en gran medida del éxito del diagnóstico de los pacientes. Cuando la búsqueda de casos no se realiza de forma extremadamente rigurosa, los valores de la prevalencia y la incidencia estimadas serán más bajos, y será mayor la cantidad de errores de diagnóstico y de clasificación. En segundo lugar, la prevalencia y la incidencia estimadas se verán afectadas también por las limitaciones de los pacientes para tener acceso a los registros o a sus médicos. Si bien la mayoría de los niños que presentan EB todavía están cubiertos por los servicios sanitarios financiados, al menos parcialmente, con fondos federales o estatales, no sucede lo mismo con los adultos. En tercer lugar, la inclusión de pacientes con EB suele depender del subtipo que padezcan. Los pacientes con los tipos autosómicos dominantes leves de EB, como por ejemplo la EBS-WC, en ocasiones no acuden al médico porque saben que no existe un tratamiento eficaz, según la experiencia de otros miembros de la familia que también han padecido la enfermedad. Como resultado de ello, estos casos no serán diagnosticados y, por tanto, no se incluirán en los cálculos de

prevalencia de la EB. Por otra parte, en países más pequeños se encontrarán tasas de prevalencia e incidencia mucho más altas, porque en ellos, por diversas razones culturales o económicas, la consanguinidad suele ser mucho más frecuente que en otros países.

2.4. Diagnóstico:

2.4.1. Estudios histopatológicos habituales para el diagnóstico de la epidermólisis bullosa:

Por lo general, la microscopia óptica de uso habitual es de escasa utilidad para el diagnóstico de la EB hereditaria, pues en la mayoría de los casos, es decir, en los casos de EB juntural y EB distrófica, el único hallazgo es una ampolla «subepidérmica» paucicelular. Por tanto, no se suelen realizar exploraciones con microscopia óptica de forma habitual a menos que se desee establecer el diagnóstico diferencial con otras enfermedades ampollosas, como la infección intrauterina por herpes simple. Aunque a veces es posible observar el despegamiento intraepidérmico secundario a la citólisis de los queratinocitos basales en muestras histopatológicas obtenidas de pacientes con EBS, en otras ocasiones podría resultar difícil diferenciar una EBS de una enfermedad ampollosa de otro tipo, ya que sólo se producen focos de formación de ampollas en la zona situada justo por encima de los queratinocitos de la membrana basal, quedando sólo mínimos restos en la membrana basal. Con el microscopio óptico es difícil o imposible visualizar estos fragmentos. Asimismo, si bien la formación de separaciones en la parte superior de la epidermis podría indicar la presencia de un subtipo de EBS suprabasal, conviene realizar el diagnóstico diferencial con otras enfermedades. Para poder determinar de forma precisa la localización anatómica de las ampollas, será necesario realizar una cartografía antigénica mediante inmunofluorescencia o microscopia electrónica.

2.4.2.- Características de la microscopia óptica en las EB hereditarias:

EB simple

Este grupo principal de EB se caracteriza por la presencia de despegamientos intraepidérmicos, habitualmente en la capa celular basal de la epidermis. La separación del tejido puede producirse en una zona tan profunda de la epidermis que en los exámenes de cortes de tejido incluidos en parafina podría parecer que se trata de una separación «subepidérmica» y, por tanto, confundirse con una EBJ o con una EBD. Sin embargo, en algunos casos, en el examen de cortes finos incluidos en plástico se observan fragmentos de queratinocitos basales en la base de la ampolla, donde se observa también la membrana basal, que es PAS positiva. Otro indicio de la localización intraepidérmica de las ampollas es la presencia de citólisis [50,51,52] o de vacuolas en los queratinocitos basales en la zona adyacente a la ampolla. En el caso del subtipo EBS de Dowling-Meara, a veces se observan algunos eosinófilos en la dermis papilar, aunque éste no es un signo específico de este subtipo. En la EB simple con distrofia muscular, las ampollas siempre aparecen en la zona situada justo por encima de los hemidesmosomas. En la EBS superficial se ha descrito separación en la zona subcorneal, que puede simular un síndrome de la piel escaldada [53]. Se ha descrito otro subtipo infrecuente en el que las células basales se observan hipertróficas y disqueratósicas y en cuyos citoplasmas se encuentran agrupaciones eosinófilas y alguna mitosis atípica [54].

EB juntural

Los subtipos de EB juntural se caracterizan por la formación de ampollas paucicelulares de localización «subepidérmica» y en cuya base se observa la membrana basal PAS positiva. Cuando existe atrofia cutánea, se produce un adelgazamiento de la epidermis y aplanamiento de las crestas interpapilares. En las áreas cicatriciales, se puede observar fibrosis dérmica [55, 56].

EB distrófica

En la piel de los pacientes con EB distrófica se observan ampollas «subepidérmicas» paucicelulares. En raros casos se ha observado también una escasa cantidad de eosinófilos en la dermis. A menudo se observan, además, cicatrices dérmicas superficiales y quistes miliares. En la parte superior de la ampolla se observa la membrana basal PAS positiva [55, 56].

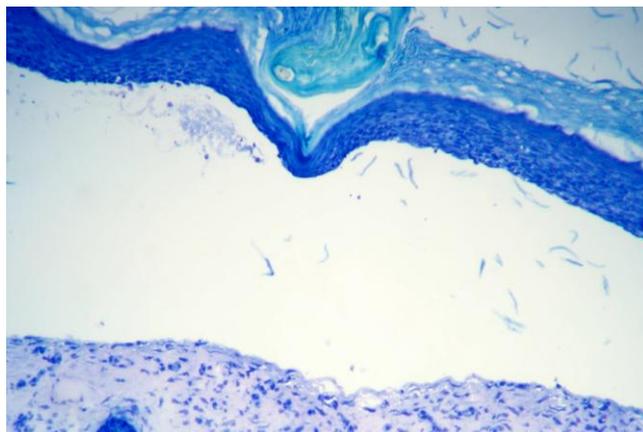


Figura 4: Microscopía óptica de una biopsia cutánea de EBD.

Se aprecia la separación entre epidérmico-dérmica con una gran ampolla y ausencia de complejos de anclaje.

2.4.3.- Cartografía antigénica:

La cartografía antigénica (CA) es, en esencia, un método inmunohistoquímico para determinar la expresión de antígenos (principalmente proteínas estructurales) en muestras de tejidos examinadas, por lo general, con microscopía por inmunofluorescencia. En la piel de pacientes con epidermolísis bullosa (EB) hereditaria, se determina la presencia, la ausencia, o la disminución de la expresión de proteínas estructurales de los queratinocitos o de la unión dermoepidérmica, así como su distribución en una ampolla de formación espontánea o en una separación creada intencionalmente [57, 58]. Así puede determinarse el sitio de formación de la ampolla (epidermolítica, en la lámina lúcida o «juntural» o dermolítica). La CA constituye la principal prueba diagnóstica no molecular de la EB y como los resultados se obtienen en un plazo de medio día, esta prueba aporta en poco tiempo la información necesaria para determinar cuál de los tipos principales de EB presenta el paciente y el pronóstico de la evolución y el desenlace clínico de la enfermedad [59]. Los resultados de esta prueba sirven para realizar análisis de mutaciones, ya que permiten precisar cuáles de los genes que codifican las proteínas estructurales de los queratinocitos o de la zona de la membrana basal de la unión dermoepidérmica deben estudiarse [60, 61].

2.4.4.- Microscopia electrónica en el diagnóstico de la epidermólisis bullosa:

La microscopia electrónica o, más específicamente, la microscopia electrónica de transmisión (MET), ha desempeñado un papel extraordinario en la consolidación de la clasificación moderna de la epidermólisis bullosa (EB). A principios de la década de 1960, Pearson [62] fue el primero en demostrar que dos de los tipos de EB ya reconocidos (la EB simple y la EB distrófica) se caracterizaban por la formación de ampollas en sitios claramente observables y reproducibles mediante MET. Otros autores [63, 64, 65] confirmaron que la localización de la separación en la piel en varios subtipos de EB distrófica se encontraba sistemáticamente por debajo de la lámina densa de la unión dermoepidérmica, y describieron la existencia de un posible defecto primario en la formación de las fibrillas de anclaje. También se comprobó que en el tercer tipo principal de EB identificado, la EB juntural (conocida entonces como *EB letal*), la separación del tejido se producía en otro plano ultraestructural específico, la lámina lúcida [66, 67, 68, 69]. Además, otro componente del «complejo de anclaje», conocido como hemidesmosomas, presentaba también características ultraestructurales anómalas. Estos importantes signos ultraestructurales se han explicado con más detalle en varios estudios publicados [70, 71, 72].

Para poder entender la importancia de cada uno de los lugares ultraestructurales de localización de la separación del tejido en el diagnóstico de la EB, es importante conocer con detalle las características ultraestructurales de la unión dermoepidérmica, en particular de la zona donde se encuentran los complejos de anclaje. Independientemente de la calidad de

la conservación del tejido o de otros de los pasos necesarios para garantizar un análisis adecuado mediante MET, un inconveniente importante de la MET es que sólo puede ofrecer imágenes bidimensionales de cortes extremadamente finos de tejido fijado, lo cual podría, en el mejor de los casos, ser una representación imprecisa del estado real de la piel viva. Sin embargo, como en el diagnóstico histopatológico, un especialista en microscopía experimentado debería poder distinguir lo «normal» de lo «anormal» y buscar otros indicios que le permitan llegar a conclusiones útiles para la realización de un diagnóstico preciso.

EB simple:

Es el subtipo más frecuente de esta enfermedad, en la EB simple de Weber-Cockayne las ampollas se forman en los queratinocitos basales, por debajo de los núcleos de las células [73, 74], aunque en algunos casos en los cortes se observa que la afección abarca una zona más extensa que se extiende hacia la epidermis. La presencia de cúmulos o agregados de filamentos de queratina es un signo patognomónico del subtipo EB simple de Dowling-Meara [75, 76, 77]. La inmunoMET ha demostrado claramente que la presencia de cúmulos anómalos, se marca preferentemente para las queratinas K5 y K14 [78]. En el tipo de EB simple con distrofia muscular, causada por déficit de plectina, las primeras alteraciones se producen en una zona muy profunda en las células basales, por encima de la membrana plasmática basal y de las placas de hemidesmosomas asociadas [79, 80, 81, 82]. La EB simple superficial se caracteriza por la formación de separaciones en la zona superior de la epidermis, en la unión entre los estratos granuloso y córneo [83]. En el

subtipo infrecuente de EB simple autosómica recesiva generalizada, habitualmente causado por mutaciones de parada homocigóticas en la queratina-14, los filamentos de queratina de las células basales son extremadamente escasos o indetectables [84, 85]. La EB simple asociada a pigmentación moteada se caracteriza por la presencia de cúmulos anómalos de melanosomas y anomalías en la red de filamentos de queratina [86, 87].

EB juntural:

En todos los pacientes con EB juntural (EBJ), independientemente de los genes afectados o de las características específicas de las mutaciones de fondo, los despegamientos se producen en la zona de la lámina lúcida, entre la membrana plasmática de las células basales y la lámina densa situada por debajo de ésta. Existen varios subtipos de EBJ: la EBJ de Herlitz, la EBJ no Herlitz y la EBJ con atresia pilórica. En el primer y tercer subtipo, las placas de hemidesmosomas suelen ser muy pequeñas [66, 67, 68, 69, 71, 72, 88], y suele estar debilitada la unión entre éstas y los filamentos de queratina intermedios [89]. En el caso de la EBJ no Herlitz, el tamaño de los hemidesmosomas y la cantidad de éstos son variables, y su aspecto puede ser normal [67, 69, 90]. Conviene recordar que los pacientes con EBJ no Herlitz causada por mutaciones en el colágeno de tipo XVII, pueden presentar ampollas originadas en la zona inferior de la epidermis [91, 92], similar a lo que ocurre en los pacientes con EB simple. Este mismo lugar de localización del despegamiento suele observarse en los pacientes con EBJ con atresia pilórica, causada por mutaciones en la integrina $\alpha 6\beta 4$.

EB distrófica:

En este tipo principal de EB, la separación se produce siempre inmediatamente por debajo de la lámina densa. La diferencia entre el lugar de formación de las ampollas en la EB distrófica (EBD) y en la EBJ es de menos de 1 micrómetro, lo que queda muy alejado del poder de resolución de un microscopio óptico. En el caso del subtipo EBD autosómica recesiva generalizada grave, a menudo denominada con el epónimo de «Hallopeau-Siemens», las fibrillas de anclaje no afectadas no suelen detectarse [64, 65]. Sin embargo, las fibrillas de anclaje están presentes en una pequeña cantidad de pacientes con los subtipos dominante y recesivo más leves de EBD [65]. En el tipo de EBD conocida como «dermatosis bullosa transitoria de la infancia», se observan inclusiones de apariencia característica en las células epidérmicas basales [73,93], las cuales se han detectado mediante análisis inmunocitoquímicos utilizados para teñir el colágeno tipo VII, que es el principal constituyente de las fibrillas de anclaje.

2.4.5.- Ventajas e inconvenientes de la microscopia electrónica para el diagnóstico de la EB:

Durante muchos años, la MET ha sido la prueba de elección para el diagnóstico de la EB, y ha jugado un papel importante en la elaboración de la clasificación moderna de esta enfermedad [94] y en el descubrimiento de nuevas enfermedades, como el déficit de placofilina-1, recientemente reconocida como un subtipo de EB. Esta prueba continúa ocupando un lugar de privilegio para determinar la localización exacta de la separación del tejido y, además, es la que mejor permite realizar una exploración exhaustiva de las células y sus organelos (p. ej.: mitocondrias, retículo endoplasmático, gránulos laminares) y otros componentes subcelulares (p. ej.: tonofilamentos, hemidesmosomas, fibrillas de anclaje y membrana plasmática). Sin embargo, la disponibilidad de anticuerpos monoclonales y policlonales bien caracterizados, que permiten reconocer los componentes principales de la unión dermoepidérmica y otras moléculas intraepidérmicas que intervienen en la patogenia y el diagnóstico de la EB, ha traído como resultado que la inmunofluorescencia indirecta haya reemplazado, en gran medida, a la MET como medio principal de diagnóstico de la EB.

No obstante, ha quedado establecido [94] que la MET diagnóstica debe estar disponible al menos en algunos centros de referencia, pues podría ser necesaria para poder realizar el diagnóstico en casos más complejos. Una última advertencia: más importante que el aparato utilizado para esta prueba es la habilidad y, en particular, la experiencia del especialista en microscopia electrónica que analiza las muestras.

La MET ha desempeñado un papel fundamental en el diagnóstico de la EB, y continuará haciéndolo a pesar de que otros métodos de diagnóstico han ido ocupando un lugar cada vez más prominente en el laboratorio.

2.4.6.- Forma no habitual de herencia: isodisomía uniparental (IDUP):

La IDUP (isodisomía uniparental o meroisodisomía) asociada a homocigosidad de alelos recesivos se ha ido aceptando cada vez más como la base molecular de varias afecciones autosómicas recesivas [95]. De hecho, se han comunicado más de 35 casos de enfermedades recesivas causadas por IDUP [96]. Hasta hoy se han publicado seis casos de IDUP en pacientes con epidermólisis bullosa, cuatro de los cuales padecen EBJ, por alteraciones en el gen LAMB3 en tres casos y en el LAMC2 en uno [97, 98, 99, 100]. En otro estudio, se demostró IDUP en pacientes con EBS letal con atresia pilórica (AP), en quienes estaba afectado el gen PLEC1. En publicaciones recientes se ha informado un fenotipo de EBDR-HS debido a IDUP en el gen COL7A1 [101, 102].

La heteroisodisomía uniparental consiste en la presencia de un par de cromosomas homólogos, mientras que *isodisomía uniparental* (IDUP) se refiere a la presencia de dos copias idénticas de un homólogo solamente, y la meroisodisomía (isodisomía parcial) consiste en una mezcla de ambas afecciones [103]. Es decir, en la IDUP se transmiten al hijo dos copias de una mutación recesiva de uno de sus padres que es portador heterocigótico.

La posible asociación entre la IDUP y la epidermólisis bullosa tiene importantes repercusiones en la búsqueda sistemática de mutaciones y en la precisión del consejo genético. Deben realizarse análisis moleculares sistemáticos a ambos padres de todo niño que padezca una enfermedad autosómica recesiva. En estos casos, los padres suelen ser portadores asintomáticos y el riesgo de recurrencia en embarazos posteriores es del 25%. La única excepción es la IDUP, en la cual el hijo hereda ambos homólogos de

un par de cromosomas de uno de los padres solamente. En embarazos posteriores suelen cumplirse los principios mendelianos. La mayoría de estos casos parecen estar asociados al embarazo en edades avanzadas. La localización de mutaciones *de novo* que no están presentes en la línea germinal de uno de los padres podría reducir de forma importante, aunque sin llegar a eliminar, el riesgo de recurrencia.

Cuando el niño es homocigótico para una determinada mutación y en uno de los padres el mismo locus es normal, los análisis de haplotipos de dicho locus genético basados en la herencia de polimorfismos intragénicos, suelen ser útiles para determinar el origen del segundo alelo mutante del niño. Para determinar la naturaleza de la disomía y la cantidad de cromosoma que está duplicada en el niño, conviene genotipar marcadores microsatélites que abarquen todo el cromosoma. Los marcadores microsatélites pueden amplificarse con oligonucleótidos marcados con carboxifluoresceína (FAM-6) e investigarse fácilmente con un analizador genético ABI. En casos de maternidad dudosa (aunque éstos son infrecuentes) o de paternidad dudosa deben realizarse análisis confirmatorios mediante un conjunto de marcadores microsatélites ligados a diversos cromosomas, para detectar cualquier discrepancia existente en la segregación de los alelos maternos o paternos en el niño afectado.

La IDUP puede dar lugar también a fenotipos específicos, según el origen parental de los cromosomas. A éste fenómeno se le denomina sellado genómico. La modificación epigenética de un gen específico o de un grupo de genes dado determina de cuál de los progenitores proviene cierta expresión genética específica, de manera que se altera la transcripción genética y en el

embrión se expresa sólo una copia heredada del gen o los genes sellados [104]. Las tres anomalías fenotípicas frecuentemente asociadas a la IDUP en el caso de los cromosomas sellados son el retraso del crecimiento intrauterino, el retraso madurativo y la talla baja [105, 106].

Hasta ahora no se han publicado casos de genes sellados asociados a EB e IDUP. Los mecanismos subyacentes de la IDUP son diversos. Entre ellos se encuentran la complementación de gametos (ausencia de reducción durante la meiosis, que da lugar a un gameto diploide, con dos copias de un cromosoma, fertilizado por un gameto nulósómico, carente del mismo cromosoma), rescate trisómico (pérdida de cromosomas en la trisomía), rescate monosómico (duplicación de cromosomas en la monosomía) y error posterior a la fecundación [107, 108].

2.4.7.- Mosaicismo genético en la epidermólisis bullosa:

El *mosaicismo genético* consiste en la presencia en un organismo de dos o más poblaciones celulares genéticamente diferentes derivadas de un único cigoto homogéneo. Así, un mosaico no es lo mismo que una quimera (que es un organismo formado por dos poblaciones celulares genéticamente diferentes procedentes de cigotos *distintos*) [109]. Pueden aparecer poblaciones celulares heterogéneas mosaico después de la fecundación, durante la embriogénesis, el desarrollo fetal o el período posnatal, como resultado de anomalías cromosómicas (p. ej.: aneuploidía, poliploidía) o mutaciones en un sólo gen. El momento del desarrollo embrionario en el que se produce la mutación determinará cuál de los tejidos y qué cantidad de células de éste portarán la modificación. Sólo se afecta el tejido derivado de la célula precursora en la que se ha producido la modificación, y esto determina la magnitud de las manifestaciones del cambio en el tejido endodérmico, ectodérmico o mesodérmico [110, 111]. Por ello, las mutaciones que se producen en las primeras etapas del desarrollo embrionario derivarán en afecciones cutáneas de mayor magnitud e incrementará las probabilidades de afectación de otros órganos. El mosaicismo, por tanto, explica la distribución asimétrica de las lesiones, la ausencia de afección difusa de todo un órgano, la existencia de gemelos idénticos discordantes, la aparición esporádica y el hecho de que algunos de los hijos de una persona afectada no presentan afecciones [112].

En teoría, una mutación postcigótica puede ocurrir en las células gonadales o en las somáticas; es decir, el mosaicismo puede ser de la línea

germinal o somática. El mosaicismo de la línea germinal supone la presunta transmisión a los descendientes, ya que el tejido del que derivan los gametos es también un mosaico. Típicamente, tales alteraciones genéticas se producen *de novo* y suponen la transformación de células normales en células mutantes («mosaicismo primario»). Por otro lado, en el «mosaicismo revertiente» una mutación hereditaria causante de enfermedades puede corregirse mediante una segunda alteración genética, con lo cual se restaura, de forma parcial o total, la funcionalidad del gen en cuestión en las llamadas células «revertientes». La corrección de una célula precursora podría dar lugar, en este caso, a una reparación permanente.

2.4.8.- El mosaicismo revertiente en la epidermólisis bullosa:

En numerosas enfermedades genéticas se ha detectado mosaicismo revertiente, entre ellas la tirosemia tipo I, el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi, el síndrome de Wiskott- Aldrich, la inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X, el déficit de adenosina desaminasa y la epidermólisis bullosa [113]. Por ello, se retransforman diversos tipos de células como los hepatocitos, los linfocitos y, en la EB, los queratinocitos. En el caso de la EB, se ha documentado en varios estudios la presencia de rasgos de mosaicismo, lo cual ha contribuido de forma importante a la caracterización de la patogenia y la paragenética del mosaicismo y la reversión molecular.

En un estudio innovador realizado por Jonkman [114], se documentó por primera vez el mosaicismo revertiente en la EB en un paciente con EBJ-nH. El probando fue un heterocigoto compuesto para dos mutaciones de truncamiento en el gen COL17A1, a saber, la mutación en R1226X (terminadora en el alelo paterno) y la mutación en 1706delA (cambio de marco de lectura en el alelo materno). La reexpresión de BP180 en los queratinocitos se produjo por una conversión génica mitótica del gen COL17A1 en el alelo materno; es decir, que el sitio donde se encontraba la mutación en el alelo materno fue reparado por la secuencia normal del alelo paterno, mediante entrecruzamiento en las células somáticas precursoras. El gen paterno R1226X se mantuvo presente en todas las muestras de células. Conviene señalar que esto logró evitar la formación de ampollas a pesar de que la reversión de los queratinocitos de la membrana basal no había sido de más del 50% en las zonas de piel carente de signos patológicos en las que se había reexpresado el colágeno tipo XVII. Los cúmulos positivos encontrados se interpretaron como correspondientes a la

presencia de células procedentes de las divisiones de las células precursoras revertientes, cuyo índice de corrección parece haber sido suficiente para normalizar el funcionamiento de la piel.

El mosaicismo revertiente se ha documentado también como causa de la mejora frecuentemente observada con el paso del tiempo en los pacientes con EBS-DM, bien por acumulación en el tiempo de múltiples reversiones beneficiosas, bien por reemplazo de las células mutadas por células revertientes bajo una presión selectiva adecuada, en este caso la formación de ampollas [115]. La mejora de una enfermedad hereditaria con el transcurso del tiempo probablemente dependa de las transformaciones beneficiosas que se produzcan en las células precursoras al reexpresar la proteína afectada durante el proceso de competencia con las células progenitoras mutadas. Otras mutaciones en otros genes o tipos de células que no son beneficiosas para la célula podrían simplemente perderse [113]. Como resultado de ello, es posible que los fibroblastos y las células precursoras hematopoyéticas en un paciente con un tipo revertiente de EB también contengan mutaciones revertientes. Sin embargo, debido a que estas células, a diferencia de los queratinocitos, no expresan componentes de la membrana basal, como por ejemplo el colágeno tipo XVII, no están sujetas a la selección natural. Por ello, una mutación revertiente en los fibroblastos y en las células sanguíneas, que son importantes fuentes de ADN para los análisis moleculares, pueden perderse con el tiempo.

Se puede encontrar un ejemplo de la importancia de una presión selectiva determinada para el mantenimiento de las reversiones genéticas beneficiosas en la hiperqueratosis epidermolítica, una enfermedad hereditaria de la piel asociada a afectación del tejido suprabasal por mutaciones en la

queratina 10. Las células precursoras mutadas de la capa basal podrían no resultar afectadas por la destrucción y, por ello, no recibirán estímulos de ninguna «presión correctora». En otras palabras, dado que las células precursoras pueden encontrarse en el folículo piloso, en la zona interfolicular de la dermis y en las glándulas sebáceas, la diseminación de las células precursoras revertientes probablemente suponga la destrucción también de las células precursoras de localización más profunda. Esto favorecería el mantenimiento de las células precursoras corregidas en la mayoría de los tipos de EB asociados a alteraciones de la zona de la membrana basal.

En 2005, Pasmooij y cols. [115] realizaron un estudio en dos probandos heterocigotos compuestos no emparentados, que padecían EBJ-nH autosómica recesiva y que presentaban diversas zonas de piel con funcionalidad restaurada. Estas zonas de reversión se mantuvieron sanas durante toda su vida y no se expandieron. Como las células precursoras revertientes no parecían estar sometidas a los efectos de la selección natural (para diseminarse), los autores concluyeron que las mutaciones correctoras asociadas a la presencia de zonas de piel sana de decenas de centímetros cuadrados de extensión se produjeron durante la embriogénesis. Las investigaciones genéticas permitieron determinar que en estos pacientes habían ocurrido diversas reversiones somáticas de las mutaciones patógenas del gen COL17A1. Además, las mutaciones heredadas, tanto por la línea materna como por la paterna, se revirtieron al menos una vez como resultado de diversos procesos de reversión.

Recientemente, Pasmooij y cols. [113] observaron de nuevo este fenómeno en dos probandos con EBJ-nH no emparentados. En ambos, los

análisis del ADN del gen LAMB3 revelaron varias mutaciones supresoras intragénicas diferentes en los queratinocitos revertientes, las cuales corrigieron la misma mutación de la línea germinal c.628G→A; pE210K. La mutación c.628G→A provocó la sustitución de un aminoácido en el extremo N-terminal globular del brazo corto de la cadena beta3 de la laminina-332, que se considera de vital importancia para la asociación entre la laminina-332 y otros componentes estructurales de la zona de la membrana basal. En estos casos, la mutación probablemente sería la causa de un cambio de polaridad que afectaría a las interacciones entre las proteínas de la laminina-332, lo que reduciría la adherencia entre epidermis y dermis en estos pacientes. Sin embargo, se observó un efecto aún más profundo en el empalme del ARNm, debido a que el cambio del nucleótido 628 se produjo en la secuencia consenso en el sitio de empalme 5', lo que generó cuatro transcritos aberrantes adicionales.

Si bien ambos probandos presentaban una extrema disminución de la expresión de la laminina-332 en la piel afectada, en el paciente 1 las diversas mutaciones supresoras intra-génicas somáticas compensadoras se asociaron, desde un punto de vista fenotípico, al hecho de que los signos clínicos de la enfermedad mejoraron de forma progresiva en parte de la piel de la pierna izquierda. En esta parte del cuerpo con piel previamente afectada, la expresión de laminina-332 se normalizó completamente. El paciente 2 presentaba varias zonas revertientes en brazos, hombros y tórax. Cabe señalar que en el paciente 1 la zona de piel revertiente aumentó de tamaño, mientras que en el paciente 2 no se produjo expansión de la zona de piel sana. La diferencia de expresión fenotípica en ambos probandos contribuyó a un posible aumento en

la cantidad de laminina-332 producida en las células afectadas del paciente 2, porque en el paciente 1 un alelo afectado por una mutación de parada no contribuía a la producción de laminina-332. Por ello, la expansión de los queratinocitos revertidos bajo presión selectiva podría haber sido más fácil en el paciente 1 que en el paciente 2, debido a que las células afectadas son menos capaces de competir.

Según estos datos, en una misma persona pueden producirse múltiples reversiones. Los autores del estudio concluyeron que la presencia de diversas mutaciones correctoras en el mismo paciente implica que no existe un sólo mecanismo favorito para la corrección de una mutación dada. Además, se pensaba que el mosaicismo revertiente *in vivo* era algo poco frecuente, pero estudios recientes han indicado que probablemente se produzca con mayor frecuencia de lo estimado. Esto podría deberse a un aumento de la tasa global de mutaciones a causa de una acumulación de metabolitos mutágenos, por exposición a radiaciones (manifestada por las características mutaciones por transición C→T y G→A causadas por rayos ultravioletas), puntos de alta sensibilidad a las mutaciones o un defecto genético que afecta el mantenimiento de la estabilidad del genoma (p. ej.: inactivación de un gen cuidador) [113, 116]. Por otra parte, como los signos de mosaicismo pueden estar presentes tanto en zonas de piel aparentemente sana como en zonas afectadas, es probable que se pase por alto fácilmente la reversión y que su frecuencia sea mayor de lo que se cree.

Por último, es evidente que para lograr la mejoría clínica no es necesario que la reversión se produzca en todas las células afectadas, como demuestra la presencia de interrupciones en las zonas de tinción inmunohistoquímica del

colágeno tipo XVII de la membrana basal dermoepidérmica en muestras obtenidas por biopsia de piel aparentemente sana de pacientes con EBJ-nH. Esto plantea la posibilidad de que pueda usarse la citoterapia revertiente en pacientes con EB que presentan mosaicismo, mediante queratinocitos autógenos corregidos de forma natural, con lo que se evita la fase de corrección genética recombinante.

Se ha documentado también otra forma de manifestación del mosaicismo somático, que consiste en la presencia de lesiones cutáneas a lo largo de las líneas de Blaschko, en forma de S o de V, en espiral, veteadas, o lineales y que no siguen el trayecto de ninguna estructura nerviosa, vascular o linfática ni los dermatomas cutáneos. Se considera que siguen el trayecto dorsoventral del neuroectodermo y que se originan en la cresta neural durante la embriogénesis. Este tipo de distribución de las lesiones cutáneas se ha atribuido a dos tipos de mosaicismo [111]. En el tipo 1, se observan zonas de piel afectada de distribución lineal rodeadas de piel sana. El mosaicismo tipo 2 se manifiesta en enfermedades autosómicas dominantes, que muestran una afectación cutánea difusa característica de la enfermedad hereditaria en cuestión (que corresponde a un estado heterocigótico) pero acompañadas de zonas lineales de exacerbación de la afección cutánea. Estas zonas siguen el trayecto de las líneas de Blaschko y revelan un estado homocigótico, con disminución de la heterocigosidad o un estado hemicigótico debido a mutaciones causantes de pérdida de alelos normales. En la EB, sin embargo, no se han demostrado dichas correlaciones. No obstante, en un paciente con mosaicismo tipo 2 y enfermedad de Hailey-Hailey, se observó pérdida del alelo paterno y duplicación del alelo materno mutado, probablemente debido a

recombinación mitótica postcigótica [117]. Esta pérdida postcigótica del alelo normal correspondiente en un embrión heterocigótico por entrecruzamiento somático podría dar lugar a dos células hijas homocigóticas para el alelo mutado o para el alelo normal (recombinación somática/postcigótica) [118].

Por último, Schuilenga-Hut y cols. [119] publicaron el caso de un paciente con EBS recesiva, que era homocigótico para una mutación del sitio de empalme KRT 14 (1842-2A → C). La mutación de la línea germinal dio lugar a diversos transcritos aberrantes portadores de codones de terminación prematura, por lo que se formaron proteínas K14 truncadas. Los queratinocitos de la membrana basal de la piel y los obtenidos por cultivo de tejido carecían de K14^{-/-}. Resulta interesante que el cultivo de una nueva muestra de piel obtenida por biopsia del paciente con déficit de K14^{-/-} reveló la presencia de queratinocitos que espontáneamente expresaban la proteína K14. Los análisis inmunohistoquímicos y por microscopía electrónica de esta muestra de piel revelaron, además, la expresión híbrida de la K14 y la reaparición de filamentos intermedios en los queratinocitos de la membrana basal. Por otra parte, en los análisis de inmunotransferencia se encontró un polipéptido K14 revertiente de peso molecular aparentemente normal.

Los análisis del ARNm KRT14 de los queratinocitos con expresión de K14 obtenidos de muestras de piel mosaico revelaron la presencia de un transcrito adicional (1844T→T, 1845delta6) que codifica un polipéptido K14 anómalo con una delección de cambio del marco de lectura, doble residual exclusiva y un cambio de aminoácido. Este mosaicismo revertiente parcial justifica la distribución de la tinción con anticuerpos y la reaparición de filamentos intermedios, aunque esta semifuncionalidad impidió la reversión del

fenotipo clínico. Un segundo factor somático modulador en el genoma que afecta el procesamiento postranscripcional del preARNm K14 («edición del ARNm») se consideró como posible causa de este fenómeno. En la edición del ARNm puede producirse inserción o delección de nucleótidos, por acción enzimática, o sustituciones de nucleótidos en el ARN [109]. Por tanto, la secuencia codificadora está alterada con respecto a la que se formaría a partir de la información contenida en la plantilla genómica.

2.4.9.- Mosaicismo y genoterapia natural:

La terapia génica natural consiste en el rescate de una mutación causante de enfermedad mediante un fenómeno genético secundario que se produce de forma espontánea. Esta corrección puede dar lugar a un patrón mosaico cuando están afectadas solamente subpoblaciones de componentes celulares. Cuando el rescate se produce en las células de la línea germinal en las que ha ocurrido una mutación, el alelo revertiente podría transmitirse también a la descendencia, que no expresarían este rasgo o lo expresarían de forma leve.

Hay casos de EB distrófica en los que un exón que contiene una mutación de parada o de cambio del marco de lectura, es cortado del ARNm del colágeno tipo VII, de forma espontánea, o por activación de un potenciador del empalme [109]. El desempalme del exón portador de la mutación restaura el marco de lectura y con ello se rescata parcialmente la transcripción, lo cual deriva en la expresión de una proteína truncada y, como consecuencia de ello, una forma más leve de la EBD-HS grave. Similares rescates del ARNm se han encontrado en pacientes con formas muy leves de EB, en los que los exones contienen codones de terminación prematura (CTP) en los genes que codifican la laminina beta3, el colágeno tipo XVII o la integrina beta4 [109,120]. Se han postulado cuatro posibles modelos de salto u omisión de exones portadores de CTP: 1) la gammagrafía, en la que una maquinaria nuclear de acción similar a la traducción elimina exones portadores de un CTP; 2) la degradación del preARNm mediada por mutaciones de parada, que aparentemente utiliza una

forma de retroalimentación transcripcional o de empalme que favorece la generación de transcritos de ARNm con exones omitidos; 3) la alteración estructural secundaria del preARNm, en la que es necesaria una estructura secundaria local del ARN para promover la inclusión del exón. Cuando un CTP afecta el horquillado, se omite el exón, y 4) por último, la afectación de un potenciador del empalme exónico, que provoca la omisión del exón portador del CTP. La mejora del fenotipo de EB puede lograrse, por tanto, actuando sobre el ARN mediante la omisión *de novo* del exón afectado, acompañada de reversión celular. Sin embargo, este mecanismo de reparación suele repercutir en todo el cuerpo y no presenta una distribución de mosaico.

