

UNIVERSITAT DE BARCELONA
DIVISIÓ DE CIÈNCIES DE LA SALUT
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

**ESTUDIO *IN VIVO* DEL PAPEL DE LA
VALENCIA DE LOS AUTOANTICUERPOS DEL
PÉNFIGO VULGAR EN LA PATOGENIA DE LA
ENFERMEDAD**

Tesis presentada por José-Manuel Mascaró Galy para optar al
grado de Doctor en Medicina.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700679832





FIGURA 12. Los fragmentos $F(ab')_2$ de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos cuando son inyectados en ratones recién nacidos de tipo BALB/c. Veinticuatro horas después de la primera inyección subcutánea de $F(ab')_2$ se puede observar un despegamiento de la epidermis tras pellizcar la piel del dorso de los ratones inyectados (signo de Nikolsky).

Al igual que en los ratones inyectados con IgG, el examen histológico demostró que las ampollas se producían dentro de la epidermis justo por encima de la capa de queratinocitos basales (**FIGURA 13**).



FIGURA 13. Al realizar el examen histológico de la piel lesional de un ratón recién nacido de tipo BALB/c veinticuatro horas después de la primera inyección subcutánea de $F(ab')_2$ de pénfigo vulgar se observa una ampolla intraepidérmica suprabasal.

La inmunofluorescencia directa de los ratones inyectados con $F(ab')_2$ fue negativa cuando se emplearon anticuerpos contra Fc humana o bien C3 de ratón marcados con fluoresceína mientras que se pudieron evidenciar depósitos intercelulares de fragmentos $F(ab')_2$ (**FIGURA 14**).



FIGURA 14. Al realizar la Inmunofluorescencia directa de la piel perilesional de un ratón recién nacido de tipo BALB/c veinticuatro horas después de la primera inyección subcutánea de $F(ab')_2$ de pénfigo vulgar se observan depósitos a nivel de los espacios intercelulares de la epidermis murina al utilizar anticuerpos policlonales contra la fracción $F(ab')_2$ de la IgG humana marcados con fluoresceína.

Se pudo demostrar la presencia de anticuerpos circulantes contra los espacios intercelulares en los animales inyectados por inmunofluorescencia indirecta, con títulos que oscilaron entre 1:80 y 1:320 cuando se empleó un anticuerpo policlonal de cabra anti- $F(ab')_2$ humana marcado con fluoresceína como anticuerpo secundario. Los sueros de los animales fueron siempre negativos cuando se empleó como anticuerpo secundario un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc humana marcado con fluoresceína. Todos los resultados de los animales inyectados con la fracción $F(ab')_2$ se hallan resumidos en la **TABLA 6**.

TABLA 6. Los fragmentos F(ab')₂ de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c*					
Fracción inyectada	Número de ratones		IF directa[†]		Títulos de IF indirecta[†]
	Inyectados	Enfermos	F(ab')₂	C3 de ratón	
SVS	3	0	-	-	-
Suero RL	16	16	+	-	160-320
Suero EK	5	5	+	-	80-160
Suero VDV	2	2	+	-	160

*Se inyectaron subcutáneamente los fragmentos proteolíticos F(ab')₂ de la IgG de tres sueros de pacientes con pénfigo vulgar o sueros de voluntarios sanos (SVS) a ratones recién nacidos de tipo BALB/c. Los ratones recibieron dos dosis de cada fracción y fueron examinados a las 24 horas de haberse administrado la primera inyección.

[†]La inmunofluorescencia (IF) directa e indirecta se realizó con anticuerpos de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra la fracción F(ab')₂ de la IgG humana. Ambos exámenes fueron negativos cuando se utilizaron anticuerpos de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra la fracción Fc.

3.1.3. Los fragmentos Fab de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c

Todos los ratones inyectados con fragmentos Fab de los tres pacientes con pénfigo vulgar también desarrollaron lesiones ampollosas cutáneas, al igual que lo habían hecho aquellos a los que se habían inyectado las fracciones IgG y F(ab')₂ de los mismos sueros. Las lesiones fueron idénticas a las que habían presentado los otros dos grupos de animales (**FIGURA 15**).