2.4.10.- Diagnóstico genético prenatal:

Los últimos avances en genética clínica y molecular han desempeñado un papel importante en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades hereditarias. En los últimos 13 años, se han esclarecido las alteraciones moleculares asociadas a los diversos subtipos de epidermólisis bullosa (EB); sin embargo, aún no se cuenta con tratamientos efectivos, a pesar de los recientes avances en los campos de las terapias génicas, proteicas y celulares [121, 122]. Por ello, la prevención de las enfermedades es la principal opción disponible para las parejas con riesgo para la función reproductora. Uno de los principales beneficios de la investigación de los trastornos cutáneos hereditarios ha sido la creación de pruebas de diagnóstico prenatal, las cuales han incrementado las opciones y las posibilidades de elección de las familias con riesgo de recurrencia de formas graves de estas enfermedades. El propósito del diagnóstico prenatal es la detección o la exclusión, durante la vida intrauterina, de enfermedades hereditarias.

Las técnicas utilizadas han ido cambiando con el tiempo, desde las basadas casi exclusivamente en los análisis de muestras de piel fetal, obtenidas por biopsia durante el segundo trimestre del embarazo, hasta los análisis del ADN obtenido de muestras de vellosidades coriónicas durante el primer trimestre de vida intrauterina. Además, continúan las investigaciones para lograr métodos de diagnóstico prenatal cada vez más sencillos y menos cruentos y que puedan realizarse en etapas más tempranas del embarazo, sin que ello afecte a la sensibilidad de las pruebas ni la precisión de los resultados. En ausencia de un tratamiento curativo, las pruebas prenatales, junto con el

consejo genético apropiado, son parte integral del tratamiento de familias en situación de riesgo de recurrencia de formas graves de EB.

Biopsia de piel fetal

En los últimos 25 años se han logrado importantes avances en la realización de pruebas de detección de enfermedades cutáneas hereditarias graves [123]. Inicialmente, el estudio ultraestructural de biopsias de piel fetal (BPF) se realizaba en un escaso número de enfermedades. El primer análisis de piel fetal para el diagnóstico de la EB se dio a conocer en 1980, en un caso con EB juntural de Herlitz (EBJ-H) [124], aunque esta técnica ya había sido utilizada en el diagnóstico de la eritrodermia ictiosiforme bullosa congénita [125]. Estas primeras biopsias se realizaron con ayuda de un fetoscopio para visualizar al feto [126], lo que requería introducir el fetoscopio de fibra óptica en el útero, con sedación y anestesia local. Sin embargo, gracias a los avances en el campo de la ecografía, las biopsias de piel fetal se realizan hoy con guía ecográfica.

A principios de la década de 1980, las muestras de piel fetal obtenidas por biopsia podían analizarse solamente mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión [126, 127]. En el caso de la EB, el diagnóstico se realizaba a partir de la detección mediante microscopía óptica de una separación en la unión dermoepidérmica, y seguidamente se precisaba mediante microscopía electrónica la localización del despegamiento. La introducción de varios anticuerpos monoclonales y policlonales frente a algunos componentes de la membrana basal a mediados de la década de 1980, impulsó el desarrollo de análisis inmunohistoquímicos que complementaban las

pruebas ultraestructurales con el fin de lograr un diagnóstico certero, en particular en pacientes con EB [128]. El anticuerpo monoclonal LH7.2, que se fija al colágeno tipo VII, se ha utilizado para el diagnóstico prenatal rápido de la EBDRHS [128].

Del mismo modo, muchos otros anticuerpos monoclonales pueden utilizarse en estos casos; como el GB3 (contra la laminina 332) y el 19-DEJ-1 (contra la unceína), para la EBJ-H [129, 130]; los anticuerpos contra las integrinas $\alpha 6$ y $\beta 4$, para la EB juntural asociada a atresia pilórica [131]; el antígeno 180 (BP180) contra el penfigoide ampolloso, para la EBJ-nH [132], y el anticuerpo contra la plectina, para la EB simple asociada a distrofia muscular [133].

La obtención de muestras de piel fetal es una técnica cruenta y supone una tasa de pérdida fetal aproximada del 1%, más alta que la de abortos espontáneos. Los errores en la obtención de las muestras, la obtención de muestras insuficientes para el análisis y las dificultades que supone la interpretación de las características morfológicas e inmunohistoquímicas de éstas, podrían ocasionar problemas [134, 135]. Desde un punto de vista práctico, las biopsias de piel fetal para el diagnóstico de la EB no se pueden realizar antes de la decimosexta semana de gestación, y la posibilidad de que sea necesario un aborto provocado en el segundo trimestre del embarazo si está afectado el feto, suele causar a la embarazada considerables alteraciones psicológicas y físicas [136, 137, 138].

Biopsia de vellosidades coriónicas y amniocentesis

Una vez conocidas las bases moleculares de los distintos subtipos de EB, las BPF han sido gradualmente reemplazadas por pruebas de diagnóstico por ADN, en las que se usa ADN fetal obtenido de las células del líquido amniótico o de las vellosidades coriónicas. Después de la implantación del embrión, el corion, la envoltura más externa del saco embrionario, proveniente de la capa trofoblástica del blastocisto, se adhiere a la pared del útero. El corion está revestido de prolongaciones microscópicas denominadas vellosidades coriónicas, que constituyen el componente fetal de la placenta y contienen el mismo material genético que el feto, lo que las convierte en una fuente útil de ADN fetal. También las células del líquido amniótico, en el que está inmerso el feto, proceden de la epidermis fetal, así como de las mucosas gastrointestinal y genitourinaria. Las muestras de vellosidades coriónicas (MVC) pueden obtenerse por vía transcervical o transabdominal, ambas con guía ecográfica.

La posición de la placenta determina qué técnica se utilizará; por ejemplo, se utiliza la vía transabdominal cuando la placenta se encuentra en posición anterior. Esto suele realizarse entre la décima y duodécima semanas de gestación. La amniocentesis, el método utilizado para obtener muestras de líquido amniótico y sus células, se realiza más tarde, alrededor de la decimosexta semana de gestación, por lo que la obtención de MVC es el método preferido en muchos lugares para realizar las pruebas prenatales por análisis del ADN [139].

Antes de que existieran las pruebas del ADN, se obtenían células amnióticas por amniocentesis para realizar análisis morfológicos, citogenéticos

y bioquímicos. Esto permite realizar el diagnóstico de diversas enfermedades durante la vida intrauterina, entre ellas las caracterizadas por anomalías en la síntesis y reparación del ADN, como la xerodermia pigmentaria y el síndrome de Cockayne [140], y enfermedades metabólicas hereditarias, mediante la detección de defectos proteicos primarios en células del líquido amniótico cultivadas, como la enfermedad de Fabry [140] y la porfiria eritropoyética congénita [141]. Además, se ha documentado una elevada concentración de α -fetoproteína en el suero materno y en el líquido amniótico en fetos con EB simple y EB con atresia pilórica [142, 143]. Sin embargo, la amniocentesis para el diagnóstico de estas enfermedades no puede realizarse antes de la decimosexta semana de gestación, y las pruebas citogenéticas y enzimáticas suelen tardar hasta cuatro semanas, lo cual podría provocar mucho más retraso para la realización del aborto provocado. Por tanto, actualmente se prefieren las pruebas de ADN para el diagnóstico prenatal de enfermedades hereditarias monogénicas, como la EB, en las que se conoce el gen causal.

Para las pruebas prenatales por análisis del ADN fetal, éste se obtiene de las vellosidades coriónicas o de las células amnióticas y se analiza en busca de mutaciones. Se analizan, además, muestras de ADN obtenidas de los padres y de hermanos afectados, en quienes se ha analizado ya la presencia de mutaciones patógenas. Este análisis inicial es de vital importancia para un consejo genético preciso y para establecer la fiabilidad de las pruebas prenatales, pues permite determinar el patrón de herencia, y con ello precisar la transmisión del gen o los genes mutados de una generación a otra. Antes de considerar la idoneidad de las pruebas prenatales, se debe excluir la posibilidad de mutaciones *de novo*, aclarar cualquier duda sobre la paternidad y

excluir una posible disomia uniparental. El análisis del ADN fetal suele realizarse en menos de 48 horas después de recibida la muestra en el laboratorio.

En el caso de las MVC, debe limpiarse el tejido obtenido con ayuda de un microscopio de disección, para eliminar células maternas, de la decidua o de la sangre, que podrían contaminar la muestra y afectar a la fiabilidad de los resultados. El riesgo de pérdida fetal tras la realización de esta prueba es de aproximadamente del 0,5% al 1%, dependiendo de la experiencia profesional de quienes realizan la prueba [139]. Los primeros informes sobre análisis moleculares prenatales para la detección de EB juntural y distrófica se publicaron en 1995 [135,144, 145, 146, 147], y desde entonces se han diagnosticado cientos de afecciones cutáneas hereditarias graves en el período prenatal en parejas con riesgo para la función reproductora [148].

Estas pruebas por análisis del ADN han reemplazado en gran medida a los estudios de BPF para el diagnóstico prenatal de afecciones cutáneas hereditarias graves. Sin embargo, las BPF aún son útiles en el diagnóstico prenatal, especialmente cuando se desconoce el gen causal pero en casos similares se ha logrado el diagnóstico prenatal, o cuando el gen causal se conoce pero no hay información disponible sobre las mutaciones o los marcadores de la enfermedad.

A pesar de los avances logrados en las técnicas de diagnóstico prenatal, la elección sobre la función reproductora y las opciones preventivas son aún limitadas para las parejas con riesgo de enfermedades cutáneas hereditarias graves. Con todas las pruebas prenatales disponibles, el diagnóstico puede realizarse sólo después de que el embarazo está establecido, lo que supone la

necesidad de realizar un aborto provocado, en caso de detectarse una afección. Esto constituye un gran problema para las parejas en estado de riesgo. Además, algunas parejas no considerarán la posibilidad de un aborto provocado, por motivos religiosos o por principios. En esos casos, son preferibles otras opciones, como el uso de gametos donados, la adopción o, incluso, no tener hijos.

2.4.11.- Diagnóstico genético preimplantacional:

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) constituye una alternativa a las pruebas prenatales habituales por análisis del ADN para parejas con riesgo de tener hijos con enfermedades hereditarias. Se trata de una técnica muy especializada disponible en relativamente pocos centros sanitarios del mundo, que consiste en el examen de elementos celulares obtenidos de los ovocitos o de embriones humanos recientemente formados, cultivados *in vitro*, en busca de anomalías genéticas específicas antes del inicio del embarazo [149, 150, 151].

Por tanto, el DGP elimina la necesidad de un aborto provocado cuando se detectan enfermedades y evita los importantes trastornos psicológicos y físicos, habituales de las parejas a quienes se realizan diagnósticos prenatales con las pruebas convencionales. El DGP consiste en la estimulación de los ovarios con gonadotropinas exógenas. Cuando existe la cantidad adecuada de folículos de tamaño apropiado, se inicia la maduración de los ovocitos mediante tratamiento hormonal. A continuación, se obtienen los ovocitos mediante aspiración transvaginal del líquido folicular con guía ecográfica. Se coloca cada ovocito en un medio de cultivo apropiado y se fecundan mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE), una técnica que consiste en la inyección directa de un espermatozoide en cada ovocito maduro [152]. Al día siguiente, se exploran los embriones en busca de la presencia de dos pronúcleos (los núcleos haploides del ovocito y del espermatozoide) lo cual indica una fecundación satisfactoria. Posteriormente, se obtiene muestras del embrión en varios momentos de su desarrollo.

En muchos centros donde se realiza el DGP, la opción preferida es la realización de una biopsia en la etapa de segmentación, que se ha utilizado con éxito en numerosas exploraciones clínicas en todo el mundo [153]. Esta biopsia se realiza en el estadio de 8 a 12 células (unas 72 horas después de la fecundación) cuando cada una de las células del embrión, denominadas blastómeros, son aún totipotenciales [154]. La técnica de biopsia utilizada precisa atravesar la zona pelúcida, bien con un haz de láser o con un chorro de solución ácida de Tyrode. Seguidamente, se introduce una pipeta para obtención de muestras en el embrión y se extrae, por succión, un blastómero nucleado para su análisis. Una vez realizado el diagnóstico genético mediante el análisis del ADN de una sola célula, se transfieren al útero embriones adecuados en el cuarto o quinto día del desarrollo.

Las primeras aplicaciones clínicas satisfactorias del DGP se realizaron en 1990 y consistieron en la obtención de biopsias de embriones de parejas con riesgo de transmitir dos enfermedades ligadas al cromosoma X (la adrenoleucodistrofia y el retraso mental ligado al cromosoma X). Se determinó el sexo de cada embrión analizando las células obtenidas mediante amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) de una secuencia de repetición específica del cromosoma Y, y se seleccionaron para la implantación sólo los embriones de sexo femenino [155]. En el caso de enfermedades de herencia mendeliana, el primer nacido vivo después del DGP se logró en 1992 en una pareja con riesgo reproductivo de fibrosis quística [156]. Desde entonces, se han realizado varios cientos de ciclos en todo el mundo, y como resultado de ello han nacido cientos de niños sanos [153]. No se conoce ningún efecto adverso importante a largo plazo en personas nacidas

después de un DGP [157]. Hasta hace muy poco, sin embargo, no existían casos de DGP satisfactorio para las enfermedades cutáneas hereditarias graves. Se habían documentado dos casos de DGP para la detección de la EB juntural de Herlitz, aunque en ninguno de ellos se estableció el embarazo (después de las pruebas bioquímicas iniciales) [158].

No obstante, en 2006 se dio a conocer el primer caso de DGP satisfactorio para la detección de una enfermedad cutánea hereditaria grave, el síndrome de displasia ectodérmica o fragilidad cutánea [159]. Esta es una enfermedad autosómica recesiva rara causada por mutaciones que provocan pérdida de funcionalidad en la placofilina 1 (*PKP1*), un componente de las uniones intercelulares de los desmosomas. En este caso, para el DGP se realizó un análisis molecular establecido en un protocolo en el que se utilizó la RCP con cebadores internos. Para esta prueba se utilizó ADN obtenido de una sola célula y se emplearon cebadores específicos para las mutaciones de la *PKP1* en esta familia [49]. Se estableció el embarazo y se logró el parto a término de una niña sana. Si bien los resultados clínicos fueron satisfactorios, la creación de condiciones para el trabajo en el laboratorio fue muy laboriosa y se necesitaron 9 meses para su optimización. Por tanto, para lograr una aplicación más generalizada del DGP en la práctica clínica, se necesitan protocolos más sencillos y genéricos.

Para crear una prueba más genérica, esto es, un protocolo estandarizado para el DGP que pueda ser utilizado en la mayoría de las parejas con riesgo de una enfermedad determinada, centrarse en la detección de mutaciones es evidentemente inapropiado porque la mayoría de las mutaciones son específicas para cada familia. En lugar de ello, un método

alternativo podría ser analizar los marcadores de ligamiento, bien sean microsatélites (repeticiones polimórficas variables de ADN) o polimorfismos de un sólo nucleótido situados cerca del locus génico asociado a la enfermedad o en él. Siempre que no exista heterogeneidad genética para una enfermedad específica (como es el caso de la EB distrófica y el gen del colágeno tipo VII, *COL7A1*) o que se conozca cuál es el gen que contiene las mutaciones en el caso de enfermedades genéticamente heterogéneas (p. ej.: mutaciones en *LAMA3*, *LAMB3*, o *LAMC2*, los tres genes de la laminina-332, en la EB juntural), entonces el DGP por análisis de ligamiento constituye, al menos en teoría, un medio para crear una prueba de aplicación más generalizada. De hecho, un protocolo de DGP por análisis de ligamiento para el gen *COL17A1* ha sido optimizado y autorizado para su uso en el Reino Unido, aunque no se ha aplicado aún en la práctica clínica [161].

Sin embargo, al diseñar protocolos de DGP, hay dos factores que dificultan, desde un punto de vista técnico, el desarrollo de pruebas clínicas. En primer lugar, se dispone de sólo una pequeña cantidad de ADN plantilla obtenido de una sola célula (sólo unos 6 pg) y, en segundo lugar, debido a que en una célula existen sólo dos copias de cada cromosoma, la amplificación de uno o de ambos alelos de interés podría fracasar: cuando se amplifica un solo alelo, esto se conoce como pérdida alélica.

Un método útil sería, por tanto, tratar de incrementar la cantidad de ADN seleccionando una técnica que amplifique todo el genoma antes de proceder a analizar los marcadores de enfermedades. Un método adecuado creado recientemente es la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) [162]. Se trata de un método isotérmico de amplificación de genomas completos

utilizando la ADN polimerasa del bacteriófago ϕ 29, con lo que se logra una amplificación de un millón de veces, lo cual convierte el ADN plantilla de una sola célula en un ADN de aproximadamente 6 μ g. Entonces, para contrarrestar el riesgo de fracaso de la RCP o de pérdida alélica, una alternativa sensata sería investigar más de un marcador génico. Así, la utilización de múltiples marcadores de ligamiento polimorfo en el gen causal de la enfermedad y en los flancos de éste constituye un enfoque más sólido. El DGP realizado mediante esta nueva técnica se denomina diagnóstico genético preimplantacional por haplotipos (DGPH) [151, 163]. El DGPH constituye un gran avance en la tecnología reproductiva aplicada a la prevención de enfermedades hereditarias, que reducirá el tiempo necesario para realizar análisis para otras enfermedades genéticas y ampliará la cobertura y disponibilidad de las pruebas genéticas preimplantacionales, lo cual beneficiará a muchas otras parejas con riesgo de enfermedades cutáneas hereditarias. De hecho, los protocolos de DGPH para los tipos de EB juntural han sido optimizados recientemente y aprobados para su uso clínico en el Reino Unido [164].

La combinación de los mayores conocimientos de las bases moleculares de enfermedades causadas por alteración de un solo gen y de los avances tecnológicos logrados en la definición de marcadores genéticos en una sola célula, está abriendo el camino hacia nuevas posibilidades para la realización de pruebas de diagnóstico preimplantacional de enfermedades dermatológicas y de otras enfermedades hereditarias. Los protocolos de laboratorio son cada vez más rápidos, fiables y de fácil ejecución técnica y, por tanto, en el consejo genético brindado a parejas con riesgo de recurrencia de una enfermedad

específica debería abordarse el tema de los significativos y clínicamente importantes avances clínicos logrados en este campo.

2.4.12.- Diagnóstico prenatal incruento:

Todos los métodos disponibles para las pruebas de diagnóstico prenatal de la EB (BPF, MVC y DGP/DGPH) se realizan con técnicas cruentas y, por ello, se está valorando la posibilidad de realizar diagnósticos prenatales mediante técnicas menos cruentas, quizá mediante análisis de sangre materna [165]. En la década de 1960, se hallaron células fetales nucleadas (eritrocitos, linfocitos y trofoblastos) en muestras de sangre materna. Sin embargo, estas células son muy escasas (aproximadamente una célula por ml de sangre materna) y tienen un ciclo de vida de meses o años, por lo que se ha puesto en duda el valor de su detección para el diagnóstico prenatal [166]. En 1997, se descubrió que en la sangre materna circula ADN fetal en forma libre [167]. Este ADN fetal constituye aproximadamente el 5% del ADN materno libre y está formado principalmente por fragmentos cortos (el 80% contiene menos de 200 pares de bases) y son detectables a partir de la cuarta semana de gestación. Si bien el análisis de ADN fetal libre no se utiliza en el diagnóstico prenatal de la EB, sí se ha utilizado para la detección del antígeno D Rhesus en los análisis de determinación de grupos sanguíneos (esto es, para la detección del anticuerpo D Rh positivo fetal en el plasma sanguíneo de una madre con anticuerpo D Rh negativo) [168]. En 1997, se halló, además, la presencia de ADN fetal en el plasma materno, y desde entonces se han identificado varios transcritos placentarios (fetales) específicos [169]. Sin embargo, los análisis de ADN o ARN fetal en la sangre materna son útiles solamente para la detección de mutaciones o marcadores transmitidos por el padre, pues los alelos transmitidos por la vía materna no pueden diferenciarse del ADN de la madre. Actualmente, con el fin de encontrar una solución a esto, se trabaja con

interés para establecer signos epigenéticos característicos del ADN fetal (estado de metilación diferencial del ADN), que permitirían detectar marcadores maternos y paternos [170]. Sin embargo, no se dispone aún de métodos de análisis de sangre materna para el diagnóstico prenatal de la EB.

2.4.13.- Diagnóstico prenatal: práctica clínica:

Desde que se realizara la primera prueba prenatal para el diagnóstico de la EB en 1979 hasta hoy, se han analizado en todo el mundo cientos de biopsias de piel fetal y muestras de vellosidades coriónicas en parejas con riesgo genético de las formas graves de EB.

En las pruebas de análisis del ADN se utilizan la secuenciación de nucleótidos, la digestión con enzimas de restricción o, en unos pocos casos, el análisis de ligamiento.

Por el momento, no se han comunicado casos de DGP satisfactorio para las formas graves de EB. En general, las pruebas de diagnóstico prenatal han sido muy útiles en casos de personas o parejas con riesgo de tener hijos con enfermedades cutáneas hereditarias graves y, en ausencia de una cura, las pruebas prenatales en combinación con el consejo genético apropiado constituyen pilares importantes de las investigaciones básicas y partes integrales del manejo clínico de estos pacientes.

2.5.- Manifestaciones clínicas:

2.5.1. Manifestaciones cutáneas generales:

Lesiones primarias

El rasgo distintivo de la EB hereditaria es la fragilidad mecánica que se asocia a la aparición de erosiones en la piel y en las mucosas. En la mayoría de las formas de EB las erosiones van precedidas por ampollas tensas rellenas con un exudado transparente e incoloro. Recientemente se han descrito subtipos de EB caracterizados por la presencia de un despegamiento de la porción superior de la epidermis, entre los que se encuentran la EBS superficial [171], la EBS acantolítica letal [172] y la carencia de placofilina-1 [173]. En estos casos las ampollas no son clínicamente evidentes, lo que dificulta el diagnóstico basado exclusivamente en los signos cutáneos. Un rasgo característico del subtipo Dowling-Meara de EBS generalizada es la presencia de pequeñas ampollas agrupadas en forma de arco o «herpetiforme» –de ahí el nombre de «EB herpetiforme»– que originalmente se utilizó para designar esta entidad. Esta configuración de las lesiones se observa mejor cuando las manifestaciones clínicas son relativamente leves, y puede ser menos obvia cuando éstas se exacerban.

Otros signos cutáneos *primarios* que pueden observarse en la EB hereditaria incluyen quistes miliares, distrofia o ausencia de las uñas, alopecia, tejido de granulación profuso, aplasia cutánea congénita, queratodermia palmoplantar, pigmentación moteada y nevos de EB. Los quistes miliares son diminutas pápulas blancas firmes que suelen aparecer sobre la piel de aspecto normal, en zonas donde antes hubo ampollas y erosiones o dentro de cicatrices cutáneas más antiguas. Los quistes miliares son más frecuentes en la EBD y

menos frecuentes en la EBJ, pero también pueden encontrarse en la EBS, especialmente en los subtipos generalizados, más graves. Las uñas pueden engrosarse y adquirir un aspecto amarillento, con surcos longitudinales en la placa ungueal. En algunos casos, la curvatura de la uña se vuelve anómalamente convexa. Con el tiempo, muchas de estas uñas distróficas suelen desprenderse, especialmente en los pacientes con EBJ y EBD, con la consiguiente atrofia, deformidad cicatricial del lecho ungueal y anoniquia.



Figura 5: ausencia de uñas en paciente con epidermolisis distrófica recesiva..

El exceso de tejido de granulación (ETG), consistente en la presencia de placas húmedas, rojas, friables y con tendencia a sangrar, es un signo casi patognomónico del subtipo de EBJ de Herlitz. Suele tener una presentación bilateral y simétrica periorificial, y en ocasiones produce la oclusión total de las ventanas nasales. Otras zonas corporales que se afectan habitualmente son la base del cuello, las axilas, los bordes ungueales proximales y la zona lumbosacra. Con menos frecuencia, también pueden aparecer en la luz de la porción superior de la garganta. No obstante, otras lesiones solitarias pero de

aparición similar pueden ser, en cambio, carcinomas espinocelulares, lo cual indica la necesidad de una exploración más rigurosa y, cuando esté indicada, de una biopsia cutánea, especialmente cuando las lesiones de este tipo aparecen en pacientes con EBDR.

En los subtipos más generalizados de EB, especialmente en la EBJ-nHS y la EBDRHS, es posible observar alopecia del cuero cabelludo, localizada o difusa. En algunos pacientes, ésta podría estar asociada a una excesiva formación de cicatrices. La EB hereditaria puede ir asociada a una aplasia cutánea congénita (ACC), combinación que ha sido denominada síndrome de Bart [174]. Aunque más tarde se probó que la familia descrita originalmente tenía EBDD, ahora se sabe que el síndrome de Bart puede también presentarse en pacientes con EBS, EBJ y EBDR. Cuando la ACC aparece asociada a la EB, se caracteriza por la presencia de parches rojos, angulados o en forma de llama, bien delimitada y cóncava. Al nacer, algunas de estas zonas podrían estar en carne viva, cubiertas con erosiones superficiales. Aparecen siempre en las manos, los pies, las muñecas o los tobillos, y por lo general son unilaterales, aunque en raras ocasiones son bilaterales o están distribuidas de forma más difusa.

Las lesiones «albopapuloides», que son grupos de pequeñas pápulas hipopigmentadas, fueron en su día consideradas el rasgo distintivo de uno de los dos principales subtipos de EBDD generalizada, el denominado subtipo de Pasini. Estas lesiones por lo general aparecen en la región lumbar y su hallazgo ya no se considera útil desde el punto de vista diagnóstico, pues se han observado lesiones similares o idénticas en otras formas de EB. Además, no se observan en todos los miembros afectados de una misma familia, ni

existen pruebas de que los resultados del análisis molecular en la EBDD de Pasini difieran de los que se encuentran en los pacientes con EBDD sin lesiones albopapuloides (EBDD, subtipo Cockayne-Touraine). Con el tiempo, es posible que aparezcan queratodermias en las palmas de las manos y en las plantas de los pies de algunos pacientes con EBS, que son lesiones callosas localizadas o difusas. La queratodermia confluyente es un rasgo típico de la EBS-DM, pero podría no aparecer hasta el final de la infancia o principios de la adolescencia.

La hiperpigmentación moteada o reticulada es la manifestación cutánea patognomónica de un subtipo infrecuente de EBS, descriptivamente denominado EBS con pigmentación moteada (EBS-PM). Es de especial interés que esta variante particular de EBS tiene un genotipo inconfundible. Las lesiones normalmente están presentes en la primera infancia, pero en la vida adulta suelen ser menos definidas o incluso imperceptibles. Los nevos de la EB se suelen presentar como parches de gran tamaño, con bordes irregulares y grados variables de hiperpigmentación marrón.

Lesiones secundarias

Algunos de los signos cutáneos secundarios en la EB son atrofia, formación de cicatrices, anomalías de la pigmentación, formación de membranas y contracturas. La atrofia se observa casi exclusivamente en los pacientes con EBJ y EBD. En un tiempo, se consideró que ésta ocurría en la EBJ cuando no existía cicatrización previa, de ahí la antigua denominación de «*EB atrophicans*» para la EBJ. Ahora se considera que al menos la mayoría de estas zonas atróficas, si no todas, han estado precedidas de ampollas, incluso

en el período intrauterino, y que están asociadas a la formación de cicatrices. La formación de cicatrices es un rasgo característico de la EBJ y la EBD y, aunque con menos frecuencia, también es posible observar cicatrización focal en los subtipos más graves de EBS. La formación de cicatrices se asocia con mayor frecuencia a atrofia cutánea, aunque también es posible encontrar cicatrices engrosadas (hipertróficas) en algunos pacientes con EBD, especialmente en los que padecen EBDD generalizada.

En muchos subtipos de EB puede aparecer despigmentación secundaria a ampollas extensas y, a veces, a cicatrices. Las zonas afectadas pueden estar hiperpigmentadas, hipopigmentadas o despigmentadas (vitíligo). La sindactilia se considera que es secundaria a ampollas crónicas entre los dedos de las manos y los pies, y que son reflejo de una formación de cicatrices intradérmicas. Sin embargo, también es posible que la aparición de vesículas microscópicas, en ausencia de ampollas manifiestas, sea suficiente para causar la formación precoz de membranas interdigitales en algunos pacientes. La sindactilia se observa con más frecuencia en la EBD, aunque ocasionalmente aparece también en la EBJ. Las contracturas más centrales (por ejemplo, en los huecos axilares) se observan comúnmente en la EBJ-H y la EBDR-HS, y se producen como resultado de formaciones repetidas de ampollas, erosiones y deformidad cicatricial en la piel.

Los subtipos de EB por lo general se clasifican en generalizados y localizados, dependiendo de la extensión de la afectación cutánea. Si bien la distribución de las lesiones es un signo pronóstico útil en los últimos años de la niñez, en la primera infancia podría ser difícil de determinar, pues la fragilidad de la piel es mayor y las ampollas por lo general están mucho más

diseminadas. En algunos subtipos infrecuentes o raros de EB, por ejemplo la EBDR-I (forma inversa) y la EBDR centrípeta, la singular distribución de las lesiones podría no ser evidente al menos hasta el primer año de la vida, lo cual haría pensar equivocadamente en una forma más generalizada de EB. Asimismo, algunos subtipos de EB tradicionalmente considerados de tipo localizado, por ejemplo la EBS Weber-Cockayne, podrían en cambio estar asociados a ampollas extensas y generalizadas, secundarias a traumatismos importantes de la piel.

En general, es más probable que los pacientes que no tienen deformidad cicatricial, distrofia ungueal, atrofia y quistes miliares, tengan EBS. De forma análoga, los pacientes que presentan ampollas herpetiformes o abundante tejido de granulación, probablemente padecen EBS-DM o EBJ-H, respectivamente. No obstante, hay muchas razones por las que es conveniente actuar con cautela a la hora de establecer el diagnóstico sólo por la presencia de dichos signos, sin haber confirmado la presencia de al menos uno de los principales tipos de EB en el paciente mediante pruebas de antígenos, de microscopia electrónica, y moleculares. En primer lugar, cuando el Registro Nacional Estadounidense de EB (American National EB Registry, NEBR) realizó estudios de sensibilidad y especificidad en 1700 pacientes consecutivos, ninguna manifestación aislada (excepto el ETG) o combinación de hasta tres signos, alcanzó grados de sensibilidad y especificidad de al menos el 90% para ambos parámetros. Esto indica que el empleo incluso de combinaciones de signos cutáneos como marcadores diagnósticos indirectos de EB puede ofrecer resultados equívocos [175]. Similares resultados se

obtuvieron cuando se utilizó una técnica analítica computarizada repetitiva, conocida como CART (Classification and Regression Tree analysis, 'árboles de clasificación y regresión') [176].

En segundo lugar, se sabe que algunas de estas manifestaciones cutáneas, especialmente los quistes miliares, la distrofia ungueal, la formación de cicatrices, el ETG y la sindactilia, pueden no ser evidentes en la primera infancia, cuando más se busca un diagnóstico exacto [175]. Además, algunas manifestaciones, como las ampollas herpetiformes, pueden ser relativamente transitorias o inconstantes. Otras, como el ETG y la queratodermia, pueden no aparecer hasta al menos el primer año de la vida o la primera infancia, respectivamente. Asimismo, algunas manifestaciones, como el ETG, pueden desaparecer de forma espontánea a mediados de la vida adulta, si es que los pacientes sobreviven hasta esta edad.



(a)



(b)

Figura 6 y 7: lesiones en torso y abdomen(a) y lesiones en extremidades (b) en un paciente afecto de una epidermolísis bullosa distrófica.

2.5.2.- Nevos en la epidermólisis bullosa:

Se conocen como nevos de la EB las lesiones cutáneas melanocíticas que suelen ser eruptivas, asimétricas y pigmentadas irregularmente suelen aparecer en zonas que previamente han desarrollado ampollas. Generalmente se acepta que estas lesiones aparecen en pacientes que padecen cualquier tipo de EB hereditaria recesiva siendo infrecuente en las formas dominantes.

Estas lesiones se consideran proliferaciones hamartomatosas benignas de melanocitos y son clínicamente importantes pues son marcadores de riesgo del desarrollo de un posible melanoma [176]. Es necesario realizar controles periódicos, en ocasiones realizar biopsias de los mismos e incluso resecciones completas.

Los cambios morfológicos de las lesiones cutáneas pigmentadas han sido siempre identificados como precursores de malignidad, sin embargo la EB es una excepción a esta regla y así se ha documentado el crecimiento de los nevos en la EB pero se ha excluido la malignidad en múltiples análisis histológicos [177]. Aunque no existe evidencia científica de que el traumatismo repetido sea un factor causante de melanomas, la regeneración cutánea crónica de los pacientes con EB parece estimular la progresión tumoral pues ello intenta explicar la alta incidencia de carcinomas espinocelulares en pacientes con EB distrofica recesiva [178, 179].

Es por todo ello altamente recomendable el seguimiento clínico frecuente y la valoración histológica con biopsias de los nevos que muestren signos dermatoscópicos sospechosos.

2.5.3.- El cáncer en la epidermólisis bullosa:

El cáncer constituye la complicación más grave de los pacientes afectados con EB. Estos pacientes van a padecer fundamentalmente carcinomas espinocelulares, carcinomas basocelulares y melanomas. Existe evidencia que los pacientes afectados de EB distrófica recesiva tienen un mayor riesgo de padecer un cáncer de piel en la edad adulta y debido a la facilidad para desarrollar metástasis son la principal causa de fallecimiento [181].

Cáncer espinocelular:

Cuando aparecen los cánceres espinocelulares en pacientes con EB se presentan como erosiones con superficie costrosa que no cicatrizan similares a las lesiones que presentan en otras zonas semejando áreas de tejido de granulación. Los pacientes refieren sensaciones distintas en esas áreas como escozor y ello debe hacernos sospechar la posible existencia de un carcinoma espinocelular.

El lugar más común para la aparición de este tipo de tumores son las heridas superficiales crónicas y las cicatrices cutáneas. Aunque el carcinoma espinocelular puede aparecer en cualquier lugar del cuerpo en los pacientes con el tipo distrófico recesivo los lugares más comunes son las extremidades y las prominencias óseas [182].

El riesgo acumulado más elevado de carcinoma espinocelular se observó en la EB distrófica recesiva siendo del 0.8% a la edad de 14 años [182]. A los 20 años el riesgo acumulado alcanza ya el 7,5%, este riesgo aumenta rápidamente con la edad siendo la enfermedad metastásica la causa

más común de fallecimiento en la edad adulta en pacientes afectos de EB distrófica recesiva.

Según datos publicados por el registro norteamericano de EB el riesgo de malignización comienza en la adolescencia y antes de ésta no es necesaria una vigilancia meticulosa. Una vez superada la edad de 10-11 años debe ser mandatorio la exploración rigurosa, al menos dos veces al año, retirando todos los vendajes y revisando heridas y cicatrices. Cuando se localice una zona sospechosa o bien el paciente manifieste sensaciones atípicas, debe procederse a realizar una biopsia de la zona crítica. La valoración suele ser altamente difícil pues la presentación de un tumor incipiente es similar al de la cicatrización o ulceración crónica. Las costras hiperqueratósicas deben ser retiradas para analizar el tejido subyacente.

El tratamiento quirúrgico de estas neoplasias se limita a la escisión amplia alcanzando la fascia y procediendo a su cobertura con injertos. La mayoría de las veces se intenta realizar resecciones hasta márgenes limpios siendo necesario el uso de la microscopía para confirmar que los bordes de la resección están exentos de tumor. Desgraciadamente a pesar de las resecciones amplias, debido a la diseminación linfática, las recidivas y las metástasis son frecuentes y esto explica las altas tasas de mortalidad. Cuando las metástasis provocan dolor por su tamaño debido a la falta de cicatrización, se recomienda la citorreducción quirúrgica con objeto de mejorar la calidad de vida de los pacientes.

La exploración de las cadenas ganglionares es fundamental y así cuando se detecta el aumento de tamaño de una adenopatía próximo a una zona de confirmación tumoral debe procederse a la biopsia de la misma y su

análisis histológico [183]. Actualmente la biopsia del ganglio centinela es una práctica habitual en otro tipo de tumores y pacientes, este tipo de prácticas puede jugar un papel importante en la detección precoz de metástasis regionales y con ello mejorar el pronóstico a largo plazo.

En los pacientes con EB distrófica existe una pobre tolerancia a la radiación, sobre todo para la piel sana. Es por ello que la radioterapia no se utiliza en estos pacientes como tratamiento primario y solamente se reserva como tratamiento paliativo o citorreductor de las metástasis que provocan dolor. Estos pacientes son muy propensos a sufrir radiodermatitis aguda y crónica.

En cuanto a la quimioterapia sistémica, debido a su toxicidad no es de ayuda para el tratamiento de estos pacientes. Un porcentaje muy bajo de pacientes seguidos por el registro norteamericano de EB había sido sometido a quimioterapia sistémica (6%), solamente fueron tratados pacientes en estadios avanzados y en ninguno se consiguió efectos beneficiosos duraderos. Parece ser que el tratamiento con cisplatino puede ser beneficioso de forma paliativa, pero son necesarios estudios más amplios para demostrar su eficacia [185].

Melanoma maligno:

En el registro norteamericano de EB están recogidos tres pacientes pediátricos de 2, 6 y 12 años que presentaron melanomas malignos. Esta incidencia supuso el 2% de todas las EB distróficas recesivas y con un riesgo acumulado a los 12 años del 2,5%, ello supone un riesgo más alto que el observado en otras dermatosis genéticas. Del análisis de estos casos se sabe que todas las lesiones se manifestaron en piel intacta, no hubo lesiones

tumorales en zonas cicatriciales ni en nevos, y en los tres casos el tratamiento fue la extirpación quirúrgica satisfactoria no presentando recidivas [182].

2.5.4.- Complicaciones oftalmológicas:

La EB puede afectar a la piel de los párpados como a la superficie del globo ocular. La córnea y la conjuntiva tienen un epitelio estratificado y membranas similares a la piel y las lesiones repetidas por fricción pueden dejar cicatrices provocando un deterioro de la visión. La extraordinaria inervación corneal hace que las lesiones en esta zona en los pacientes con EB sean muy dolorosas [186].

Se han descrito lesiones en la superficie ocular y los párpados en todos los tipos de epidermólisis bullosa. Los síntomas que pueden acompañar a estas lesiones son: fotofobia, lagrimeo, enrojecimiento ocular y edema palpebral. Las pequeñas ampollas que se forman en la superficie corneal se rompen por la fricción, la superficie corneal queda expuesta y se produce una erosión corneal. Los pacientes pediátricos son más propensos a estas lesiones que los adultos. Los mínimos traumatismos como frotarse los ojos, o la ruptura de la película lacrimal con el viento son razones para provocar lesiones. Incluso durante el sueño se reduce la producción lacrimal y al abrir los ojos de forma brusca puede romperse la capa epitelial provocando lesiones del epitelio.



Figura 8: Lesiones conjuntivales con vesículas ampollosas en la Esclerótica y úlcera corneal en paciente afecto de EBD.

La curación de estas heridas suele suceder en 2-3 días de forma espontánea y sin cicatriz residual. Es recomendable el uso de pomadas antibióticas y la colocación de parches para dejar el párpado en reposo evitando de esta forma traumatismos por fricción. Estos parches deben ser no adherentes para evitar lesionar la piel. La aplicación diaria de geles o lágrimas artificiales permite reducir la incidencia de lesiones corneales. El uso de lágrimas artificiales con ácido hialurónico es altamente beneficioso y superior a otros componentes. Resulta muy eficaz el uso de pomadas con vitamina A para evitar la sequedad nocturna evitando la adhesión del párpado a la cornea y por consiguiente evitando la formación de erosiones.

El pannus corneal es un aumento de la vascularización corneal con infiltración de tejido de granulación y que se produce cuando una erosión corneal se infecta. Los pacientes con EB distrófica pueden presentar un ensanchamiento del limbo corneal (unión entre la cornea y la conjuntiva), esta zona puede ser marcadamente opaca y se conoce como limbo ancho, pero no afecta a la agudeza visual.

Las lesiones de la conjuntiva pueden ser ampollas o erosiones y su tratamiento es similar a las lesiones corneales. En ocasiones estas cicatrices pueden provocar la fusión del párpado con la conjuntiva adyacente y es lo que se conoce como simbléfaron, esta complicación suele ocurrir hasta en el 10% de los pacientes con EB distrófica recesiva [187]. Cuando se pierde la movilidad del globo ocular se puede realizar la lisis del simbléfaron.

Al igual que en otras zonas del cuerpo la piel de los párpados puede lesionarse formando ampollas, sobre todo en los niños ante el mínimo trauma de frotarse los ojos. Estas lesiones deben tratarse como el resto pero debido a su ubicación es difícil el uso de apósitos

2.5.5.- Complicaciones otorrinolaringológicas (ORL).-

En los pacientes con EB se han publicado complicaciones ORL en todos los tipos de enfermedad, algunas de ellas afectan a la vía aérea y pueden ser potencialmente mortales [188]. Los diferentes signos y síntomas que pueden presentar estos pacientes son: llanto débil, disfonía, estridor inspiratorio, ronquera, edemas de la mucosa de vía aérea, vesículas y ampollas en la mucosa respiratoria, engrosamiento y cicatrices en las cuerdas vocales. Además se han descrito formación de membranas y fundamentalmente estenosis secundarias a cicatrices en las vías respiratorias altas.

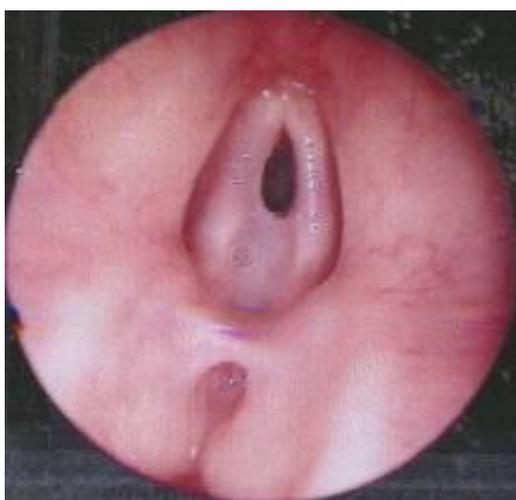


Figura 9: Sinequia parcial de cuerdas vocales provocando una estenosis laríngea en un paciente afecto de una EBD..

Las complicaciones laríngeas se pueden predecir según el tipo de EB [189]. Debido a que la plectina se encuentra en el epitelio de las vías respiratorias, el subtipo infrecuente de EBS-MD (EB simple con distrofia muscular) va a presentar con mayor incidencia estridor debido a la formación

de cicatrices y en ocasiones van a precisar de la realización de una traqueotomía.

La afectación de las vías aéreas superiores es bastante frecuente en la EB juntural, la ronquera y el llanto débil se llega a dar hasta en el 50% de los casos. La formación de membranas, estenosis y obstrucción de la vía aérea llega a alcanzar el 12% y el 26% en la EBJ-nH y EBJ-H respectivamente [187].

El comienzo de la afectación laringotraqueal ocurre en edades tempranas, especialmente en la EB juntural y en un grupo de pacientes ya está presente en el primer año de vida. El riesgo de estenosis de la vía aérea en los dos subtipos de EB juntural se estabiliza a mediados de la infancia, entre los 6-9 años, y ello se debe a que debido al crecimiento y ensanchamiento de la luz de la vía aérea los signos y síntomas desaparecen.

Las intervenciones sobre la vía aérea son muy delicadas, así si el estridor es leve debe tratarse con corticoides y nebulizadores de adrenalina. Las resecciones endoscópicas con laser o el uso de la mitomicina tópica son otras posibilidades de abordar las estenosis de la vía aérea. En otras situaciones de difícil manejo habrá que practicar una traqueotomía. En niños puede provocarse una obstrucción súbita de la vía aérea debido a la formación de ampollas en las mucosas, es por ello que se recomienda en los lactantes afectados por la EB juntural, anticiparse con la realización de traqueotomías, incluso si la sintomatología es mínima.

La otitis media es un fenómeno frecuente en todas las formas de EB, pero no existe una relación entre la gravedad de la enfermedad y la frecuencia de esta afección. Es por ello que no se relaciona específicamente con la EB, sin embargo la otitis crónica externa si tiene una alta incidencia. Las opciones

terapéuticas de las afectaciones auditivas en estos enfermos son principalmente sintomáticas, en ocasiones pueden precisar drenajes timpánicos para el tratamiento de la otitis media. En casos de hipoacusia neurosensorial pueden estar indicados los implantes cocleares.

2.5.6.- Lesiones orales en pacientes con EB:

Un alto porcentaje de pacientes con EB presenta complicaciones de la zona oral y maxilofacial, afectando tanto a tejidos blandos como duros. Los pacientes afectados de las formas distróficas y junturales son los que tienen una mayor incidencia de lesiones. En la forma distrófica se va a dar con relativa frecuencia la microstomía (boca pequeña), siendo aún más frecuente en la forma recesiva sobre la dominante. La microstomía está provocada por los traumatismos frecuentes de los alimentos sobre la mucosa oral, la obliteración del espacio gingival y la anquiloglosia son otras complicaciones frecuentes. En el 90% de los pacientes con EB distrófica recesiva presentan ampollas y vesículas fundamentalmente en la lengua. Otras complicaciones frecuentes son: atrofia del paladar, obliteración del vestíbulo y depapilación lingual [190,191].



Figura 10: Lesiones bucales afectando a la lengua y los labios en un paciente de 6 años afectado por una EBD..

Las lesiones de la mucosa oral van a conllevar un alto riesgo de candidiasis. El dolor a la deglución junto con la dieta restrictiva conlleva un riesgo de desnutrición, retraso del crecimiento, anemia y una defectuosa

cicatrización. Todas estas complicaciones inciden de forma importante en la morbilidad de la EB.

La hipoplasia del esmalte dental es muy frecuente en la EB y clínicamente se presenta con cambios de color de los dientes, esta complicación llega a ser hasta del 100% en los pacientes con la forma juntural. La forma distrófica recesiva y la juntural van a presentar una incidencia superior de caries con respecto a la población general.



Figura 11: Hipoplasia severa de esmalte dental y lesiones de piezas dentales en paciente con EBDR.

La asistencia odontológica precoz en los pacientes con EB es fundamental. Esta asistencia debe estar enfocada a: una correcta e intensa higiene bucal, una reducción de la dieta cariogénica para minimizar la formación de caries, uso precoz de coronas dentarias de acero en los dientes temporales con objeto de evitar la destrucción del esmalte, obturaciones de los defectos de dentina, lubricación de tejidos bucales y extracciones de los dientes más afectados para evitar infecciones [192].

La exploración bucal periódica durante toda la vida es obligada en pacientes con EB y deben realizarse biopsias de las lesiones sospechosas que aparezcan en la mucosa bucal por el riesgo de malignización.

2.5.7.- Complicaciones gastrointestinales.-

El tubo digestivo es uno de los lugares más frecuente de lesiones en los pacientes afectos de EB hereditaria. Los diferentes traumatismos de las mucosas provocan la formación de ampollas y vesículas que secundariamente al cicatrizar van a provocar estenosis de la luz del tubo digestivo.

Las lesiones de la mucosa oral y del esófago dificultan una ingesta adecuada lo que conlleva estados nutricionales deficitarios dificultando la cicatrización y favoreciendo la infección [193]. Estas lesiones se presentan en todos los tipos de EB siendo más graves en los pacientes con EB distrófica recesiva presentando ampollas serosas grandes, hemorrágicas y con una importante reacción inflamatoria. Cuando las ampollas se rompen curan provocando cicatrices y fibrosis con disminución de la luz. Así en la boca ocasionan microstomías (boca pequeña), anquiloglosia que es el anclaje de la lengua al suelo bucal, pérdida de papilas linguales y atrofia de los pliegues palatinos [194, 195]. En los pacientes con EBDR-HS se han descrito zonas de leucoplaquia y como consecuencia de ulceraciones bucales repetidas con reepitelizaciones estas lesiones tienen un alto riesgo de desarrollar carcinomas epidermoides.

Los traumatismos repetidos por la deglución de los alimentos provocan ampollas en la mucosa orofaríngea y esofágica, estas ampollas se ulceran

luego cicatrizan y finalmente producen estenosis esofágica. Los estrechamientos esofágicos se pueden presentar en cualquier zona del mismo, aunque por lo general el 50% son más frecuentes en el tercio superior en la unión faringoesofágica. Estas lesiones dejadas evolucionar van a generar un cuadro de disfagia severa y como consecuencia desnutrición grave, alteraciones en el crecimiento e infección. Las estenosis esofágicas, sobre todo altas, favorecen la broncoaspiración y la neumonía [196, 197].

Otras complicaciones esofágicas que presentan los pacientes con EB son dilataciones esofágicas preestenóticas, esofagitis, esófago de Barrett, alteraciones de la motilidad esofágica, aparición de pseudodivertículos esofágicos, desgarros de Mallory Weiss, perforaciones esofágicas y acortamientos esofágicos con hernia hiatal.

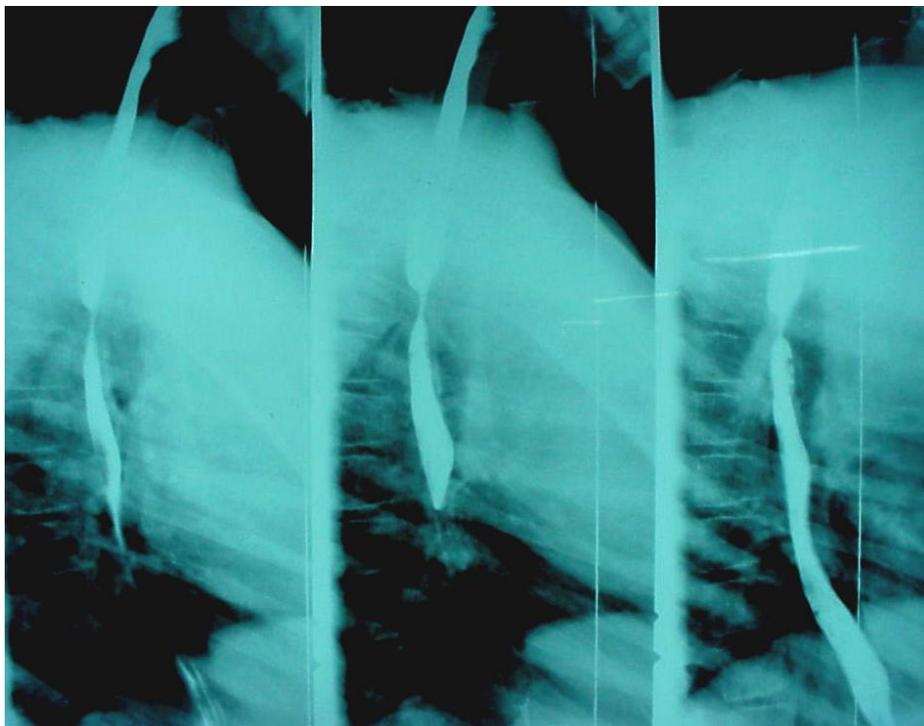


Figura 12: Estenosis esofágica en paciente con EBD que ha precisado para su tratamiento de varias sesiones de dilatación esofágica bajo anestesia general.

El tratamiento de las estenosis esofágica debe de realizarse con balones de dilatación neumática por vía endoscópica, incluso evitando el uso del endoscopio flexible para disminuir el trauma sobre la mucosa orofaríngea. Las dilataciones neumáticas van a ser necesarias varias veces para solventar las estenosis.

La atresia pilórica se describe asociada a un pequeño subgrupo de EB juntural [193]. Actualmente los recién nacidos que presentan ampollas asociadas a atresia pilórica se les considera dentro de un subgrupo específico denominado EB con atresia pilórica (EB-AP). Ya se sabe desde hace años que estos pacientes presentan alteraciones de la integrina hemidesmosómica [196, 197], sin embargo también se han descrito grupos familiares con EB-AP cuyos análisis genéticos presentaron mutaciones en el gen de la plectina [198]. El diagnóstico clínico de la EB-AP se realiza a las pocas horas de vida tras realizar una radiografía simple de abdomen, confirmada la atresia pilórica esta debe ser corregida quirúrgicamente.

También se presentan complicaciones digestivas referidas al tubo digestivo inferior siendo el más común la impactación fecal y el estreñimiento. A veces estos cuadros son secundarios a erosiones de la mucosa de la mucosa anorectal y debido al dolor en la defecación se producen estos episodios de estreñimiento severo. El manejo de este cuadro debe ser con laxantes, enemas reblandecedores del bolo fecal y medidas dietéticas con abundante consumo de agua y administración de lactulosa oral en niños.

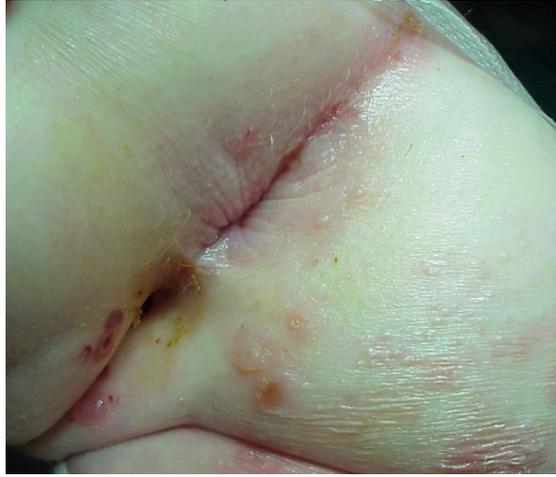


Figura 13: lesiones perianales característica en un paciente con EBD y que agravan el cuadro de estreñimiento.

El consumo restrictivo de nutrientes y la malabsorción secundaria a las lesiones de la mucosa intestinal acaban provocando cuadros de desnutrición severa y retraso en el desarrollo ponderoestatural. Una medida que se utiliza con bastante frecuencia para corregir estos déficits nutricionales es la nutrición complementaria a través de una gastrostomía. La introducción de dispositivos cada vez más pequeños ha permitido mejorar la alimentación en lactantes y en niños pequeños.



Figura 14: Botón de gastrostomía en paciente con EBD.

2.5.8.- Complicaciones musculoesqueleticas.-

La pseudosindactilia es la complicación extracutánea más visible en la EB hereditaria y se presenta fundamentalmente en la EB distrófica recesiva. El proceso se inicia con una formación de sinequias entre los dedos a nivel de los espacios interdigitales y que puede llegar a la fusión completa de todos los dedos y posteriormente a la inclusión dentro de una estructura queratinocítica mucho más gruesa que el resto de la epidermis. Estas deformidades de las extremidades producen una incapacidad funcional muy marcada imposibilitando las funciones motoras y la pérdida de prensión digital [199]. Si estas lesiones no se corrigen precozmente, los músculos se atrofian e incluso los huesos pueden reabsorberse por el desuso. Este tipo de malformación se da fundamentalmente en la EBDR pero también con relativa frecuencia en la EBDR-HS y en la EBDR-I. Los estudios realizados con los datos del registro norteamericano de EB demostraron que el mayor riesgo de presentar pseudosindactilia se encontraba en los pacientes que padecían una EBDR-HS y alcanzaba el 100% de incidencia a los 20 años. En los niños con EBDR-HS y EBDR-nHS se presentan estas complicaciones de forma precoz, incluso antes del año de vida.



Figura 15: Lesiones de pseudosindactilia en mitoncaracterístico de los pacientes con EBDR.

Otras deformidades musculoesqueléticas que se observan son contracturas fuera de las extremidades provocando trastornos para realizar la deambulación e incluso limitar actividades tan comunes como el vestirse. En la EBJ se presentan contracturas a nivel de los huecos axilares e inguinales, también en la base del cuello y en estas zonas se aprecian áreas de tejido de granulación incapaz de cicatrizar.



Figura 16: Deformidades en extremidades inferiores en paciente con EBDR.

En la EB se han descrito diferentes signos radiológicos que expresan las complicaciones musculoesqueléticas y que consisten en: osteoporosis generalizada, deformidades de falanges distales, huesos finos y comprimidos, osteolisis de partes acras, subluxaciones del metacarpo y metatarso, sindactilias, calcificaciones de partes blandas, inclusión de manos y pies en bolsas (mitón), anquilosis de articulaciones interfalángicas, fusión y destrucción carpiana y alteraciones quísticas en las partes distales del cúbito y el radio [200, 201, 202].



Figura 17: Radiografía de extremidades superiores (mano, muñeca y antebrazo) que muestra las deformidades de falanges en un paciente afecto de EBDR.

Se intenta realizar tratamientos no quirúrgicos con el fin de evitar o postponer la aparición de pseudosindactilia y estos tratamientos se basan en la separación mecánica de los dedos con tiras estériles de gasa y la colocación de guantes con fundas para los dedos. Este tipo de tratamientos se recomienda en las manos y no se realiza en los pies al menos que las lesiones provoquen dificultades para la deambulación. También se recomienda la colocación de férulas durante la noche para evitar contracturas de los dedos y las muñecas.

Las intervenciones quirúrgicas de la seudosindactilia persigue la separación digital para mejorar la funcionalidad mejorando la prensión digital y la pinza digital gruesa. Desgraciadamente se producen recurrencias y se necesitan intervenciones repetidas aproximadamente cada dos años [203].



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 18: Imágenes de la intervención quirúrgica de sindactilia en diferentes fases: a/preintervención; b/ y c/ separación digital; d/postoperatorio inmediato; e/postoperatorio tardío.

Se han descrito diferentes abordajes quirúrgicos para tratar las seudosindactilias, la mejor respuesta se consigue cuando la intervención es

precoz y se realiza antes de la fase grave de la sindactilia. Habitualmente se realiza la avulsión de la mano, se colocan injertos en las partes cruentas y se inmovilizan los dedos con pequeñas agujas a modo de férulas. Debido a la inmovilización postoperatoria se intenta realizar la intervención en dos tiempos no aconsejando la inmovilización simultánea de ambas manos.

Las deformidades de los pies se reparan con mucha menos frecuencia, la liberación del mitón puede favorecer la deambulación y disminuir el dolor. Otras intervenciones que se realizan ocasionalmente en los pies son la liberación de tendones, amputaciones de falanges distales, artroplastias y resecciones del astrágalo [204].

Debido a que estas deformidades aparecen ya en el primer año de vida, es de suma importancia realizar programas de fisioterapia precoz con utilización de férulas que al menos permiten reducir la gravedad de estas malformaciones.

2.5.9.- Complicaciones internas:

Las complicaciones extracutáneas de la EB hereditaria son diversas. Los principales sistemas afectados son el digestivo, el respiratorio, el ocular, el musculoesquelético (manos y pies) y la cavidad bucal. Existen otras muchas complicaciones asociadas a la EB y que afectan a otros órganos y sistemas.

La miocardiopatía dilatada es una complicación que acompaña a algunos pacientes con EB hereditaria. Esta complicación puede ser mortal y se desarrolla principalmente por la carencia de micronutrientes, la sobrecarga de hierro, la glomerulonefritis y la amiloidosis renal. Todas ellas provocan insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). El riesgo acumulado de ICC en pacientes con EBDR e insuficiencia renal crónica alcanza casi el 19% a los 35 años. Estos pacientes deben tener monitorizados los niveles de carnitina y selenio, pues se han relacionado estas carencias con un mayor riesgo de miocardiopatía dilatada [205, 206].

La formación de ampollas en la mucosa ureteral son causa de obstrucción al flujo urinario y consecuentemente provocan hidronefrosis [207]. Otra lesión común en estos pacientes es la glomerulonefritis secundaria a los procesos infecciosos cutáneos ocasionados por estreptococos [208]. La amiloidosis renal secundaria es otra complicación que acompaña a la EB hereditaria [209].

Aproximadamente uno de cada ocho pacientes afectados de EB hereditaria fallecerá por insuficiencia renal crónica, y por ello es necesario realizar controles precoces para detectar anomalías subclínicas que puedan ayudar a iniciar tratamientos preventivos.

Están descritas múltiples complicaciones del aparato genitourinario, muchas secundarias a la formación de ampollas, cicatrices y secundariamente obstrucción y estenosis. Así se describen: estenosis uretral, estenosis ureteral, cicatrices en el glande, fusión de los labios en la mujer, estenosis del introito vaginal, cistitis, reducción de la capacidad vesical y engrosamiento de la vejiga. Sin embargo la frecuencia de estas complicaciones es relativamente baja y no parece indicado controles exhaustivos ante la ausencia de signos y síntomas [208].



Figura 19: Lesiones perianales y vaginales en una paciente de 4 años afecta de una EBD.

En los pacientes pediátricos afectados con el tipo de EBDR se ha descrito una alta incidencia de osteoporosis [209]. Esta complicación está relacionada con la marcada disminución de la actividad física. La desnutrición crónica, la insuficiencia renal concomitante y los insuficientes aportes de calcio son otras razones para agravar la osteoporosis y la osteopenia.

En las formas graves de EB suele asociarse cuadros de anemia severa. Los factores provocantes son fundamentalmente la pérdida crónica de sangre, hierro y proteínas a través de las heridas que siguen a la ruptura de las ampollas. La ingesta insuficiente de hierro y los cuadros de malabsorción intestinal agravan esta complicación. El tratamiento con suplementos de hierro es difícil por la intolerancia a la ingesta y en ocasiones hay que acudir a las transfusiones sanguíneas.

2.6.- Tratamientos.

2.6.1.- Tratamiento y prevención de heridas:

Todas las formas de epidermólisis bullosas presentan lesiones cutáneas en mayor o menor medida, es por ello que la curación de las heridas provocadas por pequeños traumatismos es un aspecto fundamental en el manejo de esta enfermedad.

La continua formación de ampollas acompañada de un deteriorado estado nutricional hace que las heridas se infecten y se convierten en lesiones crónicas que no cicatrizan. En niños y lactantes las heridas extensas pueden ser causas de infecciones graves, sepsis y muerte.

La protección de la piel de los pacientes con EB es fundamental y por ello la manipulación de las heridas debe ser sumamente cuidadosa. El uso de ropa suave así como guantes y calcetines va a evitar la provocación de roces y consecuentemente heridas.



Figura 20: Paciente afecto de EBDR con sonda de gastrostomía para alimentación, extremidades en "mitón" y múltiples protecciones cutáneas.

La mayor parte de las heridas están cubiertas por vendajes o por material estéril no adhesivo. Es aconsejable retirar a diario las capas externas del vendaje y después empapar ligeramente los apósitos adheridos situados debajo, ya sea mediante baño o aplicando compresas empapadas en agua. Por lo general, los pacientes mayores pueden cambiarse ellos mismos los apósitos, pero en el caso de los niños serán los padres, o el personal de enfermería los encargados de ayudar al niño en esta tarea. Es muy útil cubrir la superficie de la herida con una pomada o una crema, que puede contener uno o más antibióticos. Para evitar que una ampolla a tensión e intacta crezca más y agrande la herida, se realizará el drenaje de la misma en condiciones estériles.



Figura 21: Lactante con sonda de gastrostomía y múltiples lesiones en cara, torso y extremidades.

La capacidad y rapidez de curación de las heridas en estos pacientes va a estar influenciada por el estado nutricional así como la existencia o no de anemia. Esto hace necesario corregir estos factores para obtener una adecuada cicatrización de las heridas.

Para facilitar la curación de las úlceras, debe eliminarse todo tejido necrótico y material extraño. El apósito ideal para la EB debe tener como objetivo mantener niveles de humedad adecuados, ser antiadherente y atraumático, favorecer un lecho sano de la herida, reducir el dolor, estar disponible en varios tamaños para adecuarse a la zona que debe cubrir y acelerar la velocidad de reepitelización. La elección del apósito dependerá también del tipo de EB, de la necesidad relativa de protección mecánica, de la cantidad de exudado y de la presencia de colonización grave o de infección. Las preferencias de la familia o del paciente, así como el coste, son también factores que determinarán la elección del apósito. Los apósitos blandos de silicona como el Mepitel[®] cumplen muchos de estos requisitos y, por tanto, son muy utilizados en las heridas de la EB [210]. Es importante conseguir un equilibrio de humedad adecuado para facilitar la curación de las heridas de la EB, en lo que puede influir la elección del apósito adecuado. Los apósitos de hidrogel son útiles en las heridas más secas, pues ayudan a mantener un medio húmedo para la cicatrización, al tiempo que reducen el dolor y el prurito.

En las heridas con humedad moderada los apósitos acolchados pueden ser útiles, pues eliminan el exceso de exudado del lecho de la herida. Las heridas con exudación muy abundante pueden requerir apósitos con una capacidad de absorción especial para eliminar el exceso de líquido y evitar la maceración de la herida y la afectación de la piel circundante.

La EB simple presenta problemas especiales, ya que pueden formarse ampollas alrededor de los bordes de los apósitos convencionales, o incluso debajo de ellos. La aplicación de almidón de maíz sobre ampollas perforadas

puede ayudar a secarlas, reduciendo el roce y evitando que se peguen, además de eliminar la necesidad de utilizar apósitos.

La colonización por bacterias y la infección retrasarán o impedirán la curación, por lo que la infección deberá confirmarse mediante exudado de la herida ante la sospecha clínica [211]. Por lo general, los antibióticos tópicos deberán utilizarse sólo durante periodos cortos debido a problemas de resistencias y a la posibilidad de sensibilización.

Para el baño de las heridas se puede utilizar ácido acético en solución al 0,25% o en compresas durante 15 a 20 min diarios, que puede ser muy útil para reducir la presencia de bacterias, especialmente si se sospecha sobrecrecimiento de pseudomonas. Si se produce escozor intenso, se utilizarán concentraciones más bajas. La plata se ha utilizado mucho en heridas infectadas, tanto en apósitos de plata especializados como en crema de sulfadiacina argéntica. Existe la preocupación teórica por la posible absorción sistémica de la plata utilizada en estos productos, pero apenas hay datos en pacientes con EB.

Es importante recordar que los pacientes con EB, especialmente con EB distrófica recesiva, tienen mucho mayor riesgo de presentar carcinomas espinocelulares. Los tumores pueden parecerse a la piel no cicatrizante habitual de la EB, por lo que deberán obtenerse muestras de biopsia para estudio histológico en todas las zonas de destrucción de la piel clínicamente sospechosas o en aquellas que no curan después de llevar a cabo todas las medidas de cuidado de las heridas oportunas.

En algunos estudios se ha demostrado que la fenitoína es útil para el tratamiento de la EB distrófica recesiva y para reducir el número de ampollas

[212]. Sin embargo, y a pesar de los estudios mencionados anteriormente, en un gran estudio llevado a cabo por el Epidermolysis Bullosa Study Group no se observó eficacia de la fenitoína en el tratamiento de la epidermólisis bullosa distrófica [213].

Se cree que la aplicación tópica de timosina β 4 potencia la curación de las heridas en pacientes con EB hereditaria. Parece ser que los mecanismos implicados son el favorecimiento de la migración y la adherencia de los queratinocitos en las heridas o la regulación positiva de una o más proteínas de la matriz extracelular, con funciones esenciales conocidas en el mantenimiento de la integridad de la unión dermoepidérmica [214].

Recientemente se han desarrollado estrategias experimentales de tratamiento de las heridas, una de ellas sería el equivalente de piel «híbrido» modificado por ingeniería de tejidos, que contiene queratinocitos de pacientes con EB distrófica y fibroblastos de donantes sanos, que se cree suministran cantidades suficientes de colágeno VII, proporcionando utilidad terapéutica al injerto de equivalente de piel [215].

Se están probando en ensayos clínicos varios productos que contienen fibroblastos autógenos o alógenos, para el tratamiento de heridas crónicas. Se han realizado recientes avances en el desarrollo de sustitutos de la piel y sistemas «inteligentes», como nanopartículas y microesferas, para liberar factores de crecimiento, fármacos, ácidos nucleicos o todos ellos. El descubrimiento de que el factor de crecimiento transformante β 3 (TGF β 3), que está elevado en queratinocitos y fibroblastos fetales y disminuido en adultos, mejora llamativamente la curación de las cicatrices quirúrgicas, podría resultar de gran utilidad en el tratamiento futuro de las heridas de la EB

2.6.2.- Manejo del dolor:

El dolor es una característica general en todas las formas de EB y su tratamiento es fundamental para el bienestar y la calidad de vida del paciente. El dolor crónico puede suponer una gran carga para el niño y para la familia, dificultando el funcionamiento social y la asistencia a la escuela.

El origen del dolor en pacientes con EB es múltiple y, a menudo, difícil de tratar. El dolor puede ser agudo por las ampollas y heridas cutáneas de la cavidad bucal, el reflujo gastroesofágico, las estenosis o los espasmos esofágicos, la afectación dental, las erosiones corneales o las fisuras anales. El dolor también puede ser crónico por inflamación persistente de la piel, dolor neuropático, dolor óseo, o provocado por las múltiples intervenciones e incluso por los cambios de apósitos. Incluso las formas más leves de EB pueden causar importante sufrimiento y limitación de las actividades normales de la infancia.

A partir de los 8 años de edad, los niños pueden generalmente utilizar las mismas escalas analógicas visuales que los adultos, lo que implica calificar la intensidad del dolor en una regla horizontal. En los niños de 3 a 4 años, las medidas de autovaloración utilizan escalas de «caras» (que consisten en una serie de fotografías o dibujos de caras que muestran grados de sufrimiento cada vez mayores) o escalas analógicas de colores (p. ej., reglas con intensidades crecientes del color rojo que indican intensidad creciente del dolor) [216, 217]. Los lactantes y niños muy pequeños pueden ser los más vulnerables a la hora de identificar el dolor. En ellos, se utilizan la observación de la conducta como la expresión facial, respuestas motoras de tronco y

extremidades, o variaciones de características fisiológicas (frecuencia cardíaca) o la combinación de estas formas de medida indirecta [218].