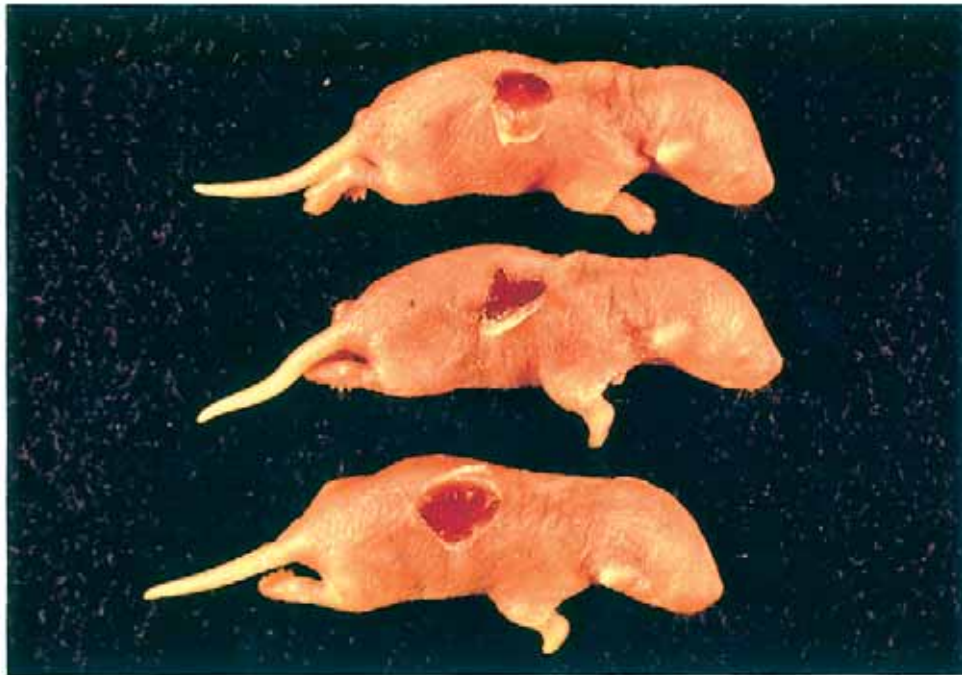


FIGURA 15. Los fragmentos Fab de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos cuando son inyectados en ratones recién nacidos de tipo BALB/c. Veinticuatro horas después de la primera inyección subcutánea de Fab se observa una clara positividad del signo de Nikolsky en el dorso de los ratones recién nacidos inyectados.

Los hallazgos histológicos fueron idénticos a los de los ratones que se habían inyectado con IgG y $F(ab')_2$ de los mismos pacientes, observándose ampollas intraepidérmicas suprabasales típicas de pénfigo vulgar (**FIGURA 16**).