Fine y cols. estudiaron el dolor relacionado con la EB en 425 pacientes con EB hereditaria sometidos a seguimiento longitudinal cada 2 años, dentro del proyecto del NEBR, entre 1992 y 2002. Se realizó una estimación media del nivel diario de dolor relacionado con la EB, mediante valoración con una escala lineal de 0 (ausencia de dolor) a 10 (dolor insoportable) [219]. El dolor cutáneo durante la infancia fue una característica frecuente sobre todo en la EBDR. En esta cohorte de pacientes en particular, sólo el 5% de todos los niños con EBDR y el 9% de los adultos con EBDR comunicaron ausencia de dolor, en comparación con el 12%-14% de los que padecían EBS, EBJ y EBDD. Esta observación era compatible con el grado de pérdida de la superficie cutánea en la mayor parte de pacientes con EBDR, así como también con la profundidad relativa de las lesiones en este tipo en particular de EB, lo que podría esperarse que estuviera asociado a la exposición de las terminaciones de los nervios cutáneos de la dermis en estas heridas [219].

Además de las estrategias de tratamiento farmacológico y psicológico, la prevención del dolor desempeña un papel muy importante. Una buena técnica de cambio de vendajes probablemente sea uno de los factores más importantes para el control del dolor a largo plazo en pacientes con EB. Los apósitos deben cambiarse con frecuencia para controlar la formación de ampollas y para prevenir posibles infecciones y contracturas debilitantes. Se deben de utilizar apósitos atraumáticos antiadherentes para proporcionar alivio a las heridas y también para reducir el dolor durante las curas para el cambio de apósitos. A menudo, los apósitos se retiran durante el baño o utilizando

compresas húmedas para reducir al mínimo las molestias, aunque a pesar de una asistencia de enfermería óptima, estas intervenciones pueden ser dolorosas y mal toleradas. Cuando se necesitan analgésicos, puede ser suficiente con una combinación de paracetamol y un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) adecuado para los cambios de apósitos de heridas pequeñas. Para el dolor asociado a la cura de heridas más grandes, especialmente para el cambio de apósitos en el postoperatorio, puede ser necesaria analgesia más potente y sedación.

Fisioterapia e hidroterapia son otras modalidades que pueden resultar beneficiosas para el control del dolor y para mantener la movilidad y reducir la formación de contracturas [220]. En ocasiones, es necesario recurrir a una dieta blanda debido al dolor bucal y a la disfagia. El estreñimiento, las fisuras anales y las ulceraciones perianales se pueden tratar con laxantes y aumento del contenido en fibra de la dieta. Otra fuente de dolor crónico a largo plazo son las enfermedades dentales y periodontales. Por tanto, se debe insistir a todos los pacientes en mantener una buena higiene dental, aunque a veces pueda resultar muy doloroso.

En la fase aguda de la formación de ampollas, la expansión de las ampollas que a menudo están a tensión, puede ser extremadamente dolorosa y molesta. El drenaje de las ampollas por lo general proporcionará cierto alivio y la aplicación de cloruro de etilo en pulverización inmediatamente antes puede ayudar también a reducir la intensidad del dolor.

El dolor bucal secundario a erosiones y ulceraciones se puede reducir utilizando geles y pulverizadores de anestésicos locales dentales o también colutorios. El reflujo gastroesofágico, una complicación que puede aparecer en

todos los tipos de EB, pero especialmente en las formas graves de EBJ y EBDR, se debe tratar con bloqueantes H-2 como ranitidina o cimetidina y, si fuera necesario, añadiendo un inhibidor de la bomba de protones. El dolor de las fisuras anales se puede aliviar con laxantes emolientes, lubricantes y utilización de anestésicos tópicos. Ante la presencia de fisuras graves y persistentes, puede ser necesaria la intervención. Las erosiones corneales pueden ser especialmente dolorosas y pueden ser útiles los colirios y las pomadas lubricantes.

Para el dolor leve, se pueden utilizar analgésicos simples, como paracetamol, solos o combinados con antiinflamatorios no esteroideos (AINE), como ibuprofeno o diclofenaco. Para el dolor más intenso pueden ser necesarios opioides, como fosfato de codeína o sulfato de morfina. Entre los efectos secundarios más habituales se encuentran depresión respiratoria leve, náuseas, íleo, prurito, retención urinaria y, cuando se utiliza durante periodos de tiempo más largos, a menudo causan estreñimiento crónico, asociado a defecación dolorosa y dolor abdominal.

Para intervenciones dolorosas de corta duración, es útil el fentanilo por su rápido comienzo de acción. Los fármacos analgésicos reducen la sensación de dolor, pero la ansiedad y el desánimo pueden permanecer. Por tanto, en presencia de ansiedad importante, suele ser útil recurrir a una combinación de analgesia, intervenciones sobre la conducta cognitiva y a un ansiolítico tipo midazolam. El efecto ansiolítico satisfactorio con midazolam se puede observar ya a los 30-45 min. El principal riesgo es la sedación exagerada o la depresión respiratoria por sobredosificación accidental o la utilización concomitante de otros medicamentos.

Además del tratamiento farmacológico del dolor, los métodos psicológicos de control del dolor pueden ser muy beneficiosos. Las estrategias cognitivo-conductuales, como la distracción, las imágenes guiadas y la hipnosis realizadas por especialistas expertos son útiles en algunas situaciones y por lo general son muy bien aceptadas por los niños [221]. En los lactantes y los niños pequeños, las medidas de alivio como los abrazos, envolverlos en arrollos y darles de mamar puede reducir las respuestas conductuales y fisiológicas al dolor agudo. No se consideran medidas sustitutivas de la analgesia, pero por lo general son fáciles de llevar a cabo y pueden ser especialmente eficaces para reducir la incomodidad y el sufrimiento provocados por los episodios dolorosos.

Cada vez se reconoce más la importancia de la participación de los padres en el tratamiento del dolor. Sin embargo, a veces los padres subestiman el dolor y no llevan a cabo el tratamiento suficiente. Para evitar que esto suceda, se han diseñado herramientas de valoración del dolor para los padres, que les ayuden a identificar mejor el dolor de sus hijos y que les sirvan de guía para su tratamiento [222].

2.6.3.- Tratamiento del prurito:

El prurito es un síntoma importante de muchas enfermedades cutáneas y generales, pero es también un síntoma frecuente y a menudo muy molesto en la EB [223]. Resulta especialmente problemático en pacientes con EB distrófica (EBD) y en la forma de Dowling Meara de la EB simple (EBS), aunque también se ha registrado prurito en todas las demás formas de EB [224, 225]. Las supuestas razones del prurito en estos casos son el proceso de cicatrización de las heridas que necesariamente es constante, la sequedad de la piel en la zona de la herida y la inflamación leve con activación de los mastocitos. Además, el roce crónico y el rascado provocan lesiones cutáneas secundarias, como erosiones, excoriaciones y costras que provocan la liberación de mediadores inflamatorios que pueden inducir o agravar la sensación de prurito, originando un ciclo de picor-rascado.

En 1994, McGrath y cols. describieron un subtipo clínico diferente de EBD denominado EB pruriginosa (EBP), que se caracteriza por prurito intenso, lesiones nodulares tipo prurigo liquenificadas, localizadas en su mayor parte en las extremidades inferiores y en las caras extensoras de los antebrazos, distrofia ungueal y presencia variable de lesiones albopapuloides [226]. El diagnóstico de EBP puede ser difícil, especialmente porque es rara la presencia de ampollas intactas y la aparición de los síntomas clínicos puede que no se produzca hasta varios años después del nacimiento. En algunos casos, la aparición de la enfermedad se retrasa aún más, hasta la segunda o tercera década de la vida [226]. Así, la EBP se puede confundir con enfermedades adquiridas, como prurigo nodular (prurigo nodularis), liquen simple crónico, liquen plano, cicatrización hipertrófica o dermatitis simulada.

Por ahora se desconoce la causa del intenso prurito en los pacientes con EBP.. En la bibliografía sobre la EBP, se han comunicado hasta ahora más de 15 mutaciones diferentes con patrones de herencia autosómica dominante, autosómica recesiva y de herencia esporádica [226].

El tratamiento médico del prurito en la EB, y especialmente en la EBP, es a menudo muy difícil y en su mayor parte sintomático. Los primeros pasos, y los más importantes, en el tratamiento del prurito son las medidas generales que reducen el picor y el tratamiento específico de una posible causa subyacente del prurito, como por ejemplo, déficit de hierro, atopia u otros. La identificación y el tratamiento de la causa subyacente es el tratamiento más efectivo del prurito.

Por lo general, a un paciente con prurito generalizado se le debe aconsejar que mantenga el cuerpo fresco, ya que la intensidad del picor suele aumentar si la piel está caliente. La aplicación de compresas frías y los baños fríos pueden ayudar a aliviar el picor. Además, el mantenimiento de un ambiente fresco en el hogar y en el lugar de trabajo también es útil. La utilización de ropa ligera y no irritante, de ropa de cama ligera y una ducha fría antes de acostarse, son medidas que ayudan al paciente a estar más cómodo durante la noche.

La aplicación tópica de mentol en crema de calamina también resulta beneficioso para la mayoría de los pacientes, ya que proporciona sensación de frescor a través de los canales de los receptores nociceptores aferentes TRP termosensibles.

La piel seca, especialmente en pacientes con EB, es casi siempre pruriginosa y se debe corregir mediante hidratación. Los pacientes deben evitar

los baños frecuentes y calientes, así como el uso excesivo de jabones y de otros productos irritantes que sequen aún más la piel. Aunque es difícil de llevar a cabo, será preciso explicar claramente la importancia de romper el ciclo de picor-rascado, ya que el rascado aumenta el picor. Además, llevar las uñas recortadas o el uso de guantes de algodón por la noche, puede ayudar a evitar el rascado inadvertido durante el sueño. El aprendizaje de métodos de relajación o la psicoterapia pueden ayudar al paciente a afrontar el prurito crónico.

En pacientes con EBP, se ha comunicado que el uso de corticoesteroides tópicos potentes y de triamcinolona intralesional, reducen el prurito en algunos casos, pero no consiguen mejorías mantenidas [226]. Además, el uso prolongado de corticoesteroides tópicos empeora la fragilidad de la piel al inducir atrofia cutánea importante y puede causar problemas sistémicos, como acné, hiperglucemia, retraso del crecimiento e insuficiencia suprarrenal cuando se aplica en zonas grandes de la piel.

El tratamiento sistémico con antihistamínicos, corticoesteroides o etidronato, se ha probado con éxito variable en la EB, pero no ha mostrado efecto mantenido [223, 226]. Los antihistamínicos suelen ser poco eficaces, a menos que el prurito esté mediado principalmente por histamina, aunque la acción sedante de los antihistamínicos H1 de primera generación puede ser útil en algunos casos.

Está claro que no resulta fácil encontrar una solución satisfactoria para este desafiante problema, pero en muchos casos es posible conseguir al menos cierto alivio del prurito mediante una combinación de medidas generales y específicas.

2.6.4.- Intervenciones quirúrgicas:

Los pacientes con epidermólisis bullosa (EB) y, especialmente, los que padecen la forma distrófica recesiva (EBDR) de esta enfermedad, a veces necesitan tratamiento quirúrgico en la cavidad bucal, el aparato digestivo y las manos. Son varios los problemas a los que suele enfrentarse el anestesista, entre ellos la presencia de microstomía, anquiloglosia y ampollas en la cavidad bucal y, en algunos casos, la necesidad de realizar una traqueostomía.

En la preparación preoperatoria de niños con microstomía, recomendamos la realización diaria de ejercicios con espátulas de madera, para ensanchar lo más posible la apertura de la cavidad bucal. Cuando se tiene planificado efectuar el tratamiento con anestesia, conviene coordinar la realización de la mayor cantidad posible de tratamientos quirúrgicos necesarios, para evitar la administración repetida de anestésicos. Por ejemplo, el dentista puede tratar las caries dentales y los cirujanos dilatar el esófago, colocar una sonda para gastrostomía para tratar la disfagia y la desnutrición, o corregir las pseudosindactilias para mejorar la funcionalidad de las manos. El equipo debe quedar formado y su trabajo planificado con antelación al tratamiento. Además, es necesaria la cooperación coordinada de diversos especialistas.



Figura 22: Intubación quirúrgica con ayuda de broncoscopio flexible para proceder a realizar una intervención quirúrgica en un paciente con EBD.

El personal encargado del tratamiento de estos pacientes debe ser consciente de la fragilidad de su piel y de la necesidad de evitar el uso de esparadrapo de cualquier tipo [227]. Esto es importante durante la fijación de catéteres intravenosos, la monitorización durante la anestesia, la colocación de los paños quirúrgicos en el quirófano y el uso de electrocauterización durante la operación. Algunos pacientes tienen, además, afecciones oculares, como el síndrome de sequedad ocular y erosiones o ampollas en la córnea. Durante la operación, se debe mantener lubricados los ojos del paciente y es recomendable realizar una exploración oftalmológica postoperatoria. Los cuidados postoperatorios deben estar también a cargo de un equipo interdisciplinar.

Las deformidades más graves de las manos se ven en niños con EBDR. En este grupo, la gravedad de las afecciones varía dentro de un amplio rango, dependiendo del subtipo, y va desde una actividad manual casi normal hasta la pseudosindactilia grave, con las manos cubiertas en mitón y contracturas de las muñecas [228].

Habitualmente, los niños en edad preescolar acuden por primera vez a la consulta de cirugía llevados por sus padres, con el fin de que puedan aprender a escribir en la escuela. Antes de la edad escolar, la mayoría de los niños se manejan bien y no existe el deseo de separar los dedos. Los niños con EBDR deben ser valorados en el primer o segundo año de vida, para comenzar desde entonces la aplicación de vendajes y férulas en los dedos, y retrasar así la fusión de los mismos. Las deformidades de las manos pueden ser cutáneas, articulares, o ambas. Entre las afecciones cutáneas se encuentran cicatrices retráctiles, ausencia de uñas, atrofia de las partes blandas de las puntas de los dedos, presencia de un capullo dérmico y pseudosindactilia. Las manifestaciones articulares pueden consistir en contracturas en flexión de los dedos en las articulaciones interfalángicas y metacarpofalángicas. Las

contracturas de evolución prolongada ocasionan disminución del volumen de partes blandas por el escaso uso de los músculos de la mano, acortamiento de los tendones flexores o subluxación de las articulaciones [229]. Los paquetes vasculonerviosos de los dedos también pueden estar contraídos, lo que da lugar a isquemia durante la retracción de los dedos. El tratamiento quirúrgico de la mano debe realizarse antes de que las deformidades sean irreversibles.

En la mayoría de los pacientes, la contractura de los dedos ejerce poco efecto sobre las estructuras profundas, lo que permite un buen funcionamiento de los dedos después de la liberación de la piel y el tejido subcutáneo.



Figura 23: Postoperatorio de sindactilia en "miton" intervenida.

El objetivo del tratamiento quirúrgico es mejorar el funcionamiento de la mano, especialmente la prensión y la pinza digital. Para ello, son necesarias la abducción y extensión de todos los dedos de la mano. La flexión dorsal de la muñeca y la extensión de la palma de la mano son importantes para lograr un máximo de movilidad y el uso de las manos en las actividades diarias. La técnica quirúrgica utilizada en cada caso dependerá de la gravedad de la afección, pero en todos los casos se realiza la liberación de la piel y los tejidos blandos, para preservar los paquetes vasculonerviosos.

Las recurrencias pueden ser más frecuentes en la mano dominante que en la no dominante [230], ya que la reaparición de ampollas en las manos causa pseudosindactilias. Por otro lado, hemos visto que en algunos pacientes las contracturas y pseudosindactilias suelen reaparecer antes en la mano no dominante que en la dominante, ya que probablemente en estos pacientes la mayor utilización de la mano dominante tenga un efecto protector. Muchos de nuestros pacientes prefieren llevar vendajes en las manos de forma más o menos permanente para evitar nuevas ampollas.

La estenosis esofágica se trata mediante diversos métodos, como el uso de esteroides, la dilatación con balón esofágico y las intervenciones de sustitución [231]. Se han utilizado esteroides, tetraciclinas y fenitoína por vía sistémica, pero ninguno de ellos ha demostrado efectos beneficiosos [232]. La dilatación esofágica está indicada cuando las estenosis causan disfagia u obstrucción de mayor o menor grado. El uso de balones dilatadores inflables, que producen presiones radiales en el lugar de la estenosis, parece causar menos traumatismo mecánico [232]. Antes de efectuar la dilatación es muy recomendable realizar una exploración radiográfica de todo el esófago, con medios de contraste hidrosolubles, para determinar la localización, el número y la gravedad de las estenosis, si existen membranas y si existe reflujo gastroesofágico.

Debido a que la mayoría (50%) de las estenosis se originan en la parte proximal del esófago y, por tanto, hay riesgo de broncoaspiración, es preferible usar medios de contraste hidrosolubles para su estudio. La profilaxis precoz con antibióticos suele evitar la mediastinitis.

La colocación de una sonda de gastrostomía está indicada cuando el desarrollo ponderoestatural está claramente por debajo de los percentiles esperados, la insuficiente ingesta por disfagia conlleva desnutrición y un claro favorecimiento de infecciones. La ventaja de la colocación precoz de una sonda de gastrostomía es la

mejor aceptación del dispositivo y la menor percepción por parte del niño de la alteración de su imagen corporal. Además, la gastrostomía precoz reduce la aversión a la comida, y suele mejorar la desnutrición y el retraso del crecimiento. Gracias a la mejora del estado nutricional, suele mejorar la cicatrización de heridas. Entre las desventajas de la sonda de gastrostomía se encuentran la aversión de los pacientes al botón, el riesgo de infección alrededor del botón, las dificultades con el dispositivo, la reducción de la ingesta oral, la enuresis cuando se administran los alimentos durante la noche y el empeoramiento del reflujo gastroesofágico. La gastrostomía hace innecesaria la colocación de sondas nasogástricas, lo que evita heridas nasales y faríngeas, evita molestias derivadas de su posición permanente y puede reducir la necesidad de una plastia del esófago.



Figura 24: Imagen de botón de gastrostomía con protección cutánea para evitar lesiones por erosión.

Se han utilizado con éxito diferentes técnicas para la colocación de una sonda de gastrostomía en pacientes con EB. Se puede realizar una gastrostomía mediante técnicas abiertas, laparoscópicas o percutáneas (GEP); para esta última puede emplearse una técnica endoscópica o una no endoscópica.

Cuando el trayecto de la gastrostomía ha cicatrizado y se mantiene sin problemas, se puede cambiar la sonda original por botones de gastrostomía de perfil bajo. Algunos especialistas utilizan dispositivos de botón como opción principal. A las

24 horas de la intervención se comienza la administración de agua y, posteriormente, se inicia la alimentación con alimentos ricos en nutrientes.

2.6.5.- Soporte nutricional:

El mantenimiento activo del refuerzo nutricional en la EB va a mejorar la resistencia a la infección, el crecimiento, la cicatrización de las heridas y la calidad de vida global. No obstante, los intentos de mejorar el estado nutricional con frecuencia encuentra impedimentos, como el cuidado inadecuado de la piel, la presencia de caries dentales y enfermedades periodontales, el reflujo gastroesofágico (RGE), la impactación fecal y los problemas psicológicos y psicosociales. Además, los padres de los niños gravemente enfermos priorizan inevitablemente los aspectos del cuidado del niño, y suelen conceder menor prioridad al cumplimiento de las recomendaciones dietéticas.

El deterioro nutricional es directamente proporcional a la gravedad de la EB y se produce sobre todo en los tipos generalizados de EB distrófica recesiva (EBDR) y EB juntural (EBJ). En estos pacientes, la afectación de múltiples sistemas afecta directa o indirectamente al estado físico del niño.

El deterioro nutricional es resultado del estado hipercatabólico en el cual las lesiones cutáneas abiertas con inflamación, la pérdida de sangre y líquido seroso y la infección contribuyen en conjunto al aumento de las necesidades nutritivas. Como ocurre en el paciente con quemaduras térmicas, las necesidades de nutrientes son reflejo de la gravedad de las lesiones. Las complicaciones bucales, orofaríngeas, esofágicas y gastrointestinales limitan la ingesta, afectan a la absorción y agravan el estado de desnutrición. La impactación fecal, el estreñimiento crónico y el dolor al defecar por fisuras o estenosis son extremadamente comunes y frecuentemente ocasionan apatía y anorexia secundaria [233].

En la EBD se ha documentado enfermedad intestinal inflamatoria [234] y los resultados de la biopsia de la mucosa gastrointestinal han mostrado alteraciones inflamatorias que podrían deberse a una adhesión celular deficiente, cuyo resultado podría ser una alteración de la permeabilidad mucosa [235].

A pesar de los avances en materia de nutrición, pocos niños con EB experimentan mejoras asociadas de la cicatrización, lo cual es desalentador pero no inesperado, si se tienen en cuenta los defectos propios de la piel en la EB. A pesar de ello cuando se sospecha una carencia o desequilibrio se deben realizar todos los esfuerzos posibles para optimizar el aporte nutricional.

En el mercado existen fórmulas «inmunoenriquecidas» destinadas a los adultos, que contienen nutrientes como arginina, glutamina y ácidos grasos esenciales, las cuales estimulan la cicatrización, optimizan el estado inmunitario y repercuten de forma positiva en las enfermedades inflamatorias [236], sin embargo aún no se ha probado su eficacia en pacientes con EB.

La determinación de la velocidad del aumento del peso y la talla son los recursos más prácticos para valorar el crecimiento, por lo que deberá realizarse cada 3-6 meses, con más frecuencia en lactantes y niños muy pequeños. En los niños menores de 2 años se debe medir el perímetro cefálico y comprobar los valores con las curvas de crecimiento aprobadas en el país. Aunque el objetivo es que el niño crezca conforme a sus posibilidades genéticas, el crecimiento longitudinal en particular a menudo es deficiente en los niños gravemente afectados por la EB. Se considera que la inflamación crónica y las citoquinas proinflamatorias tienen cierta responsabilidad en ello, aunque el mecanismo no está claro. Se ha propuesto que los niños con EBDR pesan al

nacer bastante menos que los niños sanos, y que la afectación del crecimiento comienza en la etapa fetal [237]. Así, aunque es útil comprobar las curvas de crecimiento, las estimaciones siempre deben considerarse en el contexto de la gravedad de la enfermedad y los objetivos se deben ajustar en consecuencia. Las dolorosas contracturas fijas en flexión alrededor de las articulaciones y la osteoporosis que se producen en los niños gravemente enfermos hacen difícil o imposible medir la talla.

Es posible que las lesiones graves, especialmente cuando existe sepsis, aumenten las necesidades nutritivas [238]. Las necesidades energéticas varían entre 130 y 180 kcal/kg/24h. (115% a 150% de las necesidades medias estimadas), y pueden ser de hasta 225 kcal/kg/24h. Las necesidades de proteínas oscilan entre 2,5 y 4g/kg y las de líquidos entre 150 y 200 ml/kg. Las ampollas extensas provocan pérdida de líquidos y pueden requerir proporcionalmente mayores volúmenes de nutrientes.

La lactancia materna debe fomentarse por los muchos beneficios que confiere. Sin embargo, la estimulación del reflejo de succión puede causar lesiones orales o exacerbarlas y la succión puede conducir a la formación de ampollas en la boca, la lengua y las encías. A los lactantes se les debe permitir mamar a demanda, y para reducir la fricción se puede aplicar vaselina en los labios y el pezón.

Excepto en los casos leves, la leche materna sola no suele ser suficiente para satisfacer las mayores necesidades nutritivas de estos niños. Debe entonces proporcionarse un alimento con mayor concentración de nutrientes lo cual se puede lograr de varias maneras:

- enriqueciendo la leche materna extraída a base de suero lácteo en polvo, en una concentración de 5 g/100 ml.
- reconstituyendo la fórmula dietética de suero lácteo en polvo a una concentración superior a la normal (p. ej., 15% en lugar del habitual 13%).
- añadiendo polímeros de glucosa en 2-5 g por cada 100 ml, para incrementar aún más el contenido energético y llegar a un contenido total de hidratos de carbono de 10-12 g/100 ml en la fórmula.
- agregando una emulsión lipídica, en incrementos del 1% para obtener una concentración total de lípidos del 5%-6% (5-6 g de grasa por 100 ml de fórmula), cuando la función intestinal es normal.

Se debe tener cuidado al modificar las fórmulas, pues pueden producirse diarreas con una carga osmótica de agua de más de 500 mOsm/kg. Es esencial realizar una revisión periódica del peso y de la calidad de la alimentación.

Cuando las lesiones bucales dolorosas hagan que el niño no desee mamar, se puede aplicar un gel analgésico bucal apropiado para la edad (en el pezón o en la boca). Es extremadamente útil usar un biberón especial diseñado para niños con labio leporino o paladar hendido. La forma de este biberón reduce al mínimo los traumatismos en los bordes de la encía, y su válvula interna y su largo cuerpo permite poder controlar el flujo de alimento, de modo que incluso una succión débil proporcionará un flujo suficiente de leche. Si no se dispone de un biberón de este tipo, se puede ampliar el agujero del biberón

convencional con una aguja estéril. Cuando los lactantes no pueden succionar el pezón, se les puede alimentar con una cuchara o un gotero.

Las necesidades de vitaminas en los lactantes que reciben leche materna o leche maternizada sin enriquecer no suelen ser superiores a las normales. Sin embargo, en caso de duda, se puede administrar un complemento multivitamínico apropiado para la edad, siempre que la ingesta total (sobre todo de vitamina A) no exceda los límites máximos de toxicidad recomendados. Aunque no se han determinado con exactitud las necesidades nutritivas de los niños pequeños que padecen EB, se supone que cuanto mayor es la gravedad de la enfermedad, mayores son las cantidades de todas las vitaminas necesarias [239], especialmente de vitamina C, de importancia reconocida para mejorar la absorción de hierro y para la síntesis de colágeno.

Cuando se considere administrar vitamina D, se debe recordar que los extensos apósitos suelen impedir en gran medida la exposición solar. En caso de hemorragias importantes, se deben evaluar las reservas de hierro y zinc y complementarlos si fuera necesario.

A los niños pequeños con EB se les puede ofrecer alimentos sólidos de la misma forma en que se administran a los niños pequeños sanos, con excepción de los alimentos duros y abrasivos. A menudo, los niños pequeños suelen aceptar nuevos alimentos muy lentamente, así que se debe tranquilizar a los padres para que permitan que el niño avance a su propio ritmo. Se debería utilizar una cuchara de plástico poco profunda, con bordes redondeados, y los niños pequeños que tengan la boca muy frágil se pueden alimentar con mayor confianza directamente de las yemas de los dedos de los padres o se les puede dar trozos de comida blanda.

La reticencia a probar nuevos alimentos es a menudo debido a un RGE anterior (o actual) mal controlado o una boca con lesiones que provocan dolor. La presencia de cicatrices y de una lengua anclada (anquiloglosia) puede hacer que la deglución no sea coordinada y que exista riesgo de broncoaspiración. A los padres se les debe aconsejar cómo aumentar las proteínas de la dieta y el contenido energético sin aumentar el volumen.

Las diarreas prolongadas a menudo son características en la EBJ-H, y se ha sugerido que son resultado de una carencia de integrina intestinal [240]. La sustitución de triglicéridos de cadena larga (TCL) por triglicéridos de cadena media (TCM) en la dieta puede aliviar esta situación, gracias a su metabolismo a través de la vena porta y no a través del sistema linfático.

Los niños de más edad con importantes complicaciones bucales y esofágicas rara vez mantienen un estado nutricional aceptable con los alimentos habituales. Los alimentos líquidos suelen tener bajas concentraciones de todos los nutrientes, a menos que se consuman en grandes cantidades. Las modificaciones en la dieta tienen que ser viables y adecuadas a la dinámica individual de la familia. Lo más importante es conseguir una mayor ingesta proteica y energética, y mejorar la ingesta de vitaminas y minerales según indiquen la valoración dietética y los resultados de las pruebas analíticas. La leche a menudo ocupa un lugar destacado en la dieta de los niños con EB, por lo que el consumo de proteínas y calcio es en general aceptable. Por el contrario, a los niños a los que no les gusta la leche y los que tienen dificultades para masticar y tragar carne siempre requieren refuerzo nutricional.

Los niños que consumen regularmente suplementos con múltiples nutrientes reciben de éstos cantidades adicionales de vitaminas, lo que debería tenerse en cuenta antes de recomendar la administración de nuevos suplementos.

Los niños que mantienen una nutrición oral adecuada a menudo lo consiguen sólo gracias a los extraordinarios esfuerzos de sus padres, lo cual resulta cada vez más difícil de mantener. Es importante no establecer objetivos poco realistas, y se debe vigilar el efecto de la intervención recomendada, teniendo en cuenta un límite de tiempo acordado (p. ej., 2 a 3 meses). Si no se logra la mejora deseada, se deben considerar intervenciones como la dilatación del esófago o la colocación de una sonda de gastrostomía.

La determinación de la velocidad de crecimiento óptima en niños con EB grave es difícil, y siempre debe considerarse en el contexto de la gravedad de la enfermedad de cada niño. El refuerzo nutricional por gastrostomía tiene ventajas claras en la EB, pero puede asociarse a un depósito central de grasa y a un crecimiento lineal deficiente. Las razones son multifactoriales e interrelacionadas, y probablemente se deban menos a la gastrostomía *per se* que a los trastornos en la producción de hormonas del crecimiento mediada por citoquinas y al aumento de la producción de cortisol, propios de las enfermedades inflamatorias crónicas. El niño cuyo percentil de peso está más de dos desviaciones por encima del adecuado para su talla, suele tener menos movilidad y mayor propensión a depender de una silla de ruedas. Es importante mantener un equilibrio entre la movilidad, el crecimiento y el estado nutricional, ya que estos tres aspectos están interrelacionados y son interdependientes. La falta de carga del peso y la dependencia de una silla de ruedas aumentan la osteopenia que con frecuencia se observa en los niños con EBDR y EBJ [241].

La mayor propensión al dolor de origen óseo y a las fracturas conduce a una mayor inmovilidad. Por otro lado, los niños con desnutrición tienen dificultades para llegar a la pubertad y, por ello, de llegar a beneficiarse del efecto protector de las hormonas sobre la salud ósea.

El grado de anemia se corresponde con la gravedad de la EB. Quienes padecen EBDR o EBJ experimentan hemorragias continuas por las lesiones cutáneas, el tubo digestivo alto y posiblemente también en el intestino grueso. La anemia resultante es generalmente microcítica e hipocroma. En la EB grave la inflamación concomitante hace que sea difícil interpretar las pruebas analíticas de las reservas de hierro. Sin embargo, cuando disminuye la hemoglobina, el volumen corpuscular medio (VCM) y la concentración de ferritina y aumenta la capacidad total de fijación del hierro (CTFH), la administración de suplementos de hierro por lo general se realiza por vía enteral. Es preferible un preparado líquido y constituye una guía útil una dosis de 1 ml/kg de peso corporal (5 a 6 mg de hierro/kg) (hasta aproximadamente los 30 kg). Los suplementos de hierro se asocian a menudo a irritación gástrica y estreñimiento.

En la práctica, los medicamentos prescritos en tomas periódicas, pero no diarias, suelen olvidarse, por lo que es más seguro prescribir la administración diaria. Las reacciones adversas se pueden aliviar dividiendo la dosis diaria en dos tomas, aumentando el consumo de fibra y prescribiendo laxantes apropiados o emolientes. Para mejorar la absorción de hierro, puede tomarse al mismo tiempo algún alimento rico en vitamina C, siempre que no irrite la mucosa bucal.

El zinc es un cofactor esencial para más de 200 enzimas, y es de importancia vital en el crecimiento, la cicatrización de heridas, la función inmunitaria y la estabilidad de la membrana celular, donde sus propiedades antioxidantes son esenciales [242]. Sin embargo, el grado de refuerzo deseable no está claro y probablemente son innecesarios consumos excesivos, pues las mejoras de la cicatrización suelen producirse sólo en los estados carenciales. Y más importante aún, se ha documentado que la ingesta excesiva afecta a la respuesta inmunitaria y puede interferir con la absorción de hierro y cobre.

Las náuseas y los vómitos son efectos secundarios frecuentes de los suplementos de zinc y son razones frecuentes del incumplimiento del tratamiento. Es conveniente obtener una determinación de la concentración basal de zinc en plasma, aunque la interpretación de los resultados puede verse complicada por factores como una albúmina plasmática baja, que hace que se obtengan resultados falsamente bajos de la concentración de zinc. En este caso, no está indicado el refuerzo con zinc solamente, sino que debería aumentarse también la ingesta de proteínas y alimentos energéticos. Es preferible un suplemento líquido, como por ejemplo 5-10 ml de solución de sulfato de zinc (30 mg de zinc en 5 ml). Para optimizar la absorción y minimizar las náuseas secundarias, debe fraccionarse la dosis diaria en dos tomas.

Un pequeño número de niños con EBDR grave han presentado miocardiopatía dilatada, que se considera asociada a deficiencia de selenio y carnitina [243]. Sin embargo, estos niños presentaban también desnutrición crónica, por lo que la causa de su miocardiopatía puede haber sido multifactorial. Un estudio más reciente [244] apoya la hipótesis de que el

selenio y la carnitina están implicados en el desarrollo de la miocardiopatía dilatada.

Cuando existen pruebas bioquímicas de carencias nutricionales, debe establecerse la administración del nutriente deficitario y controlarlo periódicamente. Los suplementos de selenio que también contienen vitamina A sólo deben administrarse si la ingesta de vitamina A proveniente de otras fuentes no es considerable.

Los niños que padecen las formas más graves de EB presentan osteopenia y tienen riesgo de mineralización ósea anómala y de fracturas. Ello se debe a factores como la nutrición deficiente, el retraso de la pubertad, la reducción de la movilidad y de los ejercicios con carga y la exposición insuficiente a la luz solar. Aunque los niños con EB que reciben alimentación enteral a través de una gastrostomía obtienen en teoría el calcio que necesitan, las elevadas concentraciones de citoquinas secundarias a la infección o las inflamaciones crónicas pueden afectar negativamente al recambio óseo, así como las complicaciones digestivas pueden dificultar la absorción.

El control actual comprende la determinación de la masa ósea mediante radioabsorciometría de doble energía (DEXA), la determinación bioquímica de calcio y vitamina D y la administración de bifosfonatos con una combinación de calcio y vitamina D [241].

No se deben colocar sondas nasogástricas (NG) de forma habitual. Aunque se tenga mucho cuidado, pueden ocasionar traumatismos y son difíciles de fijar. La fricción interna y las cicatrices que produce el tubo pueden dificultar la alimentación por vía oral. Se cree que las molestias resultantes se asocian a la posterior aversión a la comida y a una mayor tendencia a

presentar estenosis esofágica. Sin embargo, su uso temporal sería inevitable en niños pequeños que no toman volúmenes suficientes de alimentos por vía oral y cuando tienen la boca excesivamente traumatizada por la succión.

Otra indicación para la alimentación por sonda NG a corto plazo sería en la EBDR, cuando las intervenciones odontológicas de gran alcance ocasionan considerables ampollas bucales y faríngeas. Este tipo de intervenciones puede impedir una ingesta aceptable durante varios días. Ya que estas técnicas se realizan con anestesia general, se puede colocar la sonda nasogástrica en el quirófano, así el niño se alimentaría por ella hasta que se pueda reanudar una alimentación suficiente por vía oral. Sea cual fuera la edad del paciente, la sonda debe ser lo más blanda y de un calibre tan estrecho como sea posible, y no debe cambiarse para cada alimentación, sino que se debe dejar *in situ*.

Tras la inserción de la sonda de gastrostomía, es posible que los niños se muestren reacios a continuar con la alimentación oral, y prefieran depender en gran medida o totalmente de la alimentación por gastrostomía. Probablemente ello sea reflejo de la prolongada disposición negativa a la alimentación y del alivio de tener una vía alternativa para satisfacerla.

Sin embargo, es posible que no se toleren bien los grandes volúmenes de alimentos necesarios para fomentar un crecimiento óptimo, tanto si se administran por la noche, durante el día o en una combinación de ambas formas. Para optimizar la tolerancia a los alimentos y fomentar la continuación de la alimentación por vía oral, es recomendable empezar con pequeños volúmenes, lo que puede significar apenas 200 a 250 ml de alimentos con 1,5 kcal/ml para un niño menor de 5 años, y 300 a 500 ml para un niño mayor. Generalmente, son apropiados alimentos con alta densidad de nutrientes que

contengan diferentes fuentes de fibra. A los niños mayores de 3 años se les administran generalmente en la noche, mediante una bomba de alimentación enteral. Algunos niños requieren una combinación de alimentos por la bomba en las noches y en bolos durante el día. No es aconsejable darles alimentos en forma de puré a través de la gastrostomía, debido a la probabilidad de que ésta se obstruya y al peligro de proliferación microbiana. Volúmenes nocturnos de alimentos de más de 800-1000 ml se asocian a menudo a la necesidad de orinar durante la noche (lo que implica interrumpir el sueño del niño, y de uno de los padres cuando se requiera su ayuda), o a enuresis nocturna y en ocasiones, defecación.

El estreñimiento crónico con defecación dolorosa es una de las complicaciones más frecuentes, aunque subestimada, de todos los tipos de EB [245]. Se debe tratar sin demora si se desea evitar el círculo vicioso de dolor, omisión consciente del reflejo gastrocólico y anorexia secundaria. A los niños pequeños se les deben dar más líquidos, en forma de agua o, si la rechazan, en cucharaditas de zumo de fruta fresca diluida en 100 ml de agua o zumos envasados para niños diluidos en igual volumen de agua. Se debe prescribir lactulosa, empezando con 2,5 ml a días alternos hasta llegar a 2,5 ml dos veces al día. A los 9 a 12 meses de edad es aconsejable introducir una fuente de fibra, tanto si el lactante está estreñado como si no lo está, ya que el estreñimiento es una complicación previsible de todos los tipos de EB, y además, un emoliente como la lactulosa en los niños mayores de 2 años.

En el niño mayor, encopresis se confunde a menudo con diarreas. Como resultado se suelen reducir o detener el uso de los laxantes prescritos, con lo cual inconscientemente empeora la situación. Las lesiones bucales, la disfagia

y la necesidad de alimentos con mayor densidad de nutrientes en menor volumen pueden contribuir a que el niño rechace la dieta convencional rica en fibras. Es importante aumentar el consumo de fibra, pero conviene introducir un alimento que contenga fibra, por vía oral o por gastrostomía, pero sólo después de que se haya investigado la magnitud del estreñimiento y éste se haya tratado.

El aporte energético adecuado puede ser inalcanzable sin el consumo frecuente de hidratos de carbono fermentables, especialmente de sacarosa, que por desgracia, es muy propicia para el desarrollo de caries dentales.

3. HIPOTESIS:

La integridad de la piel y su resistencia frente a las agresiones externas se deben a la unión dermoepidérmica, una zona altamente especializada de la lámina basal que fija la epidermis a la dermis. En esta zona existen, junto con moléculas que se localizan a lo largo de toda la lámina basal, unas estructuras denominadas “complejos de anclaje”, que sirven para garantizar la adhesión de las células epiteliales a la matriz extracelular de la dermis. Desde el punto de vista ultraestructural, la lámina basal es una bicapa constituida por la lámina lúcida y la lámina densa. A su vez, los complejos de anclaje están formados por tres estructuras:

- 1- Hemidesmosomas: que son complejos electrón-densos situados en la cara citoplásmica de la membrana plasmática de los queratinocitos basales, en los que se insertan los filamentos intermedios de citoesqueleto (queratinas).
- 2- Filamentos de anclaje: que son delgadas estructuras que atraviesan la lámina lúcida desde los hemidesmosomas hasta la lámina densa.
- 3- Fibrillas de anclaje: que se extienden desde la lámina densa hasta la dermis papilar insertándose en las denominadas placas de anclaje o formando lazos que se anclan de nuevo a la lámina densa.

El principal componente de las fibras de anclaje es el colágeno tipo VII. Actualmente, los estudios de biología molecular y genética han permitido

determinar que las mutaciones en el gen COL7A1, que codifica el colágeno tipo VII, dan lugar a la epidermólisis bullosa distrófica (EBD).

La EBD se asocia con ampollas dermolíticas formadas por debajo de la lámina basal y curan dejando cicatrices y quistes de mijo, incluyendo dos formas principales, que son la dominante de Cockayne-Touraine y la recesiva (EBDR).

La EBDR aunque puede afectar a cualquier zona del tegumento, son más frecuentes las lesiones sobre zonas traumáticas como las manos y los pies, siendo característica la temprana fusión de los dedos por tejido cicatricial, lo que provoca manos y pies en mitones y seudosindactilia. La fusión se realiza en flexión y también es visible en grandes articulaciones (codos, rodillas, tobillos).

Las hipótesis de este trabajo han sido:

Conceptual:

1.- Los pacientes que presentan una EBDR tienen ausencia de colágeno tipo VII en los “complejos de anclaje” que se encuentran en la dermis por debajo de la lámina densa.

2.- Puesto que el colágeno tipo VII es fundamental para mantener la estructura de la unión dermoepidérmica y evitar la formación de ampollas a este nivel, el uso de fibroblastos alogénicos pudiera ser determinante para evitar la formación de ampollas.

Operativa:

1.- **Hipótesis nula 1** es que el uso de fibroblastos alogénicos no mantiene la presencia de colágeno tipo VII en la estructura dermo-epidérmica (complejos de anclaje) de forma definitiva.

Hipótesis alternativa es que el colágeno tipo VII se mantiene durante un tiempo en los “complejos de anclaje” de la unión dermo-epidérmica.

2.- **Hipótesis nula 2** es que tras el uso de fibroblastos alogénicos con colágeno tipo VII no se produce una disminución en la formación de ampollas, signo evidente de malfunción de los “complejos de anclaje”.

Hipótesis alternativa 2 es que tras el uso de fibroblastos alogénicos con colágeno tipo VII se produce una disminución en la formación de ampollas, confirmando la adecuada función de los “complejos de anclaje”.

3.- **Hipótesis nula 3** es que tras el uso de fibroblastos alogénicos no se modifica el tiempo de epitelización no mejorando la cicatrización de la herida provocada (área de obtención de injerto cutáneo)

Hipótesis alternativa 3 es que tras el uso de fibroblastos alogénicos disminuye el tiempo de epitelización provocando una curación más rápida respecto al no uso de este tratamiento.

3. OBJETIVOS:

4.1.- Objetivo principal:

El objetivo principal de este estudio de investigación consistió en evaluar la eficacia del tratamiento en heridas cutáneas mediante la aplicación local de parches de piel quimérica cultivada, frente a la utilización de apósitos oclusivos no adherentes.

Valorar el efecto de queratinocitos autólogos, cultivados con fibroblastos alogénicos (procedentes de donantes) sobre el tiempo y el resultado histológico de la epitelización de lesiones cutáneas de pacientes con epidermólisis bullosa distrófica recesiva en comparación con un apósito oclusivo no adherente.

4.2.- Objetivos secundarios:

Evaluar la persistencia de los fibroblastos implantados en la zona afectada, unión dermoepidérmica, (presencia de colágeno tipo VII) en piel quimérica a los 8 y 12 meses.

Evaluar la persistencia de fibroblastos alogénicos implantados mediante marcadores genéticos a los 3, 8 y 12 meses.

Evaluar la seguridad de la terapia celular con parches de piel quimérica cultivada, en comparación con la utilización de un apósito oclusivo no adherente.

Valorar la tolerabilidad del tratamiento determinando la ausencia de rechazo inmune.

Valorar la tolerabilidad del tratamiento determinando la ausencia de acontecimientos adversos clínicos y analíticos.

5. MATERIAL Y METODOS.-

5.1.- Diseño del estudio:

Estudio comparativo, abierto, prospectivo en el que en cada paciente se realizaron dos procedimientos: implante de un parche de piel quimérica cultivada (terapia experimental) en la mitad de la lesión cutánea y apósito oclusivo no adherente (control) en la otra mitad, durante 12 meses de seguimiento.

- Procedimiento quirúrgico:

Reconstrucción de las comisuras interdigitales en pacientes con sindactilia cutánea severa mediante injertos laminares que se toman de forma uniforme y sistemática con dermatomo eléctrico o de aire comprimido sobre una zona aséptica y con la misma extensión y profundidad en micras en todos los pacientes.

- Periodo de tratamiento:

Inmediatamente tras el procedimiento quirúrgico se procedió a implantar un parche de piel quimérica cultivada (terapia experimental) en la mitad del defecto cutáneo del paciente y un apósito oclusivo no adherente en la otra mitad (control).

- Periodo de seguimiento

Se siguió inicialmente a los pacientes cada dos días hasta que se produjo la epitelización (aproximadamente 21 días desde la intervención quirúrgica) y posteriormente, a los 3, 8 y 12 meses de seguimiento.

Puesto que se trata de una enfermedad hereditaria rara (baja incidencia y prevalencia) se incluyeron de forma consecutiva 12 pacientes que cumplían

los criterios de selección para evitar sesgos de inclusión. Además, puesto que el proceso de epitelización depende de las características individuales de cada sujeto, cada paciente incluido fue a su vez su propio control.

El tratamiento de los defectos cutáneos de estos pacientes con piel quimérica cultivada, constituida por queratinocitos autólogos del paciente y fibroblastos alogénicos (procedentes de donante) que son capaces de sintetizar colágeno tipo VII y, por tanto, restaurar la integridad normal de la unión dermo-epidérmica, se espera que no sólo aumente la velocidad de epitelización de estos defectos cutáneos, sino que evite a largo plazo la recidiva de la enfermedad de base en las áreas implantadas. Por tanto, el control en nuestro estudio fue el empleo de dichos apósitos. El tratamiento de las úlceras de estos pacientes se realizó con apósitos oclusivos no adherentes de manera electiva.

5.2.- Selección de los pacientes:

Se seleccionaron pacientes con Epidermolisis Bullosa Distrófica Recesiva diagnosticada por criterios clínicos e histológicos con sindactilia cutánea severa que fueron sometidos a cirugía reconstructiva. Se incluyeron hasta un total de 12 pacientes.

5.3.- Criterios de inclusión:

Los pacientes incluidos en el estudio debieron de cumplir todos y cada uno de los siguientes criterios:

- Pacientes de ambos sexos mayores de 28 días.

- Pacientes con Epidermolisis Bullosa Distrófica Recesiva, diagnosticada por criterios clínicos e histológicos, con sindactilia cutánea severa en los que estaba indicada cirugía reconstructiva.
- Pacientes cuyos tutores legales otorgaron el consentimiento informado por escrito para la participación en el estudio previo a la realización de cualquier procedimiento descrito en el mismo.
- Pacientes con edad ≥ 12 años que otorgaron el consentimiento informado por escrito para la participación en el estudio previo a la realización de cualquier procedimiento descrito en el mismo.

5.4.- Criterios de exclusión:

Los pacientes que presentaron uno o más de los siguientes criterios no fueron incluidos en el estudio:

- Mujeres en edad fértil que no utilizaban métodos anticonceptivos eficaces (anticoncepción oral).
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- Hipersensibilidad conocida ó sospechada a cualquier de los agentes terapéuticos incluidos en el estudio, incluidos fármacos anestésicos.
- Pacientes con antecedente de tumor maligno en los últimos 5 años.
- Pacientes con diagnóstico de tuberculosis activa en el momento de la inclusión.
- Pacientes con marcadores positivos previos para cualquiera de los siguientes patógenos: hepatitis B y C, VIH-1, VIH-2.

- Pacientes con historia de enfermedad hepática, gastrointestinal, hematológica, pulmonar o neurológica, no relacionada directamente con la Epidermolisis Bullosa, clínicamente relevante.
- Cualquier otra situación médica que a juicio del investigador podía interferir con la participación óptima en el estudio o producir un riesgo significativo para el paciente.
- Alcoholismo, drogadicción, patología psiquiátrica u otros factores presentes en los tutores legales que a juicio del investigador pudieran complicar la participación del paciente en el estudio.
- Pacientes que habían participado en otro estudio en los 30 días previos o en los que se había planeado su participación simultáneamente en otro estudio.
- Pacientes menores de edad, cuyos tutores legales no otorgaron el consentimiento informado para participar en el estudio.
- Pacientes ≥ 12 años que no otorgaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

5.5.- Duración de la investigación:

El estudio tuvo una duración de 12 meses de seguimiento desde la realización del procedimiento quirúrgico.

5.6.- Descripción del tratamiento:

Los tratamientos administrados fueron:

- Tratamiento experimental: bicapa de piel compuesta por queratinocitos del paciente (autólogos) y fibroblastos de un donante (alogénicos) embebidos en una matriz plasmática (Cx501).
- Control: fue el apósito estéril Allevyn (Smith and Nephew) que no contiene ningún principio activo. Apósito trilaminar de poliuretano.

Identificación de los productos de investigación:

- Tratamiento experimental:
 - o Forma farmacéutica: Parche
 - o Vía de administración: Tópica
 - o Grupo terapéutico: Terapia celular
- Apósito estéril Allevyn:
 - o Forma farmacéutica: Apósito oclusivo no adherente de poliuretano.
 - o Vía de administración: tópica

Método de asignación de tratamientos a los pacientes:

Cada paciente recibió el tratamiento experimental en la mitad del defecto cutáneo antebraquial y en la otra mitad (control), de modo que no fue necesario el proceso de aleatorización.

5.7.- Diagrama de estudio:

Tiempo -2:

- Tiempo -2 ó de selección: Todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y de exclusión detallados anteriormente fueron incluidos en el tiempo de selección. En esta visita se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los tutores legales y del propio paciente, en caso de tener al menos 12 años para la participación en el estudio. Se realizó una historia clínica completa, con anamnesis y exploración física, y se recogió la toma de medicación concomitante. Además se midieron el peso y la talla y se realizó una analítica completa que incluyó hemograma, coagulación sanguínea y parámetros bioquímicos nutricionales. Se realizó el test gonadotrófico del embarazo a las pacientes en edad fértil. También se realizó una prueba de serología que incluía las siguientes determinaciones: VIH-1, VIH-2, Hepatitis B y Hepatitis C. Si los test realizados resultasen positivos para alguno de dichos patógenos, se le comunicó al paciente que cesaba su participación en el estudio inmediatamente y se rellenó el formulario de finalización del estudio. Además se realizó una biopsia cutánea para confirmar el tipo de epidermolísis bullosa, siempre que en la historia clínica no estuviera ya reflejado.

Tiempo -1:

-Tiempo -1 ó de biopsia cutánea: En esta visita, una vez obtenidos los resultados negativos de la serología, se realizó una biopsia de piel a partir de la cual se cultivaron los queratinocitos autólogos del paciente.

Procedimiento de las biopsias de piel:

Las biopsias de piel de paciente se sometieron al siguiente procedimiento para el aislamiento de los queratinocitos:

Se colocó la muestra de piel en una placa de Petri estéril y se troceó con unas tijeras estériles, pasándola a un frasco con 25-30 ml de solución estéril e irradiada de tripsina al 0,05% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,02% (T/E) que incubamos a 37°C bajo agitación orbital durante 45 minutos (**primer lavado**). Extrajimos el bote del agitador orbital y disgregamos mecánicamente la piel con la ayuda de una pipeta empapada en T/E. Decantamos los fragmentos de piel y con cuidado pasamos la suspensión celular en T/E a un cónico de 50 ml. Neutralizamos con igual cantidad de medio QN y centrifugamos durante 10 minutos a 1400 rpm. Añadimos T/E fresca al bote que contiene los fragmentos de piel e incubamos nuevamente unos 30 minutos a 37°C en agitación (**segundo lavado**).

El precipitado obtenido de la centrifugación del primer lavado se disolvió en 2-3 ml de medio QN. En un microtubo etiquetado se tomaron 10 µl de la suspensión celular para el estudio de viabilidad y conteo celular. Sólo se aceptaron las muestras con una viabilidad > 80%, desechándose el resto de las muestras.

Con las células del segundo lavado se repitió el procedimiento descrito en los apartados anteriores, añadiendo las células obtenidas en cada lavado a las del anterior. El procedimiento de recogida de la T/E se repitió en lavados subsiguientes hasta que no se obtuvieron más células de la biopsia.

Las células resultantes del procesamiento de la biopsia de piel del paciente se sometieron al siguiente procedimiento:

Para el cultivo primario de queratinocitos, se sembró la resuspensión celular a razón de unas 25.000 células por cm² (unos 2 millones de queratinocitos por frasco de 75 cm²) en presencia de 75.000 células 3T3 irradiadas por cm² (capa alimenticia, en total se sembraron unos 5-6 millones de células 3T3 por frasco de 75 cm²). Las células se incubaron durante un periodo de 48 horas en un incubador a una temperatura de 37 °C, con 5% de CO₂ y saturación de humedad. El medio de cultivo utilizado fue el medio QN. Una vez transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante del cultivo para realizar los ensayos de micoplasma y de patógenos específicos, depositándolo en un cónico debidamente etiquetado. Centrifugamos durante 10 minutos a 1400 rpm. Se recogieron tres mililitros del sobrenadante de la centrifugación que fueron utilizados para los análisis de micoplasma, almacenándolos en el congelador a -20°C hasta su análisis.

Se retiró cuidadosamente casi todo el medio restante dejando otros tres mililitros de sobrenadante del cultivo para resuspender las células muertas que habían precipitado. Esta suspensión de medio y células no viables se utilizó para realizar el test de patógenos virales, depositándolos en tubos eppendorf etiquetados y almacenándolos en el congelador a -20°C hasta su análisis.

Una vez retirado todo el medio se procedió a realizar un lavado añadiendo suficiente tampón fosfato (PBS) como para cubrir toda la superficie de la placa. Inmediatamente se retiró dicho PBS. Una vez realizado el lavado, el cultivo se suplementó con un volumen equivalente al retirado de medio QN fresco y se devolvió a la incubadora durante 24 horas. Una vez trascurridas las

24 horas se procedió a un lavado complementario. Una vez retirado el PBS, se añadió un volumen equivalente de medio fresco QC cada 2-4 días. Esto constituyó el **pase cero**.

Una vez que los ensayos de micoplasma y patógenos virales se demostraron negativos se procedió a la elaboración del cultivo de queratinocitos. Una vez que el cultivo alcanzó una confluencia del 80-90%, se procedió al levantamiento y dilución de las muestras: retirándose cuidadosamente el medio de cultivo, intentando evitar levantar la capa de células pegadas al plástico. Se lavó el exceso de medio de cultivo con un volumen equivalente de tampón fosfato (PBS) y posteriormente se procedió a su retirada. Para el levantamiento de la capa celular alimenticia (células 3T3 irradiadas) se añadió un volumen de T/E suficiente para cubrir toda la superficie celular. La muestra se devolvió a la incubadora por un periodo que no excedió los 5 minutos. Una vez pasado dicho periodo se comprobó en el microscopio que todas las células 3T3 estaban en suspensión. Para el levantamiento de los queratinocitos, se volvió a añadir un volumen de T/E fresca suficiente para cubrir toda la superficie celular. La muestra se devolvió al incubador por un periodo que no excedió los 15 minutos. Una vez pasado dicho periodo se comprobó en el microscopio que todos los queratinocitos estaban en suspensión y lo mas disgregados posible. Para parar la reacción de la tripsina, la muestra se diluyó al menos un tercio en medio QN fresco. Se procedió al recuento y análisis de la viabilidad celular utilizando el ensayo de exclusión de azul tripán. Una vez conocida la concentración celular, la muestra se centrifugó en un tubo etiquetado, a 1200 a 1500 rpm (290-453xg) por un periodo de 5 a 10 min. Se retiró el medio y se añadió medio QN fresco. La muestra se sembró

en un frasco/s nuevo/s a una concentración de entre 25000-27000 células por centímetro cuadrado, en presencia de 75000 células 3T3 irradiadas/cm². A los dos días de la siembra se cambió el medio QN por medio QC. Este medio se renovó cada 2-3 días por medio QC fresco. Cuando las células alcanzaron una confluencia de 80-90% se levantaron y se procedió a congelar las células en medio de congelación estándar (90% suero fetal bovino, 10% DMSO). Los viales conteniendo las células se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido, constituyendo el **Banco Celular de queratinocitos autólogos (BCQ)**, en **pase 1**.

Las biopsias de piel de donante se sometieron al siguiente procedimiento para el aislamiento de los fibroblastos:

Colocamos la muestra de piel en una placa de Petri estéril y la troceamos con unas tijeras estériles, pasándola a un frasco con 25-30 ml de solución de colagenasa Tipo I (2 mg/ml) en DMEM que incubamos a 37°C bajo agitación orbital hasta que se disolvieron los fragmentos (entre 2-12 horas, dependiendo del tamaño de la muestra inicial). Sacar el bote del agitador orbital. Para filtrar la resuspensión celular, se acabó de resuspender mecánicamente con una pipeta estéril y se decantó sobre un filtro de nylon de 60 micras (cell strainer) previamente depositado sobre una placa de Petri estéril. Se volvió a filtrar la suspensión celular en colagenasa a través del filtro de nylon y se recogió con cuidado la colagenasa que pasamos a un cónico de 50 ml. Los fragmentos de piel restantes en el filtro se desecharon con el mismo. La suspensión celular recogida en colagenasa se neutralizó con igual cantidad de medio de cultivo de fibroblastos y se centrifugó a 1200 a 1500 rpm (290-453xg) por un periodo de 5 a 10 min. El precipitado celular obtenido se disolvió

en 2-3 ml de medio de cultivo de fibroblastos y se contaron las células viables obtenidas. En un microtubo etiquetado se tomaron 10 μ l de la suspensión celular para el estudio de viabilidad y contaje celular. Sólo se aceptaron las muestras con una viabilidad > 80%, desechándose el resto de las muestras.

Para el cultivo primario de fibroblastos, se sembró la resuspensión celular a razón de unas 75.000-100.000 células por cm^2 (unos 7 millones de células por frasco de 75 cm^2) durante un periodo de 48 horas en un incubador a una temperatura de 37°C, con 5% de CO_2 y saturación de humedad. El medio de cultivo utilizado fue el de fibroblastos. Una vez transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante del cultivo para realizar los ensayos de micoplasma y de patógenos específicos, depositándolo en un cónico debidamente etiquetado. Centrifugamos durante 10 minutos a 1400 rpm. Se recogieron tres mililitros del sobrenadante de la centrifugación que fueron utilizados para los análisis de micoplasma, almacenándolos en el congelador a -20°C hasta su análisis. Se retiró cuidadosamente casi todo el medio restante dejando otros tres mililitros de sobrenadante del cultivo para resuspender las células muertas que habían precipitado. Esta suspensión de medio y células no viables se utilizó para realizar el test de patógenos virales por laboratorios externos autorizados, depositándolos en tubos eppendorf etiquetados y almacenándolos en el congelador a -20°C hasta su análisis. Una vez retirado todo el medio se procedió a realizar un lavado añadiendo suficiente tampón fosfato (PBS) como para cubrir toda la superficie de la placa. Inmediatamente se retiró dicho PBS. Una vez realizado el lavado, el cultivo se suplementó con un volumen equivalente al retirado de medio fresco y se devolvió a la incubadora durante 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas se procedió a

un lavado complementario. Una vez retirado el PBS, se añadió un volumen equivalente de medio fresco cada 2-4 días. Esto constituyó el **pase 0**.

Una vez que los ensayos de micoplasma y patógenos virales se demostraron negativos, se preparó el cultivo de queratinocitos. Una vez que el cultivo primario alcanzó una confluencia del 80-90%, se procedió al levantamiento y dilución de las muestras: retirándose cuidadosamente el medio de cultivo, intentando evitar levantar la capa de células pegadas al plástico. Se lavó el exceso de medio de cultivo con un volumen equivalente de tampón fosfato (PBS) y posteriormente se procedió a su retirada. Para el levantamiento de la capa celular se añadió un volumen de T/E suficiente para cubrir toda la superficie celular. La muestra se devolvió al incubador por un periodo que no excedió los 5 minutos. Una vez pasado dicho periodo se comprobó en el microscopio que todas las células estaban en suspensión y lo mas disgregadas posible. Se utilizó una acción mecánica mediante suaves golpeteos para alcanzar este estado. Para parar la reacción de la tripsina, la muestra se diluyó al menos un tercio en medio de fibroblastos fresco. Se procedió al recuento y análisis de la viabilidad celular utilizando el ensayo de exclusión de azul tripán. Una vez conocida la concentración celular, la muestra se centrifugó en un tubo etiquetado, a 1200 a 1500 rpm (290-453xg) por un periodo de 5 a 10 min. Se retiró el medio y se añadió medio fresco. La muestra se sembró en un frasco/s nuevo/s a una concentración de entre 10000-14000 células por centímetro cuadrado. Cuando las células alcanzaron una confluencia de 80-90% se procedió a congelar. Los viales conteniendo las células se congelaron y se almacenaron en nitrógeno, constituyendo el **Banco Celular Maestro de Fibroblastos alogénicos (BCMFa)**.

El sucesivo subcultivo de las células se prolongó hasta obtener el nº de células suficientes (unos 10 millones para todo el ensayo clínico) y siempre sin superar un número razonable de duplicaciones celulares (25). Obtenido el nº de células suficiente, se tripsinizaron las células, se resuspendieron en medio de cultivo, se contaron y se congelaron en alícuotas constituyendo el **Banco Celular de Trabajo de Fibroblastos alogénicos (BCTFa)**.

Una vez programado el implante de la lámina de piel en el paciente, los bancos celulares de queratinocitos (BCQ) y de fibroblastos (BCTFa) se procesaron para la obtención del producto celular a granel. Para ello, se empleó el siguiente procedimiento:

Primeramente, un vial de fibroblastos del BCTFa se descongeló y se sembró en un frasco de 75 cm² en medio de cultivo de los fibroblastos y se esperó a que estuvieran confluentes. Alcanzada la confluencia, los fibroblastos se tripsinizaron y se centrifugaron y el pellet se resuspendió en medio de cultivo para realizar el contaje celular. Una vez contado el nº de fibroblastos recolectados, se descongeló el plasma sanguíneo a 37°C y se suplementó con 1 mg/ml de ácido tranexámico (Amchafibrin). Los fibroblastos se resuspendieron en 10-15 ml de plasma, a una concentración de 3.000-5.000 células/ml. El volumen de plasma utilizado dependió de la concentración de fibrinógeno detectado, utilizándose el necesario para alcanzar 20-25 mg de fibrinógeno por lámina de piel. Si el plasma a utilizar tuviera una concentración menor a 2 mg/ml, se desecharía ya que el volumen necesario sería demasiado grande. A continuación se añadió el volumen necesario de una solución de cloruro sódico al 0,9% (suero fisiológico) hasta alcanzar el volumen de 23 ml. Finalmente se añadió a la suspensión 2 ml de una solución de cloruro cálcico al

1% y se vertió la mezcla final en una placa de cultivo cuadrada de unos 80 cm². Se incubó a 37°C hasta su completa coagulación (entre 30 y 45 minutos). Posteriormente se cubrió la dermis artificial así generada con 10 ml de medio QN y se incubó a 37°C durante 10-16 horas. A continuación se descongelaron los queratinocitos del BCQ. El contenido del criovial se diluyó en 20 ml de medio QN y se centrifugó a 1400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo y los queratinocitos autólogos descongelados se sembraron sobre la dermis artificial a una densidad aproximada de 15.000 células/cm² (10.000-20.000). En ningún caso se sembraron menos de 4000 cels/cm². A las 48-72 horas de la siembra de los queratinocitos, se cambió el medio de cultivo añadiéndole en este caso medio QC. El cultivo progresó siendo cambiado el medio QC cada tres días hasta que se observó a través del microscopio la presencia de una capa de epitelio confluyente (unos 10 días).

La lámina de piel se acondicionó de la siguiente manera:

Una vez confluyente la lámina de piel ingenierizada en cultivo, se transportó a la cabina de flujo laminar dentro de la sala de envasado. Se pegó a la superficie epidérmica de la lámina un trozo de gasa textil (100% poliéster) de su misma superficie, mediante el adhesivo tisular Histoacryl (monómero de n-butil-2-cianocrilato, B.Braun). Esta gasa facilita la manipulación de la lámina y no tiene ningún efecto sobre su viabilidad. Con la ayuda de dos pinzas estériles, la lámina se transporta con mucho cuidado de la placa cuadrada donde se ha generado a una bandeja de polipropileno (envase primario). La lámina se cubre, con fines de protección con un apósito hidropolimérico de poliuretano. Se cubre la lámina y el apósito con medio de envasado estéril. La bandeja de

polipropileno es herméticamente cerrada mediante termosellado a un film estanco y pelable. El exterior del envase primario, una vez termosellado, se cubre con una etiqueta de material de nylon blanco, impresa con tinta negra mediante impresora de transferencia térmica a una resolución de 203 dpi.

Tiempo 0 (Procedimiento quirúrgico):

Se realizó la reconstrucción de las comisuras interdigitales en pacientes con sindactilia cutánea severa mediante injertos laminares que se tomaron de forma uniforme y sistemática con dermatomo eléctrico o de aire comprimido sobre una zona aséptica y con la misma extensión y profundidad en micras en todos los pacientes. Inmediatamente tras el procedimiento quirúrgico se procedió a implantar un parche de piel quimérica cultivada (terapia experimental) en la mitad del defecto cutáneo del paciente y un apósito oclusivo no adherente en la otra mitad (control).



(a)



(b)

Figura 25: Obtención de injerto de piel de antebrazo con dermatomo quirúrgico (a), área quirúrgica de estudio de cobertura con piel quimérica cultivada y apósito oclusivo no adherente(b).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 26: Procedimiento quirúrgico: tratamiento de la sindactilia con aplicación de injertos cutáneos laminares (a), cobertura de area cutánea cruenta (b), muestra de lámina de piel quimérica (c,e), cobertura de defecto cutáneo con piel quimérica (d,f).

Visitas de seguimiento de la epitelización:

Se realizaron visitas cada dos días hasta la fecha de epitelización completa (aproximadamente 21 días desde el momento de la intervención), en las cuales se valoraron datos clínicos referentes a la evolución de la misma (coloración, textura, hipertrofia, ampollas, signos de infección, etc.) y a la seguridad de los tratamientos en estudio.

A los 3 y 8 meses Se realizó una exploración física completa, se midieron los signos vitales (peso) y se realizó una analítica completa que incluía parámetros bioquímicos nutricionales. Además se valoraron datos clínicos referentes a la región cutánea del implante (coloración, textura, hipertrofia, ampollas, signos de infección, etc) y a la seguridad de los tratamientos en estudio. En ambas visitas se realizaron sendas biopsias cutáneas de la región del implante.

A los 12 meses se realizó una evaluación completa del paciente que incluía exploración física, signos vitales (peso), analítica completa con parámetros bioquímicos nutricionales, así como valoración de datos clínicos relativos a la región cutánea del implante y a la seguridad de los tratamientos en estudio. Además se realizaron sendas biopsias cutáneas de la región del implante. En esta visita final el investigador determinaría la respuesta clínica global (eficacia y seguridad) una vez finalizado el tratamiento del estudio en la última valoración del seguimiento.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 27: Seguimiento postoperatorio del área tratada analizando la epitelización cada dos días hasta alcanzar los 21 días: cuatro días (a); ocho días (b), 16 días (c) y 21 días (d).

En todas las visitas se recogieron debidamente en el Cuaderno de Recogida de Datos la presencia de acontecimientos adversos o tratamientos concomitantes que aparecieron a lo largo del estudio.

5.8.- Idoneidad de las medidas:

La EB distrófica recesiva carece de tratamiento farmacológico o no específico. El tratamiento de los defectos cutáneos de estos pacientes con piel quimérica cultivada, constituida por queratinocitos autólogos del paciente y fibroblastos alogénicos (procedentes del donante) que son capaces de sintetizar colágeno tipo VII y, por tanto, restaurar la integridad normal de la unión dermoepidérmica, se esperaba que no solo aumentase la velocidad de epitelización de estos defectos cutáneos, sino que evitase a largo plazo la recidiva de la enfermedad de base en las áreas implantadas. Por tanto, el control en nuestro estudio sería el empleo de dichos apósitos. El tratamiento de úlceras de estos pacientes se realiza en la actualidad con apósitos oclusivos no adherentes de manera electiva.

5.9.- Variables de eficacia:

La variable principal de eficacia ha sido los días necesarios hasta llegar al 100% de epitelización del área afectada.

Las variables secundarias de eficacia fueron:

- Días hasta llegar al 50% de epitelización del área afectada.
- Persistencia de los fibroblastos implantados en la zona afectada desde el punto de vista histológico (presencia de colágeno VII en la unión dermoepidérmica demostrada mediante anticuerpos monoclonales) a los 8 y 12 meses de seguimiento.
- Evaluación de la persistencia de los fibroblastos alogénicos implantados mediante el análisis de 17 marcadores genéticos por

análisis de STRs (capaz de discriminar dos ADN diferentes) a los 3, 8 y 12 meses de seguimiento.

- Evaluación de la integración y eficacia del implante desde el punto de vista histológico (ausencia de ampollas en el corte histológico) a los 3, 8 y 12 meses de seguimiento.

La variable de seguridad se basó en la ausencia de rechazo inmune, en la presencia de acontecimientos adversos clínicos y analíticos y en la realización de procedimientos clínicos y analíticos relativos a la seguridad del tratamiento.

5.10.- Determinaciones de laboratorio:

Los resultados de todas las pruebas de laboratorio que requería el protocolo se registraron en el cuaderno de recogida de datos del paciente. Todas las alteraciones de laboratorio importantes clínicamente que ocurrieron durante el estudio se repitieron a intervalos adecuados hasta que alcanzaron su nivel basal.

Se anotarán en el cuaderno de recogida de datos como acontecimientos adversos, todos los resultados anormales de las pruebas de laboratorio que especifique el protocolo o la suspensión del tratamiento del estudio o aquellas que requieran intervención o la evaluación diagnóstica para valorar el riesgo del paciente/sujeto.