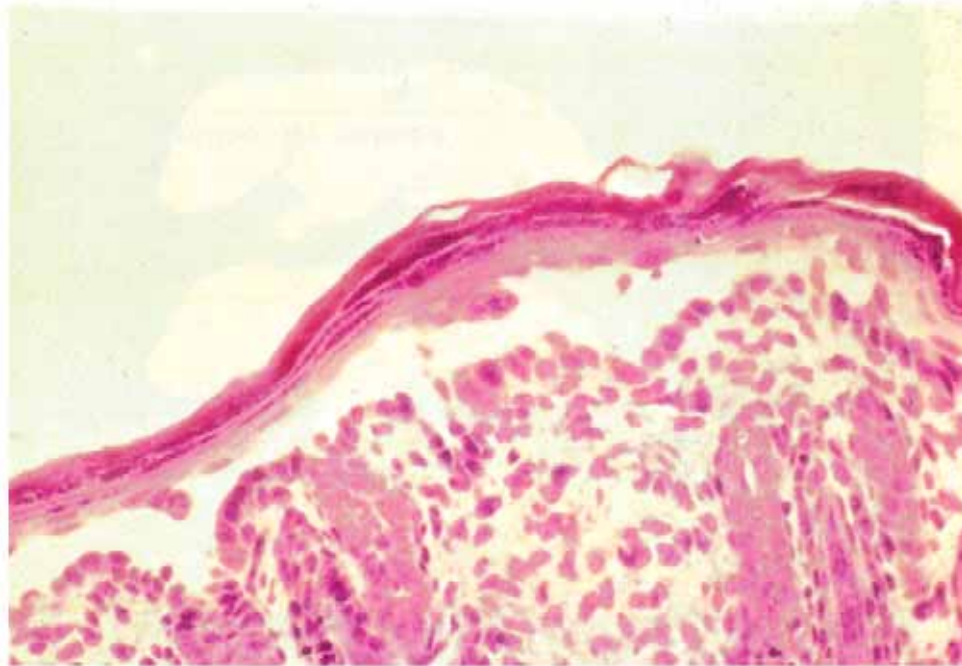


FIGURA 16. Al realizar el examen histológico con microscopía óptica se observan ampollas intraepidérmicas suprabasales características a nivel de la piel de ratones recién nacidos de tipo BALB/c inyectados con fragmentos Fab de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar.

Al realizarse la inmunofluorescencia directa de la piel perilesional de los ratones no pudieron detectarse depósitos de Fc humana o C3 de ratón, pero sí que se observó la presencia de depósitos de fragmentos Fab a nivel de los espacios intercelulares de la epidermis (**FIGURA 17**).

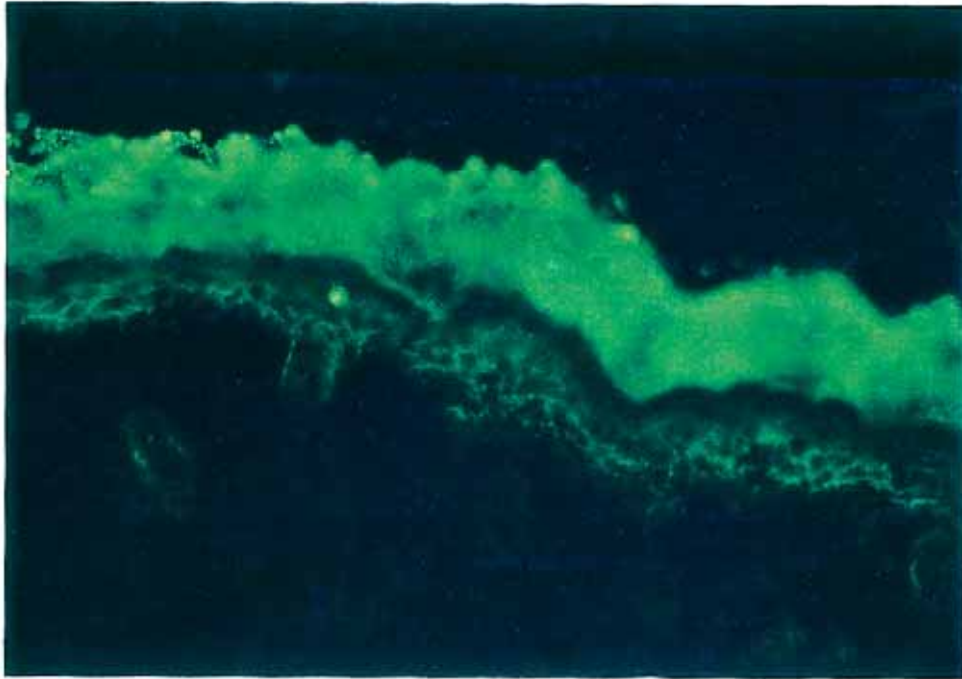


FIGURA 17. Los fragmentos Fab de las inmunoglobulinas inyectados fueron detectados por inmunofluorescencia directa a nivel de los espacios intercelulares de la epidermis de todos los animales inyectados, mientras que no fue posible detectar fragmentos Fc (correspondientes a IgG intacta) ni depósitos de C3 murino.

A diferencia de lo que se observó en el caso de los animales inyectados con IgG y F(ab')₂ los títulos de anticuerpos circulantes en los animales inyectados con los fragmentos Fab fueron mucho más bajos, oscilando entre menos de 1:20 (inmunofluorescencia indirecta negativa a dilución 1:20) y 1:80. Todos los resultados de los animales inyectados con la fracción Fab se hallan resumidos en la **TABLA 7**.

TABLA 7. Los fragmentos Fab de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c*

Fracción inyectada	Número de ratones		IF directa [†]		Títulos de IF indirecta [†]
	Inyectados	Enfermos	Fab	C3 de ratón	
SVS	6	0	-	-	-
Suero RL	23	23	+	-	<20-80
Suero EK	9	9	+	-	40-80
Suero VDV	4	4	+	-	40-80

*Se inyectaron subcutáneamente los fragmentos proteolíticos Fab de la IgG de tres sueros de pacientes con pénfigo vulgar o sueros de voluntarios sanos (SVS) a ratones recién nacidos de tipo BALB/c. Los ratones recibieron dos dosis de cada fracción y fueron examinados a las 24 horas de haberse administrado la primera inyección.

[†]La inmunofluorescencia (IF) directa e indirecta se realizó con anticuerpos de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra la fracción F(ab')₂ de la IgG humana que detecta tanto los fragmentos F(ab')₂ como los Fab. Ambos exámenes fueron negativos cuando se utilizaron anticuerpos de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra la fracción Fc.

3.1.4. Los ratones inyectados con las distintas fracciones de sueros de pacientes con pénfigo vulgar con anticuerpos contra la desmogleína 1 no difieren respecto a los que han sido inyectados con sueros que no presentan dichos anticuerpos

En todos los experimentos que se han descrito en las 3 secciones anteriores se emplearon los sueros de tres pacientes con pénfigo vulgar. Todos ellos presentaban anticuerpos contra la desmogleína 3, pero uno de ellos (paciente VDV) tenía además anticuerpos dirigidos contra la desmogleína 1, el antígeno del pénfigo foliáceo, tal como sucede en casi la mitad de los pacientes con pénfigo vulgar. Aunque se desconoce cual es el significado de estos anticuerpos y su papel en la patogenia de la enfermedad, en el

presente estudio no pudimos objetivar diferencias en la enfermedad que producían las distintas fracciones de anticuerpos (IgG, F(ab')₂ y Fab) de estos pacientes en los animales de experimentación.

3.2. Estudio del curso evolutivo de la enfermedad producida en ratones inyectados con fragmentos Fab de pénfigo vulgar

3.2.1. Al cabo de tan sólo dos horas de inyectarse los anticuerpos los ratones inyectados con fragmentos Fab de pénfigo vulgar ya presentan lesiones microscópicas

En este grupo de experimentos se estudió primero el curso evolutivo de la enfermedad que aparece en los ratones tras la transferencia pasiva de Fab. Para ello se empleó una fracción Fab obtenida del suero de la paciente VDV (concentración, 11.5 mg/ml; título, 1:5120). Se inyectó por vía subcutánea una dosis única de 20 nmol de Fab a cuatro grupos de animales con 3 ratones en cada grupo. Los diferentes grupos fueron entonces examinados a las 2, 3, 4 y 5 horas tras la inyección de anticuerpos.

Se observó así que los primeros signos enfermedad aparecían tan sólo 2 horas después de la inyección subcutánea de la fracción Fab a los ratones. Estos animales no presentaban signos de enfermedad clínica pero sí que se observaron ampollas suprabasales al realizar el examen con microscopía óptica. Los primeros signos clínicos que se pudieron observar aparecieron al cabo de 3 horas y consistieron en erosiones mínimas. Las lesiones clínicas se hicieron más evidentes al cabo de 4-5 horas de la inyección de Fab. La inmunofluorescencia directa mostró depósitos de Fab en los espacios intercelulares de todos los animales inyectados. Los hallazgos de este grupo de inyecciones se hallan resumidos en la **TABLA 8**.

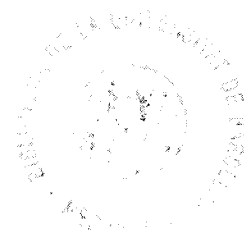


TABLA 8. Estudio del curso evolutivo de la enfermedad producida en ratones inyectados con fragmentos Fab de pénfigo vulgar*

Tiempo (horas)	Número de ratones (3 por grupo)		
	Signos clínicos	Signos histológicos	IF directa positiva
2	0	2	3
3	2	2	3
4	3	3	3
5	3	3	3

*Se inyectaron grupos de 3 ratones recién nacidos de tipo BALB/c con una sola dosis subcutánea de 20 nmol de una fracción Fab preparada a partir del suero de la paciente VDV. Los animales fueron entonces examinados en diferentes momentos tras la inyección.