Inmunohistoquímica: De las muestras de biopsia cutánea obtenidas se obtuvieron cortes congelados de 5µm que fueron procesados para tinción con

hematoxilina-eosina y para inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal específico LH 7.2 que actúa como marcador directo del colágeno VII. Las muestras congeladas fueron lavadas y fijadas con solución salina buffer y después de la preincubación con suero fijador se incubaron con el anticuerpo monoclonal LH 7.2. Se repitieron los lavados y se aplicó un anticuerpo secundario con fluoresceína conjugada. Las muestras fueron finalmente lavadas, montadas y examinadas usando un microscopio de fluorescencia.

5.11.- Exploración física:

Se realizó una exploración física en todas las visitas especificadas en el cronograma. La información sobre la exploración física se documentó en la historia clínica del paciente. Los hallazgos significativos que estaban presentes antes de iniciar el tratamiento del estudio se registraron en el apartado de Historial Clínico Relevante/Condiciones Médicas.

5.12.- Aspectos éticos:

Este estudio se ha desarrollado bajo las normas tripartitas armonizadas para Buena Práctica clínica 1996 según la directiva 91/507/EEC: Normas sobre Buena Práctica Clínica para investigaciones con productos médicos en la Comunidad Europea.

También se ha desarrollado cumpliendo la declaración de Helsinki referente a la investigación médica en seres humanos "Recomendaciones para los médicos que participan en investigación biomédica con seres humanos".

Los investigadores han accedido, con la firma del protocolo, a seguir las instrucciones y procedimiento descritos en el mismo y por lo tanto a cumplir los principios de Buena Práctica Clínica en los cuales se basa. Las investigaciones fueron realizadas de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

5.13.- Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC):

Antes de la implementación de este estudio, el protocolo, el formulario de consentimiento informado propuesto y otra información para los pacientes, han sido revisados por un Comité Ético Independiente/Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) debidamente constituido. Cualquier enmienda al protocolo, que no fueron cambios administrativos, debieron ser aprobados por estos comités.

5.14.- Consentimiento informado:

El investigador explicó a cada paciente y al donante (o representante legalmente autorizado) la naturaleza del estudio, sus propósitos, procedimientos, duración prevista y los potenciales riesgos y beneficios relacionados con la participación en el estudio, así como cualquier inconveniente que este le pueda suponer. Cada uno de los participantes fue advertido de que su participación en el estudio es voluntaria y de que puede abandonar el estudio en cualquier momento, sin que esto afecte a su tratamiento médico posterior, ni a su relación con el médico que le trata.

El consentimiento informado fue proporcionado mediante un escrito estándar, en lenguaje fácilmente comprensible para el participante. El paciente/donante dispuso del tiempo suficiente para leer y entender las

explicaciones antes de fechar y firmar el consentimiento informado y recibió una copia del documento firmado. Cuando el paciente no podía leer o firmar los documentos se realizó una presentación oral, siempre con la presencia de un testigo no involucrado en el estudio y se mencionó que el paciente no pudo leer ni firmar los documentos. Ningún paciente/donante fue incluido en el estudio sin haber otorgado previamente su consentimiento informado.

5.15.- Método estadístico utilizado:

El análisis de eficacia se realizó “por intención de tratar”, donde se incluyó a los pacientes incluidos en el estudio y que se les haya implantado tanto el parche de piel como el apósito oclusivo no adherente y de los que se disponga de al menos una evaluación clínica de la respuesta durante el seguimiento.

En el Análisis “por protocolo correcto” se analizaron la variable principal y las variables secundarias de eficacia que comprende la población por intención de tratar pero excluyendo a los pacientes que han tenido alguna de las siguientes desviaciones: incumplimiento de criterio de inclusión/exclusión, tener días de no exposición al tratamiento, tanto al parche de piel ingenierizada como al apósito oclusivo, o que les falte alguna evaluación clínica de eficacia especificada en el protocolo. La población de seguridad incluyó a todos los pacientes a los que se les implantó los tratamientos en estudio.

Se analizaron los datos basales y demográficos de la población de eficacia “por intención de tratar”. Se usaron estadísticos descriptivos (media, mediana, desviación típica, mínimo, máximo y número de casos válidos) en las variables cuantitativas y frecuencias absolutas y relativas en las variables

categorías. Todos los análisis que se realizaron, se presentaron de forma comparativa entre los dos grupos de tratamiento del estudio. Todos los p-valores e intervalos de confianza fueron calculados con un nivel de confianza bilateral del 95% (nivel de significación del 5%).

La valoración principal de eficacia se consideró como los días hasta llegar al 100% de epitelización del área afectada. Mediante la prueba T-Student de medidas intrasujeto para ver la significación estadística, siendo la medida del efecto la diferencia de medias intrasujeto entre los dos tratamientos y su intervalo de confianza al 95%.

Las valoraciones secundarias de eficacia se consideraron como:

- Los días hasta llegar al 50% de epitelización del área afectada. Se analizó igual que la valoración principal de eficacia.
- La persistencia de los fibroblastos implantados en la zona afectada desde el punto de vista histológico (presencia de colágeno VII en la unión dermoepidérmica demostrada mediante anticuerpos monoclonales) a los 8 y 12 meses de seguimiento. Se estimó la proporción de pacientes con presencia de colágeno VII en cada momento y se comparó esta proporción con la inicial del 100% (todos tienen presencia de colágeno VII al instaurar el tratamiento experimental) mediante la prueba binomial exacta siendo la medida a evaluar la diferencia absoluta de proporciones y su intervalo de confianza exacto.
- La evaluación de la persistencia de los fibroblastos alogénicos implantados mediante el análisis de 17 marcadores genéticos por análisis de STRs (capaz de discriminar dos ADN diferentes) a los 3, 8

y 12 meses de seguimiento. Se estimó la proporción de pacientes con presencia de fibroblastos alogénicos en cada momento y se comparó esta proporción con la inicial del 100% (todos tienen presencia de fibroblastos alogénicos al instaurar el tratamiento experimental). Se analizó igual que la valoración de la presencia de colágeno VII.

- La evaluación de la integración y eficacia del implante desde el punto de vista histológico (ausencia de ampollas en el corte histológico) a los 3, 8 y 12 meses de seguimiento. Se estimó la proporción de pacientes con ausencia de ampollas en el corte histológico tanto con el tratamiento experimental como con el control y se compararon entre sí mediante la prueba binomial exacta siendo la medida a evaluar la diferencia absoluta de proporciones y su intervalo de confianza exacto.

Se calcularon la incidencia de acontecimientos adversos y se compararon entre tratamientos de la misma forma que las comparaciones de eficacia. Se estudiaron los cambios de presión arterial, frecuencia cardiaca y peso. La reducción porcentual con respecto al valor basal se comparó entre los tres grupos. El valor basal estuvo definido como la media de los valores pretratamiento en estudio. Se calcularon los estadísticos descriptivos separadamente para cada rama y se realizaron la prueba de significación del análisis de la varianza de medidas repetidas. Como medida de la magnitud del efecto se calculó la diferencia de medias y su intervalo de confianza.

Para cada variable del laboratorio de seguridad se calcularon los pacientes con valores fuera del rango de normalidad. Dicha incidencia se calculó sobre los pacientes que basalmente estaban dentro del rango normal.

Se calculó las frecuencias absolutas y relativas de cada grupo de tratamiento, el p-valor asociado al test de la misma forma que las variables de eficacia. Se evaluó de manera descriptiva la proporción de posibles rechazos inmunológicos que se produjeron.

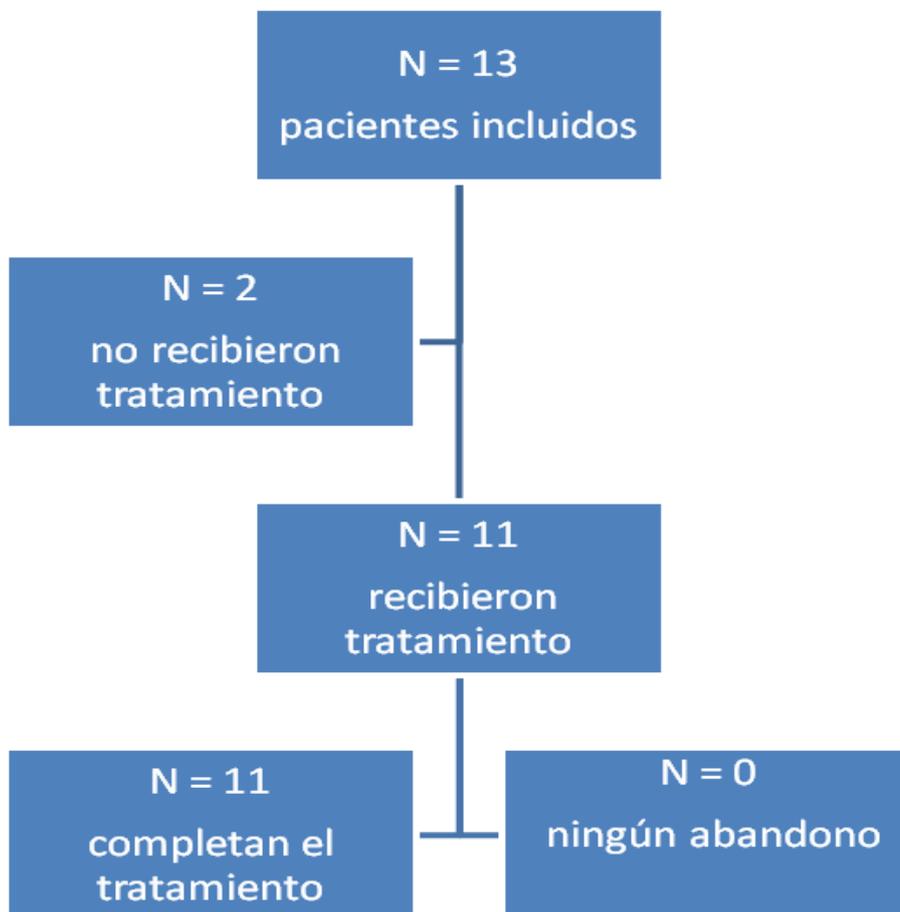
5.16.- Consideraciones sobre el tamaño de la muestra y la potencia:

Uno de los objetivos fue obtener una primera estimación del tamaño del efecto del tratamiento experimental frente al control (diferencia de medias intrasujeto entre ambos tratamientos de los días hasta epitelización), para lo cual, suponiendo que el tiempo hasta epitelización con el tratamiento control fue de aproximadamente 21 días y que este tiempo se vio reducido en al menos 6 días con el tratamiento experimental, con una potencia del 95%, un error alfa del 5%, una desviación típica máxima de 5 días y una proporción de no evaluables del 15% (2 de 12) se necesitaron un total de 12 pacientes evaluables. Se decidió utilizar una potencia estadística del 95% en lugar del 80% habitual por tratarse de una muestra de relativamente pocos pacientes.

6.- RESULTADOS.-

6.1.- Pacientes del estudio: 13 pacientes afectos de epidermólisis bullosa distrófica recesiva.

Figura 28.- Disposición de los pacientes estudiados:



Se incluyeron 13 pacientes en el estudio de investigación. Once de ellos (84.6%) recibieron el tratamiento del estudio.

6.2.- Muestras analizadas:

Tabla III.- Poblaciones de estudio:

Pacientes	N %
Incluidos	13 (100%)
Seguridad	11 (84.6%)
Intención de tratamiento	11 (84.6%)
Por protocolo	11 (84.6%)

Los 11 pacientes tratados forman parte de las tres poblaciones del estudio: población de seguridad, población por intención de tratamiento y población por protocolo.

Por el propio diseño del estudio, en el que el tratamiento experimental se proporciona en la mitad del defecto cutáneo antebraquial y el control en la otra mitad, los 11 pacientes fueron tratados con ambos tratamientos. Se realizaron los análisis de eficacia en la población por intención de tratamiento y en la población por protocolo, pero al coincidir ambas poblaciones se presentan tablas únicas que pueden ser aplicadas a cualquiera de ellas.

6.3.- Características demográficas:

La población tratada se compuso mayoritariamente de hombres (72.7%), todos de raza blanca, con una edad media de 12,5 años.

La siguiente tabla presenta los datos demográficos y características basales de los pacientes del estudio:

Tabla IV.- Datos demográficos y características basales.-

		N (%)
Sexo	Varón	8 (72.7%)
	Mujer	3 (27.3%)
Raza	Caucásica	11 (100%)
Edad (años)	Media (de)	12.5 (11.63)
Peso (kg)	Media (de)	24.3 (8.75)
Exploración física normal	Aspecto general	1 (9.1%)
	Boca	7 (63.6%)
	Garganta	3 (27.3%)
	Abdomen	1 (9.1%)
	Musculoesqueletico	3 (27.3%)
	Extremidades	6 (54.5%)
	Piel	8 (72.7%)
	Genitourinario	3 (27.3%)

Tabla V.- Características basales.-

		N (%)
Tiempo de protrombina (seg)	Media (de)	12.7 (0.59)
Tiempo de protrombina (%)	Media (de)	96.8 (7.16)
Tiempo de tromboplastina Parcial (seg)	Media (de)	30.8 (5.29)
Serología	HbCAc+	1 (9.1%)
Infección activa	No	11 8100%)

6.4.- Resultados de eficacia:

TablaVI.- Análisis principal de eficacia. Tiempo hasta llegar al 100% de epitelización del área afectada.-

	Apósito	Piel quimérica cultivada	Diferencia individual
Media (de)	23.9 (7.1)	21.4 (6.9)	1.2 (1.7)
Mediana	20.0	14.5	3.0
Mediana (IC 95%)¹	20.0 (14.0 ; 22.0)	17.0 (10.0 ; 31;0)	P = 0.248

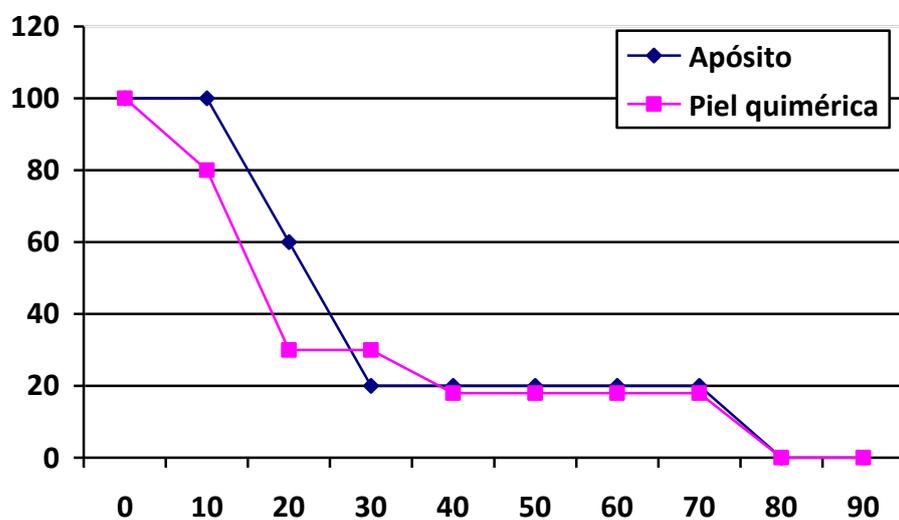
¹ Estimada por el método de Kaplan-Meier.

El análisis principal de eficacia consistió en el número de días hasta llegar al 100% de epitelización del área afectada.

Aunque se ha conseguido en menor número de días el 100% de epitelización en el área tratada con la piel quimérica cultivada comparando con el apósito no adherente, el estudio no ha alcanzado una significación estadística (media de 1,2 días antes y mediana de 3.0 antes; $p = 0.498$).

Cuando se compara el número de días hasta llegar al 100% de epitelización por medio del análisis de Kaplan Meier, la piel quimérica cultivada sigue epitelizando antes que el apósito, pero sin significación estadística ($p = 0.248$).

Figura 28.- Tiempo hasta el 100% de epitelización.-



La figura resume la función del tiempo hasta la obtención del 100% de epitelización por grupo de tratamiento (días; eje abscisas), usando estimaciones por el método de Kaplan-Meier.

6.5.- Análisis secundarios de eficacia.-

Tabla VII.- Tiempo hasta llegar al 50% de epitelización del área afectada.-

	Apósito	Piel quimérica cultivada	Diferencia Individual
Media (de)	12.3 (1.7)	17.2 (6.8)	- 6.1 (6.1)
Mediana	10.0	9.0	2.0
Mediana (IC95%)¹	12.0 (10.0 ; 15.0)	10.0 (7.0 ; 26.0)	P = 0.423

¹ Estimada por el método de Kaplan-Meier

La piel quimérica cultivada sigue presentando una epitelización más temprana comparada con el apósito no adherente cuando se evalúa el tiempo hasta llegar al 50% de epitelización del área afectada; aunque el estudio no puede demostrar esta diferencia como estadísticamente significativa (mediana de 2.0 días antes; $p=0.343$). Dada la gran dispersión presentada en tan pocos pacientes, no se pueden interpretar los valores medios resumidos, que deben ser evaluados por medio de sus medianas respectivas.

Cuando se compara el número de días hasta llegar al 50% de epitelización por medio del análisis de Kaplan Meier, la piel quimérica cultivada sigue epitelizando antes que el apósito; pero sin significación estadística ($p=0.423$).

6.6.- Persistencia histológica de fibroblastos:

Tabla VIII.- Presencia histológica de colágeno VII.-

	N (%)
Visita 0	1 (9.1%)
Visita 3 meses	N.D.⁽¹⁾
Visita 8 meses	8 (72.7%)
Visita 12 meses	6 (54.5%)

⁽¹⁾ Dato no disponible por ausencia de datos.

Por medio de la presencia de colágeno VII en la unión dermoepidérmica demostrada mediante anticuerpos monoclonales, se evidencia la persistencia histológica de fibroblastos implantados.

Aunque un paciente presenta colágeno VII en la visita basal, no se evidencia presencia de colágeno VII hasta la visita a los 8 meses de seguimiento. No se ha podido demostrar una diferencia estadísticamente significativa en la evolución desde los 8 a los 12 meses (McNemar; $p=0.157$).

6.7.- Persistencia de fibroblastos alogénicos:

Tabla IX.- Persistencia de fibroblastos alogénicos implantados.-

	N (%)
Visita 3 meses	4 (36.4%)
Visita 8 meses	4 (36.4%)
Visita 12 meses	3 (27.3%)

Paciente	3 meses	8 meses	12 meses
1	negativo	negativo	negativo
2	negativo	negativo	negativo
3	+	+	+
4	negativo	negativo	negativo
5	+	+	++
6	+	+	+
7	+	+	negativo
8	negativo	negativo	negativo
9	negativo	negativo	negativo
10	negativo	negativo	negativo
11	negativo	negativo	negativo

Se evidencia un total de 4 pacientes (36.4%) con fibroblastos alogénicos en la visita a 3 meses de seguimiento; que se mantiene en la visita a 8 meses; y pasa a 3 pacientes (27.3%) en la visita a 12 meses de seguimiento.

No se ha podido demostrar una diferencia estadísticamente significativa en la evolución desde los 3 a los 8 meses (McNemar; $p=0,083$), ni desde los 3 a los 12 meses (McNemar; $p=0,317$), ni desde los 8 a los 12 meses (McNemar; $p=0,564$).

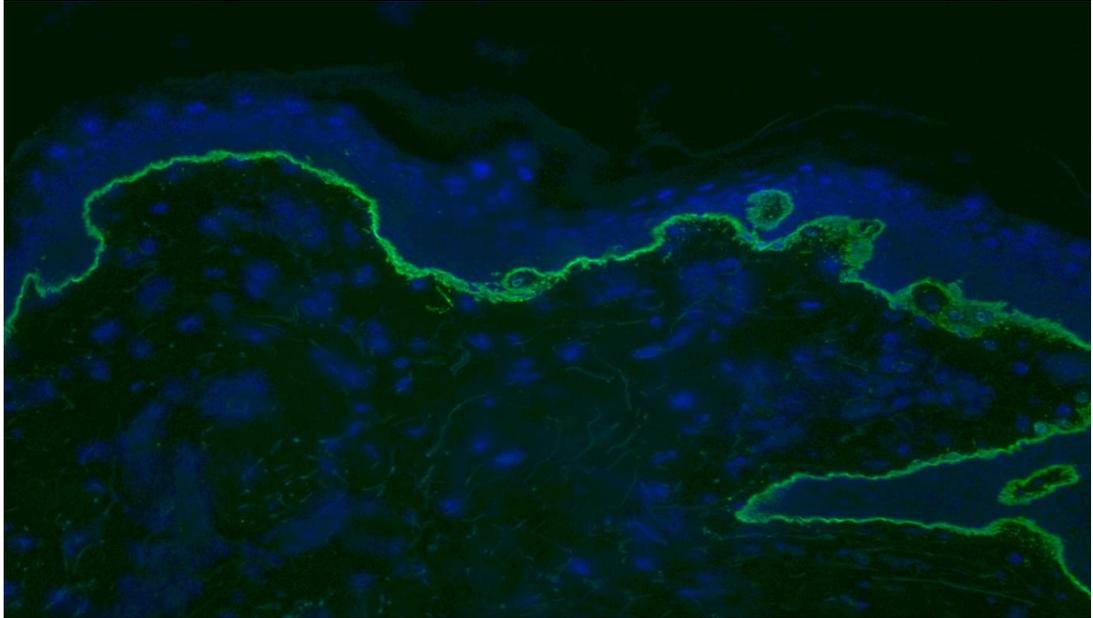


Figura 29: Preparación de inmunofluorescencia para demostración de la presencia de colágeno VII con la utilización del anticuerpo LH7.2 Las señales verdes demuestran la presencia de colágeno VII (muestra control).

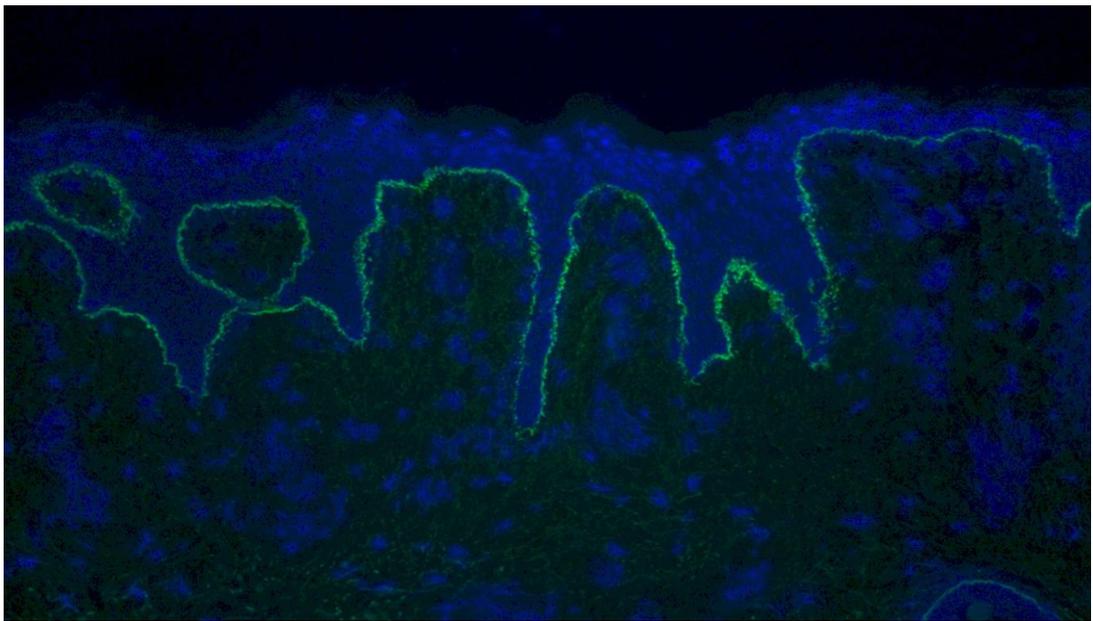


Figura 30: Preparación de inmunofluorescencia para demostración de la presencia de colágeno VII con la utilización del anticuerpo LH7.2. Muestra a los 12 meses del implante confirmando la existencia de colágeno VII en la unión dermoepidérmica y ausencia de separación y de ampollas.

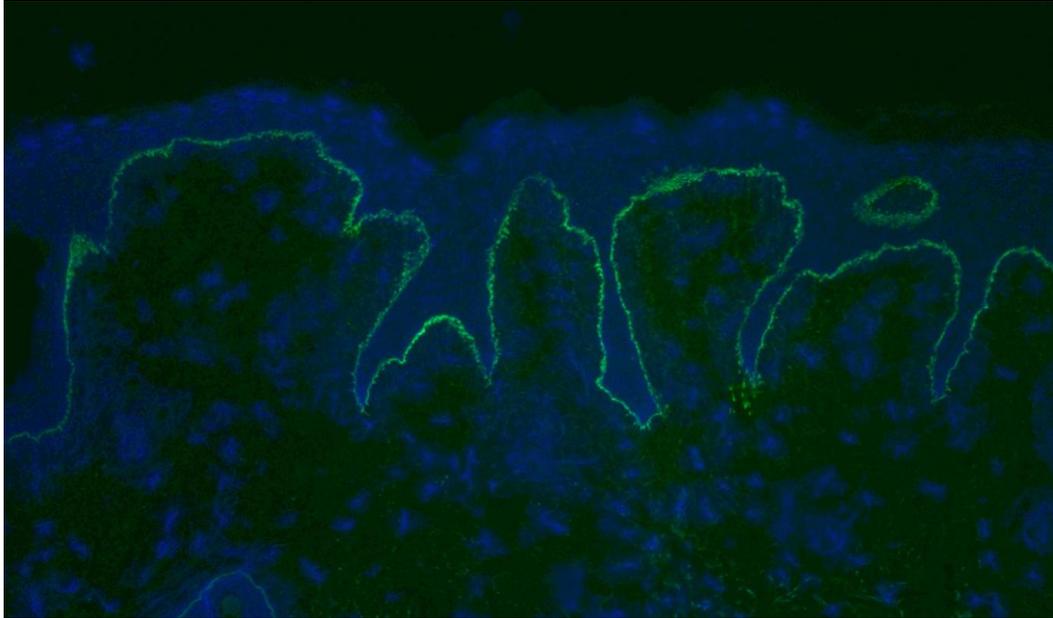


Figura 31: Preparación de inmunofluorescencia para demostración de la presencia de colágeno VII con la utilización del anticuerpo LH7.2 en un paciente estudiado por biopsia cutánea a los 6 meses.

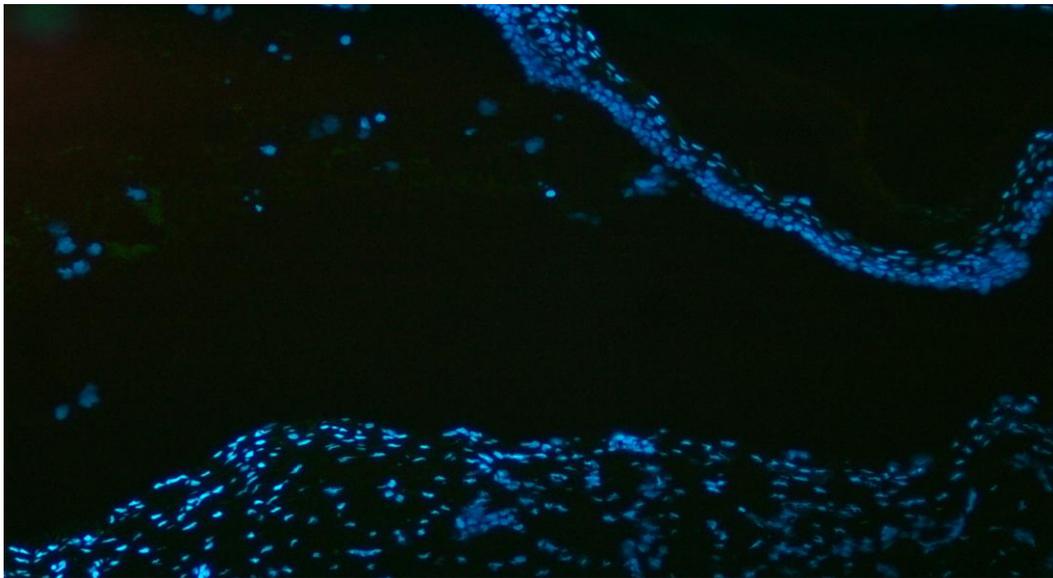


Figura 32: Preparación de inmunofluorescencia para demostración de la ausencia de colágeno VII con la utilización del anticuerpo LH7.2 en un paciente estudiado por biopsia cutánea a los 6 meses. Se aprecia la existencia de una separación dermoepidérmica y la ausencia de fibroblastos con colágeno VII.

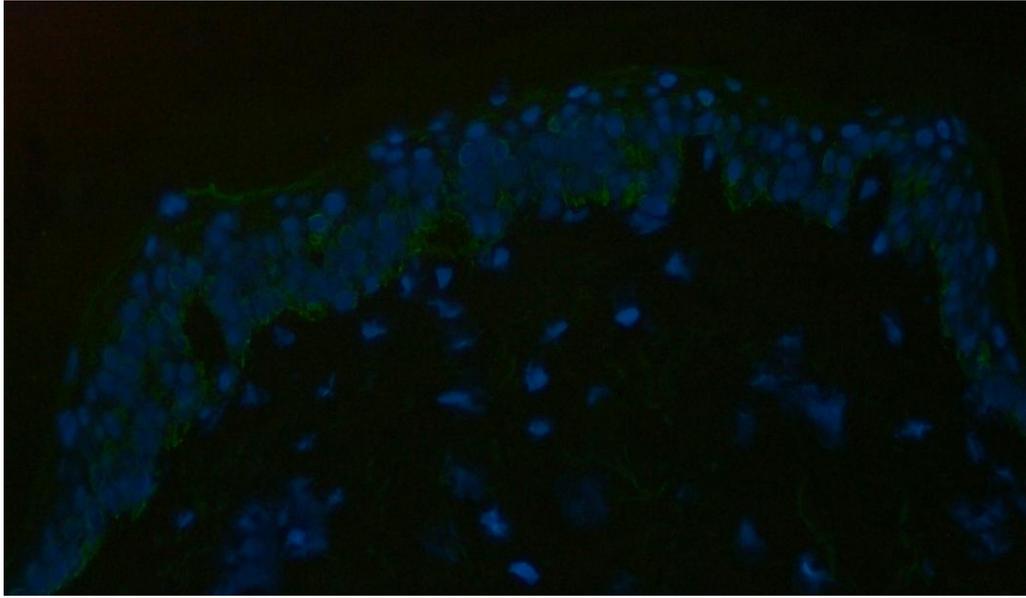


Figura 33: Preparación de inmunofluorescencia directa en un paciente control para demostración de la presencia de colágeno VII con la utilización del anticuerpo LH7.2. Se aprecia la existencia de la integridad de la unión dermoepidérmica y la presencia de fibroblastos con colágeno VII.

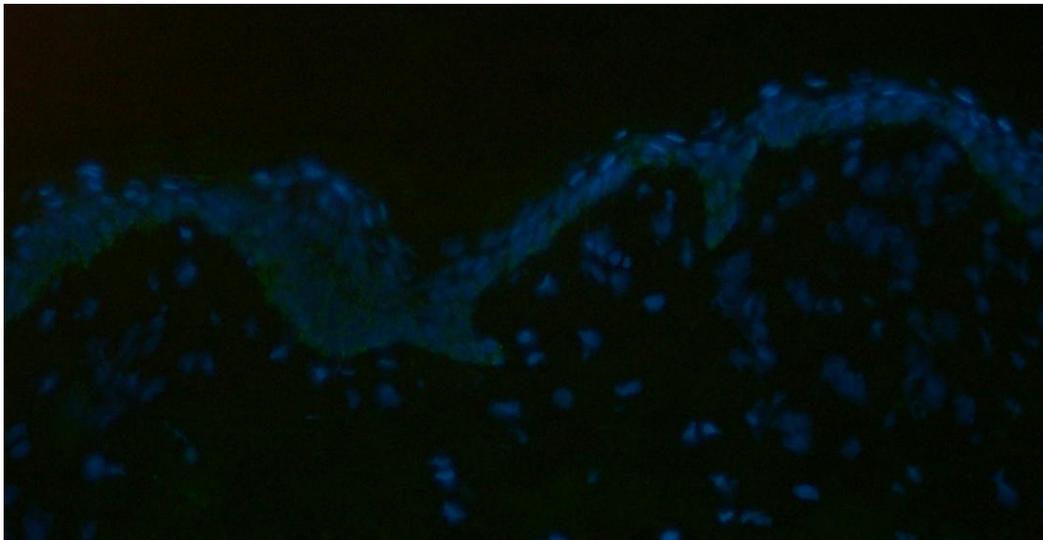


Figura 34: Preparación de inmunofluorescencia directa similar a la preparación control y apreciándose la presencia de colágeno VII con la utilización del anticuerpo LH7.2. Se aprecia la integridad de la unión dermoepidérmica y la presencia de fibroblastos con colágeno VII. Muestra tomada a los 12 meses del tratamiento.

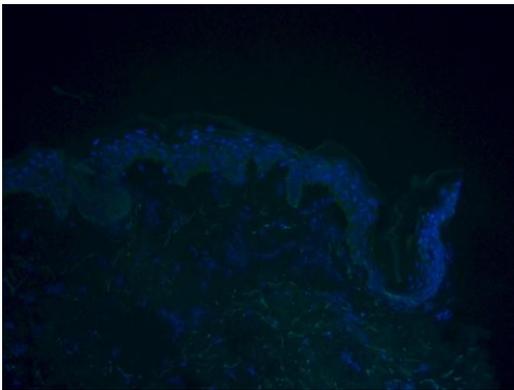


Figura 35: Inmunofluorescencia directa con anticuerpo LH7.1, presencia de colágeno VII.

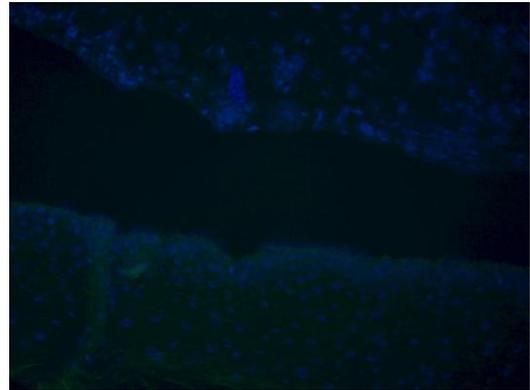


Figura 36: ausencia de colágeno VII y separación dermoepidérmica.

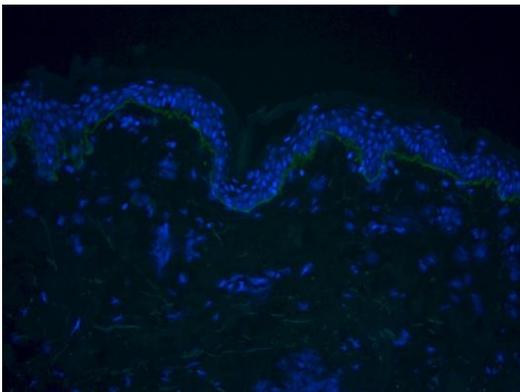


Figura 37: Inmunofluorescencia directa con Anticuerpo LH7.1, presencia de colágeno VII.

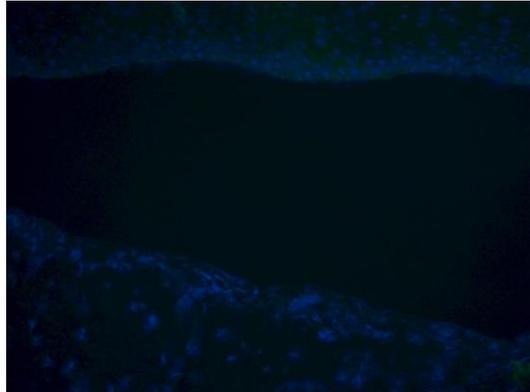


Figura 38: ausencia de colágeno VII y separación dermoepidérmica.

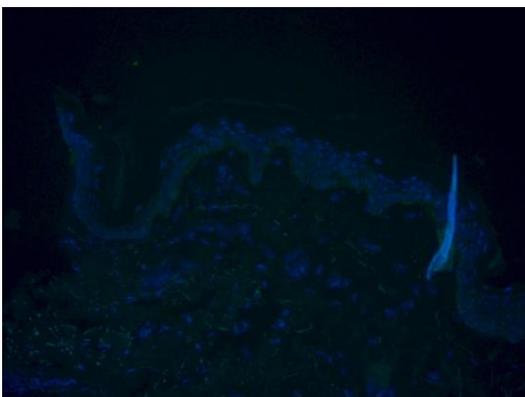


Figura 39: Inmunofluorescencia directa con Anticuerpo LH7.1, presencia de colágeno VII.

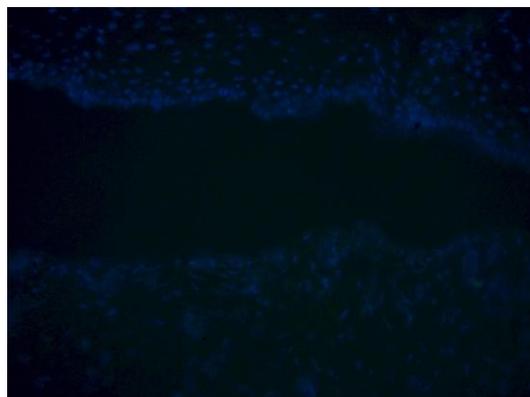


Figura 40: ausencia de colágeno VII y separación dermoepidérmica.

6.8.- Integración y eficacia del implante:

Tabla X.- Ausencia de ampollas en el corte histológico

	N (%)
Visita 3 meses	4 (36.4%)
Visita 8 meses	1 (9.1%)
Visita 12 meses	3 (27.3%)

Se ha medido la ausencia de ampollas en el corte histológico como medida de evaluación de la integración y eficacia del implante desde el punto de vista histológico.

Se evidencia un total de 4 pacientes (36.4%) con ausencia de ampollas en la visita a 3 meses de seguimiento; que se reduce a 1 paciente (9.1%) en la visita a 8 meses; y vuelve a aumentar a 3 pacientes (27.3%) en la visita a 12 meses de seguimiento.

No se ha podido demostrar una diferencia estadísticamente significativa en la evolución desde los 3 a los 8 meses (McNemar; $p=0,180$), ni desde los 3 a los 12 meses (McNemar; $p=0,655$), ni desde los 8 a los 12 meses (McNemar; $p=0,157$).

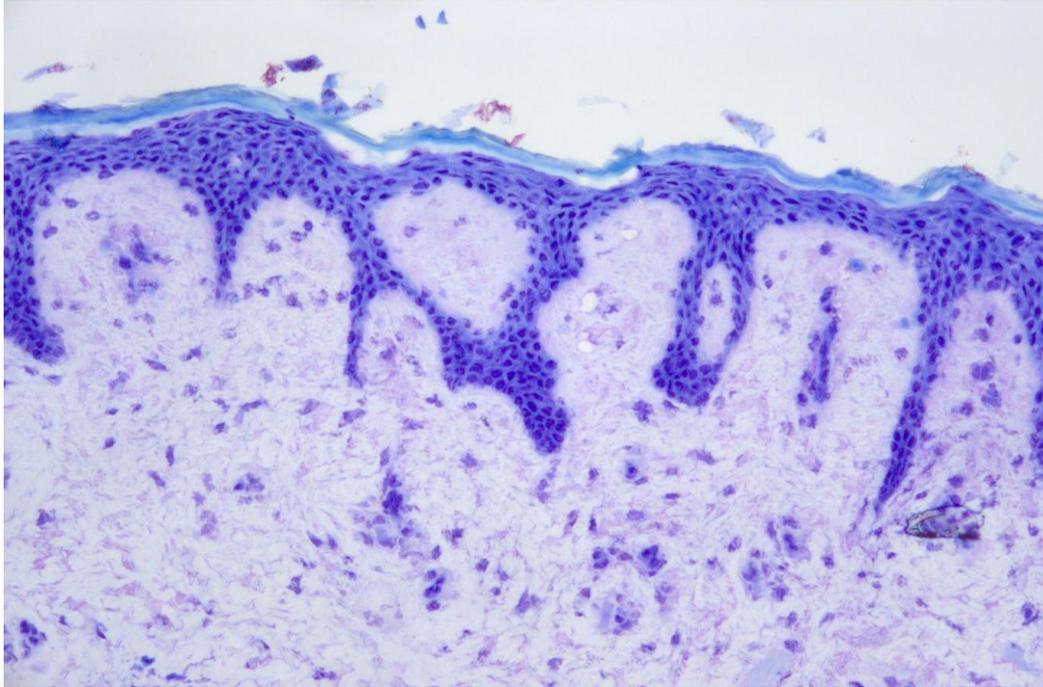


Figura 41: Preparación previa al proceso de inmunofluorescencia de un paciente tratado con piel quimérica apreciándose la existencia de una unión dermoepidérmica normal con ausencia de ampollas y separaciones.

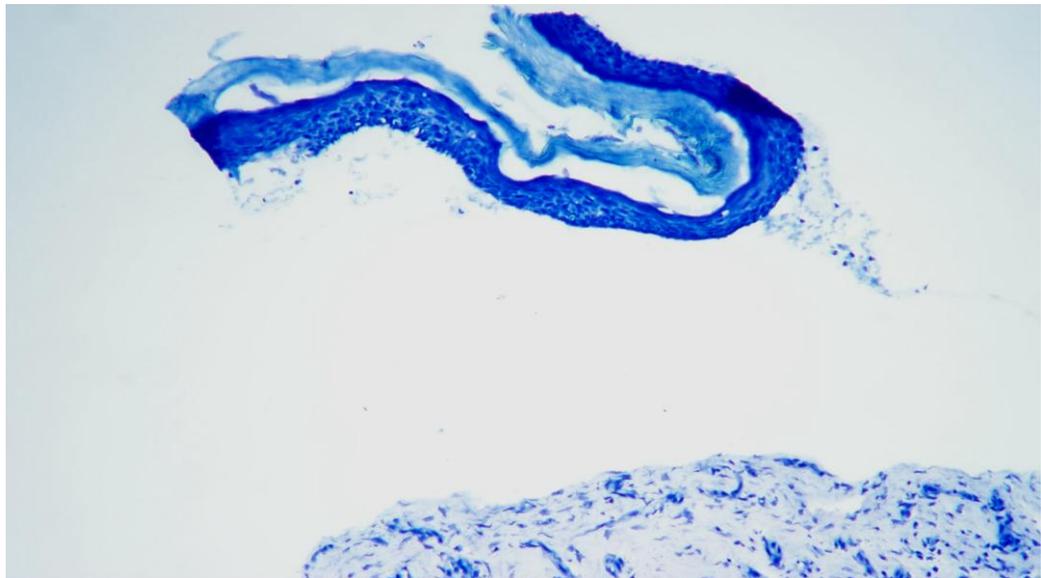


Figura 42: Preparación previa al proceso de inmunofluorescencia de un paciente tratado con piel quimérica apreciándose la separación de la unión dermoepidérmica normal con presencia de una gran ampolla.

6.9.- longitud y anchura de los tratamientos de estudio:

Cuando se evalúan diferencias individuales entre tratamientos en los mismos pacientes, la longitud de la piel quimérica cultivada es similar a la longitud del apósito no adherente; y la anchura del apósito no adherente es mayor que la de la piel quimérica cultivada. No obstante, no se ha evidenciado esta diferencia como estadísticamente significativa (longitud $p=0.838$; anchura $p=0.587$).

Tabla XI.- Longitud de los tratamientos de estudio:

	Apósito	Piel Quimérica cultivada	Diferencia Individual
Media (ee)	71.3 (16.3)	74.3 (12.4)	- 3.0
Mediana	70.0	90.0	0.0

Tabla XII.- Anchura de los tratamientos de estudio

	Apósito	Piel Quimérica cultivada	Diferencia Individual
Media (ee)	67.8 (16.1)	61.5 (36.1)	6.3
Mediana	70.0	80.0	8.0

6.10.- Evaluación global del efecto:

Se ha considerado el efecto global del tratamiento por un lado como la epitelización completa del defecto cutáneo y por otro al 50% de la epitelización del defecto cutáneo.

La piel quimérica cultivada presenta desde este punto de vista un mayor porcentaje de pacientes que consiguen epitelización completa del defecto cutáneo comparado con el apósito no adherente (90.9% vs. 81.8%, respectivamente), repitiéndose exactamente los mismos datos cuando se evalúa el 50% de epitelización. No obstante, el reducido tamaño muestral no permite confirmar estas diferencias como estadísticamente significativas.

Tabla XIII.- Evaluación global del efecto. Pacientes que alcanzan el 100% de epitelización del área afectada.-

100% epitelización	Apósito	Piel quimérica cultivada
Si	9 (81.8%)	10 (90.9%)
No	2 (18.2%)	1 (9.1%)

Tabla XIV.- Evaluación global del efecto. Pacientes que alcanzan el 50% de epitelización del área afectada.-

50% epitelización	Apósito	Piel quimérica cultivada
Si	9 (81.8%)	10 (90.9%)
No	2 (18.2%)	1 (9.1%)

6.11.- Respuesta clínica global:

Se ha considerado la respuesta clínica global en términos de tolerabilidad y eficacia.

Se ha obtenido una tolerabilidad Buena o Muy buena en el 81.8% de los pacientes; dato que coincide con la eficacia Buena o Muy buena.

Tabla XV.- Respuesta clínica global. Tolerabilidad y eficacia

		N (%)
Tolerabilidad	Muy buena	5 (45.5%)
	Buena	4 (36.4%)
	Mala	2 (18.2%)
Eficacia	Muy buena	4 (36.4%)
	Buena	5 (45.5%)
	Mala	1 (9.1%)
	Muy mala	1 (9.1%)

6.12.- Complicaciones durante la investigación.-

La siguiente tabla resume todos los acontecimientos adversos sucedidos durante la investigación:

Tabla XVI.- Acontecimientos adversos:

Sistema orgánico	Término preferente	Total
		e*/p**
		N = 11
Infecciones		5 (36.4%)
	Infección lugar aplicación	1/1 (9.1%)
	Infección neumocócica	1/1 (9.1%)
	Infección estafilocócica	3/2 (18.2%)
Metabolismo	y	1/1 (9.1%)
trastornos nutricionales	Malnutrición	1/1 (9.1%)
Procedimientos		1/1 (9.1%)
Quirúrgicos y médicos	Cambio dispositivo médico	1/1 (9.1%)

*Número de episodios en cada categoría

**Número de episodios en cada categoría, porcentajes calculados como $((n/N)*100)$, donde N es el número total de pacientes de cada grupo.

6.13.- Análisis de acontecimientos adversos:

El 36,4% de los pacientes incluidos en el ensayo clínico presentaron al menos un acontecimiento adverso a lo largo del estudio. No obstante, ninguno de los pacientes presentó un acontecimiento adverso relacionado con el tratamiento del estudio.

La siguiente tabla muestra un resumen de los pacientes que presentaron algún acontecimiento adverso a lo largo del estudio.

Tabla XVII.- Resumen de acontecimientos adversos (AA).-

Parámetro	Total*
	N = 11
Al menos un AA	4 (36.4%)
Al menos un AA relacionado	0 (0.0%)
Al menos un AA con discontinuación	0 (0.0%)
Al menos un AA serio	2 (18.2%)

*Porcentajes calculados por paciente que presentaron al menos un AA.

6.14.- Signos vitales, hallazgos físicos y otras observaciones relacionadas con aspectos de seguridad:

El peso de los pacientes se registro en todas las visitas. El peso en la visita final mostró un porcentaje medio de cambio respecto a la visita de seleccion de 9.19%. La siguiente tabla muestra la evolucion del peso a lo largo del estudio:

Tabla XVIII.- Peso a lo largo del estudio.-

Peso (kg)	Total N = 11	
	Media (de)	% cambio
Visita 0	26.54 (9.80)	-
Visita 2	27.62 (10.78)	1.33
Visita 3	27.38 (10.56)	2.98
Visita final	27.78 (11,13)	9.19

La siguiente tabla muestra la evolución de la frecuencia cardiaca durante el estudio a lo largo de las visitas y el porcentaje de cambio con respecto a la visita de selección:

Tabla XIX.- Frecuencia cardiaca a lo largo del estudio.-

Frecuencia cardiaca (rpm)	Total N = 11	
	Media (de)	% de cambio
Visita 0	102.4 (25.87)	-
Visita 2	95.30 (21.67)	0.12
Visita 3	98.09 (28.54)	- 2.04
Visita final	95.20 (17.49)	- 7.58

7.- Discusión.-

La piel es un área excelente para la aplicación de la terapia génica y ello se debe a su fácil acceso así como la visualización inmediata de los resultados. Incluso en la situación de desarrollar acontecimientos adversos el tejido modificado puede ser resecado. En el caso concreto de la EB, el fácil acceso y el conocimiento de las diferentes mutaciones que se han descubierto en los diferentes tipos de EB, fueron las claves que facilitaron los estudios de genoterapia *in vitro*. Sin embargo existen serios problemas que dificultan la aplicación de la terapia génica en la práctica clínica de pacientes con EB. La compartimentalización de la piel y el proceso de constante autorrenovación hacen necesaria una mayor eficacia en la identificación celular para lograr una expresión duradera del gen en concreto y consecuentemente una corrección fenotípica de larga duración.

Desde la década de los 90' se han logrado importantes avances experimentales y preclínicos en el campo del tratamiento molecular. El mayor conocimiento de las bases génicas de las alteraciones que se producen en la zona de la membrana basal, así como la identificación de los factores moduladores de la enfermedad, han sentado las bases para la corrección de mutaciones génicas específicas. Además, los avances constantes en el diseño de vectores, la transferencia, la inmunomodulación y técnicas como los análisis clonales de células que actúan como precursoras para verificar el mantenimiento prolongado y regulado en ellas de la expresión del transgén a través de múltiples ciclos de renovación epidérmica, constituyen medios

importantes y alentadores que nos acercan cada vez más a la aplicación clínica generalizada de los tratamientos moleculares. Sin embargo, las características histológicas y fisiológicas de la piel suponen obstáculos metodológicos que entorpecen la adopción de técnicas comunes para la transferencia y expresión de transgenes específicos. La epidermis que constituye una importante barrera de protección contra la entrada de microorganismos al cuerpo y contra la desecación, es poco permeable, en especial al agua y los compuestos hidrosolubles, lo que reafirma la importancia de garantizar el funcionamiento correcto de los dispositivos de transporte eficiente de los transgenes. La compartimentalización de la epidermis hace necesario que el gen terapéutico introducido no interfiera con el programa de desarrollo de la proliferación y la diferenciación bien regulados ilustrado por la expresión secuencial de una serie de genes de la capa basal y las capas epidérmicas superiores que determinan la adhesión, el crecimiento y la especialización de las células [246].

A pesar de que en muchos pacientes no se han logrado aún los resultados terapéuticos ideales, y de que aún existen problemas relativos a la aplicación de los tratamientos moleculares, como la inmunogenicidad y la bioseguridad, disponemos ya de varias nuevas aplicaciones biotecnológicas prometedoras para validar el tratamiento génico como una modalidad terapéutica eficaz en los seres humanos.

En el campo del tratamiento génico cutáneo, los esfuerzos de las investigaciones actuales se centran en la EB, y la técnica de aplicación más usada es el método *ex vivo*. Se han adoptado ya un número considerable de medidas necesarias para garantizar un tratamiento génico seguro y eficaz. Se están desarrollando proyectos cuyo objetivo es la corrección de la EB distrófica

recesiva mediante métodos retrovíricos. Dado el éxito de estos estudios, podemos esperar que en los próximos cinco años se inicien varios ensayos clínicos en determinados pacientes con EB. Aunque hasta el momento no existen informes sobre efectos adversos serios relacionados con la integración viral, los resultados del ensayo francés IDSC-X y otros estudios con animales han hecho sonar la alarma sobre las posibles consecuencias genotóxicas aconsejando medidas de seguridad para minimizar riesgos [247].

Por otro lado, para neutralizar mutaciones negativas, la terapia génica debe suprimir la producción de proteínas tóxicas o bien corregir el defecto génico sustituyéndolo por el gen primitivo. Técnicas como el empleo de ribozimas terapéuticas, de oligonucleótidos o la interferencia con el ARN para reducir los niveles de proteína tóxica mejorando el fenotipo pueden abrir un horizonte terapéutico, pero aún no han sido probados con suficiente evidencia en la EB.

La mayoría de los estudios en terapia génica se han dedicado a la corrección de la ausencia de colágeno tipo VII en el EB distrófica recesiva, y ello se debe en parte a ser un tipo de EB con una altísima morbilidad y mortalidad.

La piel humana generada a partir de fibroblastos humanos sanos en combinación con queratinocitos afectados, logró restaurar in vivo la expresión de colágeno tipo VII en la unión dermo-epidérmica en animales de experimentación [248]. Los trabajos publicados por Goto y cols. demostraron que los fibroblastos de pacientes con EBD a los que se había transferido genes mediante retrovirus y que se trasplantaron en ratones aportaron mayor cantidad de colágeno tipo VII que con el uso de queratinocitos transferidos por terapia

génica. Esto hace suponer que los fibroblastos son un componente más apropiado para el uso terapéutico [249]. Otros trabajos recientes han demostrado que la aplicación intravenosa de fibroblastos autógenos creados por ingeniería genética y con expresión elevada de colágeno tipo VII, logró asentamientos en la membrana basal formando estructuras de fibrillas de anclaje y consecuentemente acelerando la cicatrización de las lesiones. Estos resultados apuntan que la proteinoterapia y el tratamiento celular podría ser utilizado en pacientes con EB, y este efecto podría ser facilitado con el uso de células precursoras de médula ósea corregidas por terapia génica pudiendo provocar efectos permanentes [250].

Wong y cols. [251] publicaron en 2008 los efectos de la inyección intradérmica de fibroblastos cultivados con objeto de incrementar la presencia de colágeno VII en la unión dermo-epidérmica en pacientes afectados de EBDR. Estos estudios demostraron que las inyecciones mejoraban la adhesión dermo-epidérmica así como demostraron la evidencia de cambios microscópicos en la ultraestructura de la membrana basal epidérmica incrementándose la presencia de fibras de anclaje rudimentarias. En estos estudios realizados en cinco pacientes afectados de EBDR demostraron el incremento de colágeno VII a las 2 semanas y 3 meses postinyección intradérmica. Los autores postulan que este fenómeno se debe a un incremento de los niveles de COL7A1 con un depósito mayor de colágeno tipo VII mutante en la unión dermo-epidérmica. Esta proteína mutante podría ser parcialmente responsable de la mejoría en la adhesión dermo-epidérmica. Desde el punto de vista práctico y debido a que los pacientes afectados de EBDR tienen múltiples heridas cutáneas, la aplicación

de múltiples inyecciones cutáneas hacen el procedimiento altamente doloroso e incómodo.

Los hallazgos encontrados por Woodley y cols. [250] con las inyecciones intravenosas consiguiendo modificaciones en la membrana basal podría tener una interesante aplicación clínica evitando la incomodidad de las inyecciones cutáneas múltiples. Las observaciones derivadas de estos estudios evidenciaron que la inyección de un número suficiente de fibroblastos conseguían depósitos de colágeno VII y la formación de complejos de anclaje en la unión dermo-epidérmica. Estas experiencias realizadas en animales han demostrado la presencia de fibroblastos en el parénquima pulmonar provocando cambios tisulares, por lo que son necesarios más estudios previos al uso clínico de estas técnicas.

Wagner y cols. [252] han encontrado que la infusión de células alogénicas de médula ósea trasplantada corrigen parcialmente la deficiencia de colágeno VII y consigue mejorar la integridad de la unión dermo-epidérmica. Los investigadores detectaron células donantes en la piel y en la mucosa después del tratamiento. La localización y el tiempo de permanencia fue variable en el grupo de 7 pacientes pediátricos tratados y afectos de EBD. Los efectos del nuevo colágeno VII en la morfología de los complejos de anclaje no está claro. Los esfuerzos en esta línea están dirigidos a comprender la respuesta fisiológica aparente del trasplante de médula ósea y a identificar la población de células madre responsables de este efecto. El trasplante de médula ósea, a pesar de su efecto beneficioso temporal, no deja de ser un procedimiento de alto riesgo y que debería estar dirigido hacia pacientes con

riesgo vital o bien destinado exclusivamente a aquellos pacientes con las formas más severas de epidermólisis bullosa.

Nuestra línea de trabajo se centró más en la terapia celular y así trasplantar piel humana quimérica con fibroblastos alogénicos de donante sano para que funcionen como una fuente alternativa productora de colágeno VII. Esta hipótesis se fundamentó en que si bien el colágeno VII es mayoritariamente aportado por los queratinocitos epidérmicos, la aportación de fibroblastos dérmicos en cantidad suficiente puede suponer una clara mejora en cuanto a la adhesión de la unión dermo-epidérmica así como en la formación de complejos de anclaje. Los fibroblastos a diferencia de los queratinocitos, son poco inmunogénicos y pueden permanecer por largos periodos de tiempo en el receptor. En estos estudios encontramos presencia de fibroblastos y colágeno VII en tres pacientes al año de su aplicación. Del mismo modo se observaron la ausencia de ampollas en la unión dermo-epidérmica en tres pacientes al año del implante. Esta teoría abre unas importantes expectativas pues permitiría poder tratar las áreas más afectadas con estos equivalentes cutáneos formados por queratinocitos autólogos y fibroblastos alogénicos provocando una notable mejoría temporal.

A pesar de que algunas asunciones de la hipótesis del estudio se han desviado, y por lo tanto el estudio no permite extraer conclusiones de forma estadísticamente significativa, el tratamiento con piel quimérica cultivada ha confirmado las estimaciones de que dicho tratamiento podría conseguir reducir en 6 días el tiempo hasta llegar al 100% de epitelización del área afectada.

El resto de variables secundarias analizadas confirma también una mayor eficacia de la piel quimérica cultivada para reducir el tiempo hasta llegar al 50%

de epitelización del área afectada, para evidenciar la presencia de colágeno VII en la unión dermo-epidérmica en el 72.7% de los pacientes ya desde la visita a 3 meses. La ausencia de ampollas ronda la tercera parte de los pacientes en la visita a 3 meses y a 12 meses, dato que se corresponde con la persistencia de fibroblastos alogénicos en las mismas visitas.

Por otro lado, aunque el estudio permite no atribuir los acontecimientos adversos al tratamiento recibido, puesto que ambos tratamientos coincidieron en los pacientes del estudio, ambos tratamientos presentaron un buen perfil de seguridad, sin acontecimientos adversos relacionados, ni abandonos por acontecimiento adverso, ni fenómenos o signos tumorales específicos, ni rechazo inmunológico al tratamiento en ninguno de los pacientes.

Considerando la ausencia de significación estadística debido al bajo tamaño muestral con una amplia dispersión, este estudio confirma la hipótesis planteada en las dos vertientes de eficacia y seguridad. No cabe duda de que serán precisos estudios adicionales que avalen esta teoría y reconfirmen la utilidad de los parches de piel quimérica cultivada frente a los apósitos oclusivos no adherentes en pacientes que padecen la enfermedad de la epidermólisis bullosa distrófica recesiva.

8.- Conclusiones:

Se derivan de este trabajo las siguientes conclusiones:

- 1- La piel quimérica cultivada ha conseguido en menor número de días que el apósito no adherente, el 100% de epitelización en el área tratada (mediana de 3.0 días antes).
- 2- La piel quimérica cultivada ha conseguido también en menor número de días que el apósito no adherente, el 50% de epitelización en el área tratada (mediana de 2.0 días antes).
- 3- Se evidencia persistencia de fibroblastos alogénicos implantados en el 36.4% de los pacientes en la visita a 3 meses, que se mantiene en la visita a los 8 meses y pasa al 27.3% en la visita a los 12 meses de seguimiento.
- 4- Aunque a los 3 meses no se evidencia presencia histológica de colágeno VII, este se detecta en el 72.7% de los pacientes en la visita a los 8 meses y en el 54.5% de los mismos en la visita a los 12 meses.
- 5- Se evidencia ausencia de ampollas en el corte histológico en el 36.4% de los pacientes ya desde la visita a los 3 meses, que pasa a ser del 27.3% en la visita a los 12 meses, aunque en la visita a los 8 meses este dato baja al 9.1%.
- 6- Un mayor porcentaje de pacientes que consiguieron epitelización completa del defecto cutáneo comparado con el apósito no adherente.
- 7- En lo que se refiere a Impresión Clínica Global, se ha obtenido una tolerabilidad Buena o Muy buena en el 81.8% de los pacientes.

Bibliografía:

- 1.- Koebner H. Hereditäre Anlage zur Blasenbildung (epidermolysis bullosa hereditaria). Dtsch Med Wochenschr, 1886; 12:21–22.

- 2.- Fine JD, Bauer EA, Gedde-Dahl T Inherited epidermolysis bullosa: definition and historical overview. In: Fine JD, Bauer EA, McGuire J, Moshell A (eds) Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry. Johns Hopkins University Press, Baltimore (1999).

3. - Gammon WR. Epidermolysis bullosa acquisita: a disease of autoimmunity to type VII collagen. J Autoimmun, 1991; 4: 59–71.

- 4.- Callot-Mellot C. Epidermolysis bullosa acquisita in childhood. Arch Dermatol, 1997; 133:1122–1126.

5. - Sakai LY, Keene DR, Morris NP, Burgeson RE. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. J Cell Biol, 1986; 103:1577–1586.

- 6.- Varki R, Sadowski S, Uitto J, Pfendner E . Epidermolysis bullosa. II. Type VII collagen mutations and phenotype/genotype correlations in the dystrophic subtypes. J Med Genet, 2007; 44:181–192.

7. - Fine J-D, Eady RAJ, Bauer EA. 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*, 2000; 42:1051–1066.
- 8.- Fine J-D, Eady RAJ, Bauer JA . The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol*, 2008; 58: 931–950.
- 9.- Wright JT, Fine JD, Johnson LB. Oral soft tissues in hereditary epidermolysis bullosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1991; 71:440–446
- 10.- Wright JT. Oral manifestations of epidermolysis bullosa. In: Fine JD, Bauer EA, McGuire J, Moshell A (eds) 1999; *Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry*. Johns Hopkins University Press, Baltimore
- 11.- Dowling GB, Meara RH. Epidermolysis bullosa resembling juvenile dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*, 1954; 66:139–143
- 12.- Buchbinder LH, Lucky AW, Ballard E. Severe infantile epidermolysis bullosa simplex: Dowling-Meara type. *Arch Dermatol*, 1986; 122:190–198

- 13.- Fine J-D, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa. *J Pediatr*, 2008; 152:276–280.
- 14.- Fuchs EV. The molecular biology of epidermolysis bullosa simplex. In: Fine JD, Bauer EA, McGuire J, Moshell A (eds) 1999; *Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- 15.- Smith FJD, Morley SM, Rugg EL. Clustering of epidermolysis bullosa simplex mutations in relation to disease phenotype: data from Weber-Cockayne EBS. *J Invest Dermatol*, 1993; 101:481
- 16.- Bauer JW. A compound heterozygous one amino-acid insertion/nonsense mutation in the plectin gene causes epidermolysis bullosa simplex with plectin deficiency. *Am J Pathol*, 2001; 158:617–625
- 17.- Cummins RE. Keratin 14 point mutations at codon 119 of helix 1A resulting in different epidermolysis bullosa simplex phenotypes. *J Invest Dermatol*, 2001; 117:1103–1107
- 18.- Gache Y, Chavanas S, Lacour JP. Defective expression of plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 1996; 97:2289–2298

19.- McLean WHI, Pulkkinen L, Smith FJD. Loss of plectin (HD-1) causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Develop*, 1996; 10:1724–1735

20.- Jonkman MF. Hereditary skin diseases of hemidesmosomes. *J Derm Science*, 1999 20:103–121

21.- Herlitz O. Kongenitaler nicht syphilitischer Pemphigus: eine } Übersicht nebst Beschreibung einer neuen Krankheitsform. *Acta Paediatr*, 1935; 17:315–371.

22.- Darling TN, Bauer JW, Hintner H, Yancey KB. Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Adv Dermatol*, 1997; 13:87–119

23.- Hintner H, Wolff K. Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*, 1982; 118:375–384

24.- Pulkkinen L, Uitto J, ChristianoAM. The molecular basis of the junctional forms of epidermolysis bullosa. In: Fine JD, Bauer EA, McGuire J, Moshell A (eds) 1999; *Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry*. Johns Hopkins University Press, Baltimore

25. Uitto J, Pulkkinen L, Christiano AM. 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*, 1994; 103 [Suppl]:39S–46S
26. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M. Pseudosyndactyly and musculoskeletal deformities in inherited epidermolysis bullosa (EB): experience of the National EB Registry, 1986–2002. *J Hand Surg*, 2005; (British and European Volume) 30B:14–22
27. Haber RM, Hanna W, Ramsay CA, Boxall LBH. Cicatricial junctional epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*, 1985; 12:836–844
28. Buchbinder LH, Lucky AW, Ballard E. Severe infantile epidermolysis bullosa simplex: Dowling-Meara type. *Arch Dermatol*, 1986; 122:190–198
29. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa. *J Pediatr*, 2008; 152:276–280
30. Darling TN, McGrath JA, Yee C. Premature termination codons are present on both alleles of the bullous pemphigoid antigen 2/type XVII collagen gene in five Austrian families with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 1997; 108:463–468

31. Darling TN. A deletion mutation in COL17A1 in five Austrian families with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa represents propagation of an ancestral allele. *J Invest Dermatol*, 1998; 110:170–173
32. Pohla-Gubo G. Diminished expression of the extracellular domain of bullous pemphigoid antigen 2 (BPAG2) in the epidermal basement of patients with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*, 1995; 4:199–206
33. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Tracheolaryngeal complications of inherited epidermolysis bullosa. *Laryngoscope*, 2007; 117:1652–1660
34. Mellerio JE. Pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa syndrome: mutations in the integrin beta4 gene (ITGB4) in two unrelated patients with mild disease. *Br J Dermatol*, 1998; 139:862–871
35. Uitto J, Pulkkinen L, Christiano AM. The molecular basis of the dystrophic forms of epidermolysis bullosa. In: Fine JD, Bauer EA, McGuire J, Moshell A (eds) 1998; *Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry*. Johns Hopkins University Press, Baltimore
36. Uitto J, Pulkkinen L. The genodermatoses: candidate diseases for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2000; 11:2267–2275

37. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M. Pseudosyndactyly and musculoskeletal deformities in inherited epidermolysis bullosa (EB): experience of the National EB Registry, 1986–2002. *J Hand Surg (British and European Volume)*, 2005; 30B:14–22
38. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Gastrointestinal complications of inherited epidermolysis bullosa: cumulative experience of the National EB Registry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008; 46:147–158
39. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M. Inherited epidermolysis bullosa (EB) and the risk of death from renal disease: experience of the National EB Registry. *Am J Kidney Dis*, 2004; 44:651–660
40. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M. Genitourinary complications of inherited epidermolysis bullosa (EB): experience of the National EB Registry and review of the literature. *J Urol*, 2004; 172:2040–2044
41. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M. Eye involvement in inherited epidermolysis bullosa (EB): experience of the National EB Registry. *Am J Ophthalmol*, 2004; 138:254–262
42. Fine JD, Johnson LB, Suchindran C. Cancer and inherited epidermolysis bullosa: lifetable analyses of the National Epidermolysis Bullosa Registry study population. In: Fine JD, Bauer EA, Mc-Guire J, Moshell A (eds), 1999;

Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

43. Fine JD, Johnson LB, Suchindran CM. The National Epidermolysis Bullosa Registry. *J Invest Dermatol*, 1994; 102:54S–56S

44. Gedde-Dahl TJ, Anton-Lamprecht I. Epidermolysis bullosa. In: Emery AEH, Rimoin DL (eds), 1983; *Principles and practice of medical genetics*, 1st edn. Churchill Livingstone, Edinburgh.

45. Gedde-Dahl T, Anton-Lamprecht I. Epidermolysis bullosa. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (eds), 1996; *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*, 3rd edn. Churchill Livingstone, New York.

46. Pavicic Z, Kmet-Vizintin P, Kansky A, Dobric I. Occurrence of hereditary bullous epidermolyses in Croatia. *Pediatr Dermatol*, 1990; 7:108–110.

47. Fine JD, Johnson LB, Suchindran C, Moshell A, Gedde-Dahl T. The epidemiology of inherited EB: findings within American, Canadian, and European study populations. In: Fine JD, Bauer EA, McGuire J, Moshell A (eds), 1999; *Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

48. Tadini G, Gualandri L, Colombi M. The Italian registry of hereditary epidermolysis bullosa. *G Ital Dermatol Venereol*, 2005; 140:359–372
49. Horn HIM, Priestley GC, Eady RAJ, Tidman MJ. The prevalence of epidermolysis bullosa in Scotland. *Br J Dermatol*, 1997; 136:560–564.
50. Pearson RW. Studies on the pathogenesis of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 1962; 39:551–575.
51. Fine J-D, Eady RAJ, Bauer JA. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol*, 2008; 58:931–950.
52. Tylor G, Venning V, Wojnaroska F, Millard PR. Suction-induced basal cell cytolysis in the Weber-Cockayne variant of epidermolysis bullosa simplex. *J Cutan Pathol*, 1993; 20:389–392.
53. Fine JD, Johnson L, Wright T. Epidermolysis bullosa simplex superficialis: a new variant of epidermolysis bullosa characterized by subcorneal skin cleavage mimicking peeling skin syndrome. *Arch Dermatol*, 1989; 125:633–638.
54. Niemi KM, Kero M, Kanerva L, Mattila R. Epidermolysis bullosa simplex. A new histologic subgroup. *Arch Dermatol*, 1983; 119:138–141.

55. Kerl H, Garbe C, Cerroni L, Wolff HH. Hereditäre Epidermolysen. In: Kerl H, Garbe C, Cerroni L, Wolff HH (eds), 2003; *Histopathologie der Haut*. Springer, Berlin.
56. Weedon D. *Skin pathology*, 2nd edn, 2002; Churchill Livingstone, Oxford
57. Bruckner-Tuderman L, Niemi KM, Kero M, Schnyder UW, Reunala T. Type-VII collagen is expressed but anchoring fibrils are defective in dystrophic epidermolysis bullosa inversa. *Br J Dermatol*, 1990; 122:383–390.
58. Eady RAJ. Diagnosis of epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*, 1983; 108:621–627.
59. Hintner H, Stingl G, Schuler G. Immunofluorescence mapping of antigenic determinants within the dermal-epidermal junction in mechanobullous diseases. *J Invest Dermatol*, 1981; 76:113–118.
60. McGrath JA, Darling T, Gatalica B. Ahomozygous deletion mutation in the gene encoding the 180-kDa bullous pemphigoid antigen (BPAG2) in a family with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 1996; 106:771–774.
61. Shimizu H, McGrath JA, Christiano AM, Nishikawa T, Uitto J. Molecular basis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa: genotype/phenotype

correlation in a case of moderate clinical severity. *J Invest Dermatol*, 1996; 106:119–124.

62. Pearson RW. Studies on the pathogenesis of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 1962; 39:551–575.

63. Anton-Lamprecht I, Hashimoto I. Epidermolysis bullosa dystrophica-recessive: a possible role of anchoring fibrils in the pathogenesis. *J Invest Dermatol*, 1976; 32:69–76.

64. Briggaman RA, Wheeler CE. Epidermolysis bullosa dystrophica-recessive: a possible role of anchoring fibrils in the pathogenesis. *J Invest Dermatol*, 1975; 65:203–211.

65. Tidman MJ, Eady RAJ. Evaluation of anchoring fibrils and other components of the dermalepidermal junction in dystrophic epidermolysis by a quantitative ultrastructural technique. *J Invest Dermatol*, 1985; 84:374–377.

66. Arwill T, Bergenholtz A, Thilander H. Epidermolysis bullosa hereditaria. 5. The ultrastructure of oral mucosa and skin in four cases of the letalis form. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1968; 74:311–324.

67. Hashimoto I, Gedde-Dahl T Jr, Schnyder UW, Anton-Lamprecht I. Ultrastructural studies in epidermolysis bullosa hereditaria: IV. Recessive

dystrophic types with junctional blistering (infantile or Herlitz-Pearson type and adult type). *Arch Dermatol Res*, 1976; 257:17–32.

68. Pearson RW, Potter B, Strauss F. Epidermolysis bullosa hereditaria letalis: clinical and histological manifestations and course of the disease. *Arch Dermatol*, 1974; 109:349–355.

69. Tidman MJ, Eady RAJ. Hemidesmosome heterogeneity in junctional epidermolysis bullosa revealed by morphometric analysis. *J Invest Dermatol*, 1986; 86:51–56.

70. Anton-Lamprecht I. Ultrastructural identification of basic abnormalities as clues to genetic disorders of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 1994; 103:6S–12S.

71. Eady RAJ, McGrath JA, McMillan JR. Ultrastructural clues to genetic disorders of skin: the dermal-epidermal junction. *J Invest Dermatol*, 1994; 103 [Suppl]:13S–18S.

72. Smith LT. Ultrastructural findings in epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*, 1993; 129:1578–1584.

73. Fine JD, Horiguchi Y, Stein DH, Esterly NB, Leigh IM. Intraepidermal type VII collagen. Evidence for abnormal intracytoplasmic processing of a major basement protein in rare patients with dominant and possibly localized

recessive forms of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*, 1990; 22:188–195.

74. Haneke E, Anton-Lamprecht I. Ultrastructure of blister formation in epidermolysis bullosa hereditaria: V. Epidermolysis bullosa simplex localisata type Weber- Cockayne. *J Invest Dermatol*, 1982; 78:219–223.

75. Anton-Lamprecht I, Schnyder UW. Epidermolysis bullosa herpetiformis Dowling-Meara: a report of a case and pathomorphogenesis. *Dermatologica*, 1982; 164:221–235.

76. McGrath JA, Ishida-Yamamoto A, Tidman MJ, Heagerty AHM, Schofield OMV, Eady RAJ. Epidermolysis bullosa simplex (Dowling-Meara). A clinicopathological review. *Br J Dermatol*, 1992; 126:421–430.

77. Niemi KM, Kero M, Kanerva L, Mattila R. Epidermolysis bullosa simplex. A new histologic subgroup. *Arch Dermatol*, 1983; 119:138–141.

78. Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Chapman SJ, Leigh IM, Lane EB, Eady RAJ. Epidermolysis bullosa simplex (Dowling-Meara type) is a genetic disease characterized by an abnormal keratin-filament network involving keratins K5 and K14. *J Invest Dermatol*, 1991; 97:959–968.

79. Fine JD, Stenn J, Johnson L, Wright T, Bock H-GO, Horiguchi Y. Autosomal recessive epidermolysis bullosa simplex: generalized phenotypic features

suggestive of junctional or dystrophic epidermolysis bullosa, and association with neuromuscular diseases. *Arch Dermatol*, 1989; 125:931–938.

80. Gache Y, Chavanas S, Lacour JP. Defective expression of plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 1996; 97:2289–2298.

81. Niemi K-M, Sommer H, Kero M, Kanerva L, Haltia M. Epidermolysis bullosa simplex associated with muscular dystrophy with recessive inheritance. *Arch Dermatol*, 1998; 124:551–554.

82. Smith FJ, Eady RAJ, Leigh IM. Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. *Nature Genet*, 1996; 13:450–457.

83. Fine JD, Johnson L, Wright T. Epidermolysis bullosa simplex superficialis: a new variant of epidermolysis bullosa characterized by subcorneal skin cleavage mimicking peeling skin syndrome. *Arch Dermatol*, 1989; 125:633–638.

84. Chan Y-M, Anton-Lamprecht I, Yu Q-C. A human keratin 14 «knockout»: the absence of K14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein. *Genes and Development*, 1994; 8:2574–2587.

85. Rugg EL, McLean WHI, Lane EB. A functional «knockout» of human keratin 14. *Genes and Development*, 1994; 8:2563–2573.

86. Bruckner-Tuderman L, Vogel A, Ruegger S, Odermatt B, Tonz O, SchnyderUW. Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *J Am Acad Dermatol*, 1989; 21:425–432.
87. Coleman R, Harper J, Lake B. Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation. *Br J Dermatol*, 1993; 128:679–685.
88. Varari MD, Phillips RJ, Lake BD, Harper JI. Junctional epidermolysis bullosa and pyloric atresia: a distinct entity. *Br J Dermatol*, 1995; 133:732–736.
89. McMillan JR, McGrath JA, Tidman MJ, Eady RAJ. Hemidesmosomes show abnormal association with the keratin filament network in junctional forms of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 1998; 110:132–137.
90. Hintner H, Wolff K. Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*, 1982; 118:375–384.
91. Huber M, Floeth M, Borradori L. Deletion of the cytoplasmic domain of BP180/collagenXVII causes a phenotype with predominant features of epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol*, 2002; 118:185–192.
92. Pasmooij AM, van der Steege G, Pas HH. Features of epidermolysis bullosa simplex due to mutations in the ectodomain of type XVII collagen. *Br J Dermatol*, 2004; 151:669–674.

93. Hashimoto K, Matsumoto M, Iacobelli D. Transient bullous dermolysis of the newborn. *Arch Dermatol*, 1985; 121:1429–1438.
94. Fine J-D, Eady RAJ, Bauer JA. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol*, 2008; 58:931–950.
95. Zlotogora J. Parents of children with autosomal recessive diseases are not always carriers of the respective mutant alleles. *Hum Genet*, 2004; 114:521–526.
96. Kotzot D, Utermann G. Uniparental disomy (UPD) other than 15: Phenotypes and bibliography updated. *Amer J Med Genet Part A*, 2005; 136A:287–305.
97. Fassihi H, Wessagowit V, Ashton GH, Moss C, Ward R, Denyer J, Mellerio JE, McGrath JA. Complete paternal uniparental isodisomy of chromosome 1 resulting in Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol*, 2005; 30:71–74.
98. Pulkkinen L, Bullrich F, Czarnecki P, Weiss L, Uitto J. Maternal uniparental disomy of chromosome 1 with reduction to homozygosity of the LAMB3 locus in a patient with Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet*, 1997; 61:611–619.

99. Takizawa Y, Pulkkinen L, Chao SC, Nakajima H, Nakano Y, Shimizu H, Uitto J. Mutation report: complete paternal uniparental isodisomy of chromosome 1: a novel mechanism for Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 2000; 115:307–311.

100. Takizawa Y, Pulkkinen L, Shimizu H, Lin L, Hagiwara S, Nishikawa T, Uitto J. Maternal uniparental meroisodisomy in the LAMB3 region of chromosome 1 results in lethal junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 1998; 110:828–831.

101. Fassihi H, Lu L, Wessagowit V, Ozoemena LC, Jones CA, Dopping-Hepenstal PJ, Foster L, Atherton DJ, Mellerio JE, McGrath JA. Complete maternal isodisomy of chromosome 3 in a child with recessive dystrophic epidermolysis bullosa but no other phenotypic abnormalities. *J Invest Dermatol*, 2006; 126:2039–2043.

102. Hon KL, Burd A, Choi PC, Luk NM. Epidermolysis bullosa in three Chinese neonates. *J Dermatolog Treat*, 2007; 18:306–311.

103. Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *J Med Genet*, 2001a; 38:497–507.

104. Swales AKE, Spears N. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction*, 2005; 130:389–399.
105. Coan PM, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Imprinted genes in the placenta – A review. *Placenta*, 2005; 26:S10–S20.
106. Miozzo M, Simoni G. The role of imprinted genes in fetal growth. *Biol Neonate*, 2002; 81:217–228.
107. Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *J Med Genet*, 2001b; 38:497–507.
108. Robinson WP. Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays*, 2000; 22:452–459.
109. Jonkman MF, Castellanos Nuijts M, van Essen AJ. Natural repair mechanisms in correcting pathogenic mutations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol*, 2003; 28:625–631.
110. Lombillo VA, Sybert VP. Mosaicism in cutaneous pigmentation. *Curr Opin Pediatr*, 2005; 17:494–500.
111. Paller AS. Piecing together the puzzle of cutaneous mosaicism. *J Clin Invest*, 2004; 114:1407–1409.

112. Cohen MM. Proteus syndrome: an update. *Am J Med Genet Part C*, 2005; 137C:38–52.

113. Pasmooij AMG, Pas HH, Bolling MC, Jonkman MF. Revertant mosaicism in junctional epidermolysis bullosa due to multiple correcting second-site mutations in LAMB3. *J Clin Invest*, 2007; 117:1240–1248.

114. Jonkman MF, Scheffer H, Stulp R. Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell*, 1997; 88:543–551.

115. Pasmooij AMG, Pas HH, Deviaene FCL, Nijenhuis M, Jonkman MF. Multiple correcting COL17A1 mutations in patients with revertant mosaicism of epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet*, 2005; 77:727–740.

116. Hamm H. Cutaneous mosaicism of lethal mutations. *Am J Med Genet*, 1999; 85:342–345.

117. Poblete-Gutierrez P. Allelic loss underlies type 2 segmental Hailey-Hailey disease, providing molecular confirmation of a novel genetic concept. *J Clin Invest*, 2004; 114:1467–1474.

118. Happle R, König A. Dominant traits may give rise to paired patches of either excessive or absent involvement. *Am J Med Genet*, 1999; 84:176–177.

119. Schuilenga-Hut PHL, Scheffer H, Pas HH, Nijenhuis M, Buys CHCM, Jonkman MF. Partial revertant mosaicism of keratin 14 in a patient with recessive epidermolysis bullosa simplex. *J Invest Dermatol*, 2002; 118:626–630.

120. Gache Y, Allegra M, Bodemer C. Genetic bases of severe junctional epidermolysis bullosa presenting spontaneous amelioration with aging. *Hum Mol Genet*, 2001; 10:2453–2461.

121. Irvine AD, McLean WH. The molecular genetics of the genodermatoses: progress to date and future directions. *Br J Dermatol*, 2003; 148:1–13.

122. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med*, 2006; 12:1397–1402.

123. Ashton GHS, Eady RAJ, McGrath JA. Prenatal diagnosis for inherited skin disease. *Clin Dermatol*, 2000; 18:643–648.

124. Rodeck CH, Eady RAJ, Gosden CM. Prenatal diagnosis of epidermolysis bullosa letalis. *Lancet*, 1980; 1:949–952.

125. Golbus MS, Sagebiel RW, Filly RA, Gindhart TD, Hall JG. Prenatal diagnosis of congenital bullous ichthyosiform erythroderma (epidermolytic hyperkeratosis) by fetal skin biopsy. *N Engl J Med*, 1980; 302:93–95.
126. Rodeck CH, Nicolaides KH. Fetoscopy and fetal tissue sampling. *Br Med Bull*, 1983; 39:332–337.
127. Eady RA, Gunner DB, Tidman MJ, Nicolaides KH, Rodeck CH. Rapid processing of fetal skin for prenatal diagnosis by light and electron microscopy. *J Clin Pathol*, 1984; 37:633–638.
128. Heagerty AHM, Kennedy AR, Gunner DB, Eady RAJ. Rapid prenatal diagnosis and exclusion of epidermolysis bullosa using novel antibody probes. *J Invest Dermatol*, 1986; 86:603–605.
129. Fine JD, Holbrook KA, Elias S, Anton-Lamprecht I, Rauskolb R. Applicability of 19-DEJ-1 monoclonal antibody for the prenatal diagnosis or exclusion of junctional epidermolysis bullosa. *Prenat Diagn*, 1990; 10:219–229.
130. Heagerty AHM, Eady RAJ, Kennedy AR. Rapid prenatal diagnosis of epidermolysis bullosa letalis using GB3 monoclonal antibody. *Br J Dermatol*, 1987; 117:271–275.

131. Jonkman MF, De Long MC, Heeres K, Sonnenberg A. Expression of integrin alpha6 beta4 in junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 1992; 99:489–496.
132. Jonkman MF, de Jong MC, Heeres K. 180-kD bullous pemphigoid antigen (BP180) is deficient in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Clin Invest*, 1995; 95:1345–1352.
133. Gache Y, Chavanas S, Lacour JP. Defective expression of plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *J Clin Invest*, 1996; 97:2289–2298.
134. Holbrook KA, Smith LT, Elias S. Prenatal diagnosis of genetic skin disease using fetal skin biopsy samples. *Arch Dermatol*, 1993; 129:1437–1454.
135. McGrath JA, Dunnill MGS, Christiano AM. First trimester DNA-based exclusion of recessive dystrophic epidermolysis bullosa from chorionic villus sampling. *Br J Dermatol*, 1996; 134:734–739.
136. Broen AN, Moum T, Bodtker AS, Ekeberg O. The course of mental health after miscarriage and induced abortion: a longitudinal, five-year follow-up study. *BMC Med*, 2005; 3:18.

137. Muth C, Exler U, Miny P, Holzgreve W. Psychological adjustment to abortion for genetic indications in the 2nd trimester. *Z Geburtshilfe Perinatol* 193:96–99.
138. Rayburn WF, LaFerla JJ. Second-trimester pregnancy termination for genetic abnormalities. *J Reprod Med*, 1982; 27:584–588.
139. Alfirevic Z, Sundberg K, Brigham S. Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003; 3:CD003252.
140. Brady RO, Uhlendorf BW, Jacobson CB. Fabry's disease: antenatal detection. *Science*, 1971; 172:174–175.
141. Deyback JC, Grandchamp B, Grelier M. Prenatal exclusion of congenital erythropoietic porphyria (Günther's disease) in a fetus at risk. *Hum Genet*, 1980; 53:217–221.
142. Dolan CR, Smith LT, Sybert VP. Prenatal detection of epidermolysis bullosa letalis with pyloric atresia in a fetus by abnormal ultrasound and elevated alpha-fetoprotein. *Am J Med Genet*, 1993; 47:395–400.

143. Yacoub T, Campbell CA, Gordon YB, Kirby JD, Kitau MJ. Maternal serum and amniotic fluid concentrations of alphafetoprotein in epidermolysis bullosa simplex. *Br Med J*, 1979; 1:307.
144. Christiano AM, Pulkkinen L, McGrath JA, Kon A, Uitto J. Mutation based prenatal diagnosis of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Prenat Diagn*, 1997; 17:343–354.
145. Dunnill MG, Rodeck CH, Richards AJ. Use of type VII collagen gene (COL7A1) markers in prenatal diagnosis of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Med Genet*, 1995; 32:749–750.
146. Hovnanian A, Hilal L, Blanchet-Bardon C. DNA-based prenatal diagnosis of the Hallopeau Siemens form of recessive epidermolysis bullosa by type VII collagen gene analysis in six pregnancies at risk for recurrence. *J Invest Dermatol*, 1995; 104:456–461.
147. Vailly J, Pulkkinen L, Miquel C. Identification of a homozygous onebasepair deletion in exon 14 of the LAMB3 gene in a patient with Herlitz junctional epidermolysis bullosa and prenatal diagnosis in a family at risk for recurrence. *J Invest Dermatol*, 1995; 104:462–466.
148. Fassihi H, Eady RA, Mellerio JE. Prenatal diagnosis for severe inherited skin disorders: 25 years' experience. *Br J Dermatol*, 2006; 154:106–113.

149. Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie CM. Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet*, 2002; 3:941–953.
150. Ogilvie CM, Braude PR, Scriven PN. Preimplantation genetic diagnosis – an overview. *J Histochem Cytochem*, 2005; 53:255–260.
151. Renwick PJ, Ogilvie C. Preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases: overview and emerging issues. *Expert Rev Mol Diagn*, 2007; 7:33–43.
152. Devroey P, Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update*, 2004; 10:19–28.
153. Sermon KD, Michiels A, Harton G. ESHREPGD Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod*, 2007; 22:323–336.
154. Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Human Reprod*, 1990; 5:708–714.
155. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 1990; 344:768–770.

156. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 1992; 327:905–909.

157. Grace J, El-Toukhy T, Scriven P. Three hundred and thirty cycles of preimplantation genetic diagnosis for serious genetic disease: clinical considerations affecting outcome. *BJOG*, 2006; 113:1393–1401.

158. Cserhaimi-Friedman PB, Tang Y, Adler A, Krey L, Grifo JA, Christiano AM. Preimplantation genetic diagnosis in two families at risk for recurrence of Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*, 2000; 9:290–297.

159. Fassihi H, Grace J, Lashwood A. Preimplantation genetic diagnosis of skin fragilityectodermal dysplasia syndrome: birth of a healthy baby four years after embryo diagnosis and following two frozen embryo replacement cycles. *Br J Dermatol*, 2006; 154:546–550.

160. Thornhill AR, Pickering SJ, Whittock NV. Preimplantation genetic diagnosis of compound heterozygous mutations leading to ablation of plakophilin-1 (PKP1) and resulting in skin fragility ectodermal dysplasia syndrome: a case report. *Prenat Diagn*, 2000; 20:1055–1062.

161. Fassihi H, Renwick PJ, Black C, McGrath JA. Single cell PCR amplification of microsatellites flanking the COL7A1 gene and suitability for

preimplantation genetic diagnosis of Hallopeau-Siemens recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Derm Sci*, 2006; 42:241–248.

162. Hellani A, Coskun S, Tbakhi A, Al-Hassan S. Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online*, 2005; 10:376–380.

163. Renwick PJ, Trussler J, Ostad-Saffari E. Proof of principle and first cases using preimplantation genetic haplotyping – a paradigm shift for embryo diagnosis. *Reprod Biomed Online*, 2006; 13:110–119.

164. Fassihi H, Renwick PJ, Pickering S, Braude P, McGrath JA. Preimplantation genetic diagnosis for inherited skin disorders in the UK: from bench to bedside to birth. *Br J Dermatol*, 2006; 155 [Suppl 1]:3–4.

165. Uitto J, Pfendner E, Jackson LC. Probing the fetal genome: progress towards noninvasive prenatal diagnosis. *Trends Mol Med*, 2003; 9:339–343.

166. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn*, 2002; 22:609–615.

167. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997; 350:485–487.

168. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*, 2002; 42:1079–1085.
169. Poon LL, Leung TN, Lau TK, LoYM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 2000; 46:1832–1834.
170. Dennis Lo YM, Chiu RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet*, 2007; 8:71–77.
171. Fine JD, Johnson L , Wright T. Epidermolysis bullosa simplex superficialis: a new variant of epidermolysis bullosa characterized by subcorneal skin cleavage mimicking peeling skin syndrome. *Arch Dermatol*, 1989; 125:633–638.
172. Jonkman MF, Pasmooij AM, Pasmans SG. Loss of desmoplakin tail causes lethal acantholytic epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet*, 2005; 77:653–660.
173. McGrath JA, McMillan JR, Shemano CS. Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Genet*, 1997; 17:240–244.

174. Bart BJ, Gorlin RJ, Anderson VE , LynchTW. Congenital localized absence of skin and associated abnormalities resembling epidermolysis bullosa. A new syndrome. Arch Dermatol, 1996; 93:296–304.

175. Fine JD, Johnson LB, Suchindran C. Cutaneous and skin-associated musculoskeletal manifestations of inherited EB: the National Epidermolysis Bullosa Registry experience. In: Fine JD, Bauer EA, McGuire J, Moshell A (eds), 1999; Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

176. Fine J-D, Johnson LB, Tien H, et al (1994) Classification and regression tree (CART) statistical technique for diagnosis of major types of inherited epidermolysis bullosa (EB) – a split sample analysis of the National EB Registry dataset (abstract). J Invest Dermatol, 1994; 103:846.

177. Elder DE, Clark WHJ, Elenitsas R, Guerry DT, Halpern AC. The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. Semin Diagn Pathol, 1993; 10:18–35.

178. Bauer JW, Schaeppi H, Kaserer C, Hantich B, HintnerH. Large melanocytic nevi in hereditary epidermolysis bullosa. J Am Acad Dermatol, 2001; 44:577–584.

179. Swensson O, Christophers E . Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa in 2 siblings complicated by multiple squamous cell carcinomas. *Arch Dermatol*, 1998; 134:199–203.
180. Weber F, Bauer JW, Sepp N. Squamous cell carcinoma in junctional and dystrophic epidermolysis bullosa. *Acta Derm Venereol*, 2001; 81:189–192.
181. Reed WB, College J, Francis MJO. Epidermolysis bullosa dystrophica with epidermal neoplasms. *Arch Dermatol*, 1974; 110:894–902.
182. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M, Li K-P, Suchindran C. Inherited epidermolysis bullosa (EB) and the risk of life-threatening skin-derived cancers: experience of the National EB Registry, 2008; 1986–2006.
183. Mallipeddi R. Epidermolysis bullosa and cancer. *Clin Exp Dermatol*, 2002; 27:616–623.
184. Fine J-D. Possible role of sentinel node biopsy in the management of squamous cell carcinomas in inherited epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*, 2004; 140:1012-1013.
185. Bastin KT, Steeves RA, Richards MJS. Radiation therapy for squamous cell carcinoma in dystrophic epidermolysis bullosa: case reports and literature review. *Am J Clin Oncol (CCT)*, 1997; 20:55–58.

186. Gans LA. Eye lesions of epidermolysis bullosa: clinical features, management, and prognosis. *Arch Dermatol*, 1988; 124:762–764.
187. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M. Eye involvement in inherited epidermolysis bullosa (EB): experience of the National EB Registry. *Am J Ophthalmol*, 2004; 138:254–262.
188. Fine J-D, Johnson LB, WeinerM, SuchindranC. Tracheolaryngeal complications of inherited epidermolysis bullosa. *Laryngoscope*, 2007; 117:1652–1660.
189. Hore I, Bajaj Y, Denyer J. The management of general and disease specific ENT problems in children with epidermolysis bullosa – a retrospective case note review. *J Ped Otorhinolaryngology*, 2007; 71:385–391.
190. Wright JT, Fine JD, Johnson LB, Steinmetz TT. Oral involvement of recessive dystrophic epidermolysis bullosa inversa. *Am J Med Genet*, 1993; 47: 1184-1188.
191. Serrano-Martínez MC, Bagán JV, Silvestre FJ, Viguier MT. Oral lesions in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Oral diseases*, 2003; 9: 264.
192. Wright JT, Fine JD, Johnson L. dental caries risk in hereditary epidermolysis bullosa. *Pediatr Dent*, 1994; 16: 427-432.

193. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Gastrointestinal complications of inherited epidermolysis bullosa: cumulative experience of the National EB Registry. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008; 46:147–158.
194. Wright JT, Fine JD, Johnson LB. Oral soft tissues in hereditary epidermolysis bullosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1991; 71:440–446.
195. Wright JT, Fine J-D, Johnson LB. Hereditary epidermolysis bullosa: oral manifestations and dental management. *Pediatr Dent*, 1993; 15:242–248.
196. Pulkkinen L, Rouan F, Bruckner-Tuderman L. Novel ITGB4 mutations in lethal and non-lethal variants of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: missense vs. nonsense. *Am J Hum Genet*, 1998; 63:1376–1387.
197. Pulkkinen L, Uitto J. Hemidesmosomal variants of epidermolysis bullosa. Mutations in the $\alpha 6\beta 4$ integrin and the 180-kD bullous pemphigoid antigen/type XVII collagen genes. *Exp Dermatol*, 1998; 7:46–64.
198. Pfindner E, Uitto J. Plectin gene mutations can cause epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Invest Dermatol*, 2005; 124:111–115.
199. Greider JL Jr, Flatt AE. Surgical restoration of the hand in epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*, 1988; 124:765–767.
200. Becker MH, Swinyard CA. Epidermolysis bullosa dystrophica in children: radiologic manifestations. *Radiology*, 1968; 90:124–128.

201. Mauro MA, Parker CA, Hartley WS, Renner JB. Epidermolysis bullosa: radiographic findings in 16 cases. *AJR*, 1987; 149:219–232.
202. Wong WL, Pemberton J. The musculoskeletal manifestations of epidermolysis bullosa: an analysis of 19 cases with a review of the literature. *Br J Radiol*, 1992; 65: 480–484.
203. Ciccarelli AO, Rothaus KO, Carter DM, Lin AN. Plastic and reconstructive surgery in epidermolysis bullosa: clinical experience with 110 procedures in 25 patients. *Ann Plast Surg*, 1995; 35:254–261.
204. Terrill PI, Mayou BJ, McKee PH, Eady RAJ. The surgical management of dystrophic epidermolysis bullosa (excluding the hand). *Br J Plast Surg*, 1992; 45:426–434.
205. Waber LJ, Valle D, Neill C, DiMauro S, Shug A. Carnitine deficiency presenting as familial cardiomyopathy: a treatable defect in carnitine transport. *J Pediatr*, 1982; 101: 700–705.
206. Zales VR, Benson JrDW. Reversible cardiomyopathy due to carnitine deficiency from renal tubular wasting. *Pediatr Cardiol*, 1995; 16:76–78.
207. Bourke JF, Browne G, Gaffney EF, Young M. Fatal systemic amyloidosis (AA type) in two sisters with dystrophic epidermolysis bullosa. *J Am Acad Dermatol*, 1995; 33: 370–372.

208. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M. Genitourinary complications of inherited epidermolysis bullosa (EB): experience of the National EB Registry and review of the literature. *J Urol*, 2004; 172: 2040–2044.
209. Fewtrell MS, Allgrove J, Gordon I. Bone mineralization in children with epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*, 2006; 154: 959–962.
210. Sibbald RG, Orsted H, Schultz GS, Coutts P, Keast D. Preparing the wound bed 2003: focus on infection and inflammation. *Ostomy Wound Manage*, 2003; 49: 23–51.
211. Molan PC. The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *Int J Low Extrem Wounds*, 2006; 5:40–54.
212. Abahussein AA, al-Zayir AA, Mostafa WZ, Okoro AN. Recessive dystrophic epidermolysis bullosa treated with phenytoin. *Int J Dermatol*, 1992; 31:730–732.
213. Caldwell-Brown D, Stern RS, Lin AN, Carter DM. Lack of efficacy of phenytoin in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N Engl J Med*, 1992; 327: 163–167.

214. Fine J-D. Epidermolysis bullosa: a genetic disease of altered cell adhesion and wound healing, and the possible clinical utility of topically applied thymosin b4. *Ann NY Acad Sci*, 2007; 1112: 396–406.
215. Featherstone C. Epidermolysis bullosa: from fundamental molecular biology to clinical therapies. *J Invest Dermatol*, 2007; 127: 256–259.
216. McGrath PA, Seifert CE, Speechley KN, Booth JC, Stitt L, Gibson MC. A new analogue scale for assessing children's pain: an initial validation study. *Pain*, 1996; 64:435–443.
217. Wong DL, BakerCM. Pain in children: comparison of assessment scales. *Pediatr Nurs*, 1988; 14: 9–17.
218. Howard RF. Current status of pain management in children. *JAMA*, 2003; 290: 2464–2469.
219. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Assessment of mobility, activities and pain in different subtypes of epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol*, 2004; 29: 122–127.
220. Herod J, Denyer J, Goldman A, Howard R. Epidermolysis bullosa in children: pathophysiology, anaesthesia and pain management. *Paediatr Anaesthesia*, 2002; 12: 388–397.

221. Jay S, Elliott CH, Fitzgibbons I, Woody P, Siegel S. A comparative study of cognitive behavior therapy versus general anesthesia for painful medical procedures in children. *Pain*, 1995; 62: 3–9.
222. Chambers CT, Reid GJ, McGrath PJ, Finley GA. Development and preliminary validation of a postoperative pain measure for parents. *Pain*, 1996; 68: 307–313.
223. Mellerio JE, Weiner M, Denyer J. Medical management of epidermolysis bullosa: proceedings of the 11nd international symposium on epidermolysis bullosa, Santiago, Chile, 2005. *Int J Dermatol*, 2007; 46: 795–800.
224. McGrath JA, Burrows NP, Russell Jones R, Eady RAJ. Epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara: troublesome blistering and pruritus in an adult patient. *Dermatology*, 1993; 186: 68–71.
225. McGrath JA, Schofield OMV, Eady RAJ. Epidermolysis bullosa pruriginosa: dystrophic epidermolysis bullosa with distinctive clinicopathological features. *Br J Dermatol*, 1994; 130: 617–625.
226. Mellerio JE, Ashton GHS, Mohammedi R, Lyon CC, Kirby B. Allelic heterogeneity of dominant and recessive COL7A1 mutations underlying epidermolysis bullosa pruriginosa. *J Invest Dermatol*, 1999; 112: 984–987.

227. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M. Pseudosyndactyly and musculoskeletal deformities in inherited epidermolysis bullosa (EB): experience of the National EB Registry, 1986–2002. *J Hand Surg*, 2005; (British and European Volume) 30B:14–22.

228. Glicenstein J, Mariani D, Haddad R. The hand in recessive epidermolysis bullosa. *Hand Clinics*, 2000; 16: 637–645.

229. Terrill PJ, Mayou BJ, Pemberton J. Experience in the surgical management of the hand in dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Plast Surg*, 1992; 45: 432–442.

230. Greider JL Jr, Flatt AE. Surgical restoration of the hand in epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*, 1988; 124: 765–767.

231. Okada T, Sasaki F, Shimizu H. Effective esophageal balloon dilatation for esophageal stenosis due to epidermolysis bullosa. *Eur J Pediatr Surg*, 2006; 16: 115–119.

232. Feurle GE, Weidauer H, Baldauf G, Schulte-Braucks T, Anton-Lamprecht I. Management of esophageal stenosis in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Gastroenterology*, 1984; 87: 1376–1380.

233. Allman S, Haynes L, MacKinnon P, Atherton DJ. Nutrition in dystrophic epidermolysis bullosa. *Pediatr Dermatol*, 1992; 9: 231–238.

234. Smith PK, Davidson GP, Moore L. Epidermolysis bullosa and severe ulcerative colitis in an infant. *J Pediatr*, 1993; 122: 600–603.
235. Shah N, Freeman E, Martinez A, Mellerio J, Smith VV, Sebire NJ. Histopathological features of gastrointestinal mucosal biopsy specimens in children with epidermolysis bullosa. *J Clin Pathol*, 2007; 60: 843–844.
236. Soriano LF, Lage Vazquez MA, Perez-Portabella Maristany C, Xandri Graupera JM, Wouters-Wessling W, Wagenaar L. The effectiveness of oral nutritional supplementation in the healing of pressure ulcers. *J Wound Care*, 2004; 13: 319–322.
237. Fox AT, Alderdice F, Atherton DJ. Are children with recessive dystrophic epidermolysis bullosa of low birthweight? *Ped Dermatol*, 2003; 20:303–306.
238. Lechner-Gruskay D, Honig PJ, Pereira G, McKinney S. Nutritional and metabolic profile of children with epidermolysis bullosa. *Pediatr Dermatol*, 1988; 5: 22–27.
239. Fine JD, Tamura T, Johnson L. Blood vitamin and trace metal levels in epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*, 1989; 125: 374–379.

240. Lachaux A, Bouvier R, Loras-Duclaux I, Chappuis JP, Meneguzzi G, Ortonne JP. Isolated deficient alpha6 beta4 integrin expression in the gut associated with intractable diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1999; 29: 395–401.
241. Fewtrell MS, Allgrove J, Gordon I. Bone mineralization in children with epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*, 2006; 154: 959–962.
242. Malone AM. Supplemental zinc in wound healing: is it beneficial? *Nutr Clin Pract*, 2000; 15: 253–256.
243. Melville C, Atherton D, Burch M, Cohn A, Sullivan I. Fatal cardiomyopathy in dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*, 1996; 135: 603 – 606.
244. Sidwell RU, Yates R, Atherton D. Dilated cardiomyopathy in dystrophic epidermolysis bullosa. *Arch Dis Child*, 2000; 83: 59–63.
245. Haynes L, Atherton DJ, Clayden G. Constipation in epidermolysis bullosa: successful treatment with a liquid-fiber-containing formula. *Pediatrics*, 1997; 99: 393–396.
246. Bajaj BG, Lei P, Andreadis ST. Efficient gene transfer to human epidermal keratinocytes on fibronectin: in vitro evidence for transduction of epidermal stem cells. *Mol Ther*, 2005; 11: 969-979.

247. Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Integration of retroviruses: a fine balance between efficiency and danger. *PloS Med*, 2005; 2: 10.
248. Woodley DT, Krueger GG, Jorgensen CM. Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *J Invest Dermatol*, 2003; 121: 1021-1028.
249. Goto M, Sawamura D, Ito K. Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 2006; 126: 766-772.
250. Woodley DT, Remington J, Huang Y, Hou Y, Li W, Keene DR. Intravenously injected human fibroblasts home to skin wounds, deliver type VII collagen and promote wound healing. *Mol Ther* 2007; 15: 628-635.
251. Wong T, Gammon L, Mellerio J, Dopping P, Pacy J, Elia G, Jeffery R, M Leigh I, Navasaria H, McGrath J. Potential of Fibroblast Cell Therapy for recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2179-2189.
252. Wagner J, Yamamoto A, McGrath J, Hordinsky M, Keene D, Woodley D, Chen M, Riddle M, Osborn M, Lund T, Dolan M, Blazar B, Tolar J. Bone Marrow Transplantation for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *N Engl J Med*, 2010; 363: 629-39.