3.2.2. El curso evolutivo de la enfermedad producida en ratones inyectados con fragmentos Fab de pénfigo vulgar es similar al de los ratones inyectados con la fracción IgG del mismo suero

En un segundo grupo de experimentos se comparó el curso evolutivo de la enfermedad que aparece en los ratones tras transferencia pasiva de anticuerpos de tipo IgG o Fab. Para ello se emplearon fracciones IgG y Fab obtenidas a partir del suero del paciente RL. La concentración de la fracción IgG era de 73 mg/ml y el título 1:2560, mientras que la fracción Fab tenía

una concentración de 11 mg/ml y un título de 1:2560. En estos experimentos se inyectó simultáneamente a dos grupos de ratones (con 3 ratones en cada grupo) con una sola dosis de 24 nmol de IgG ó Fab para cada tiempo. Se examinaron así diferentes grupos de animales a las 1,2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 y 24 horas de haberse inyectado los anticuerpos.

Los hallazgos fueron muy similares con ambas fracciones. Así, por inmunofluorescencia directa se pudieron detectar anticuerpos (IgG ó Fab) unidos a los espacios intercelulares de la epidermis murina tan sólo 1 hora después de la inyección de estas fracciones. Sin embargo, los primeros signos histológicos de enfermedad (ampollas suprabasales microscópicas) no aparecieron hasta pasadas 2 horas de la inyección subcutánea de anticuerpos. Los primeros signos clínicos, manifestados en forma de erosiones mínimas, se pudieron apreciar al cabo de 3 horas. A las 6 horas de la inyección las lesiones clínicas eran ya evidentes, con la presencia de un claro signo de Nikolsky. El examen clínico, así como el examen histológico y la inmunofluorescencia directa de los animales sacrificados entre las 12 y las 24 horas de la inyección fue similar al de los animales examinados a las 6 horas. Todos estos datos se hallan resumidos en la **TABLA 9.**

TABLA 9. Estudio comparativo del curso evolutivo de la enfermedad producida en ratones inyectados con IgG y fragmentos Fab de pénfigo vulgar*

Tiempo (horas)	IgG			Fab		
	Número de ratones (3 por grupo)			Número de ratones (3 por grupo)		
	Signos clínicos	Signos histológicos	IF directa positiva	Signos clínicos	Signos histológicos	IF directa positiva
1	0	0	2	0	0	3
2	0	2	3	0	2	3
3	3	3	3	2	2	3
4	3	3	3	3	3	3
5	3	3	3	3	3	3
6	3	3	3	3	3	3
12	3	3	3	3	3	3
18	3	3	3	3	3	3
24	3	3	3	3	3	3

*Se inyectaron grupos de 3 ratones recién nacidos de tipo BALB/c con una sola dosis subcutánea de 24 nmol de las fracciones IgG o Fab preparadas a partir del suero del paciente RL. Los animales fueron entonces examinados en diferentes momentos tras la inyección.

Resultados

En este grupo de experimentos se quiso además estudiar la observación realizada en el grupo anterior de experimentos (sección 3.1.3. de "Resultados") de que los títulos de autoanticuerpos circulantes en los ratones son más bajos tras la inyección de fracciones Fab que de IgG. Se practicó para ello la determinación de los títulos de autoanticuerpos por inmunofluorescencia indirecta de todos los grupos de animales inyectados. Para esta determinación se realizó el examen de inmunofluorescencia indirecta utilizando como anticuerpo secundario anticuerpos de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra el fragmento $F(ab')_2$ de la IgG humana, que es capaz de unirse tanto a la IgG intacta como a los fragmentos Fab. Como se puede observar en la **FIGURA 18**, el título de autoanticuerpos fue mucho más bajo en los ratones inyectados con Fab a pesar de que ambos grupos recibieron dosis equimolares de anticuerpos.

**Título de autoanticuerpos
(Inmunofluorescencia indirecta)**

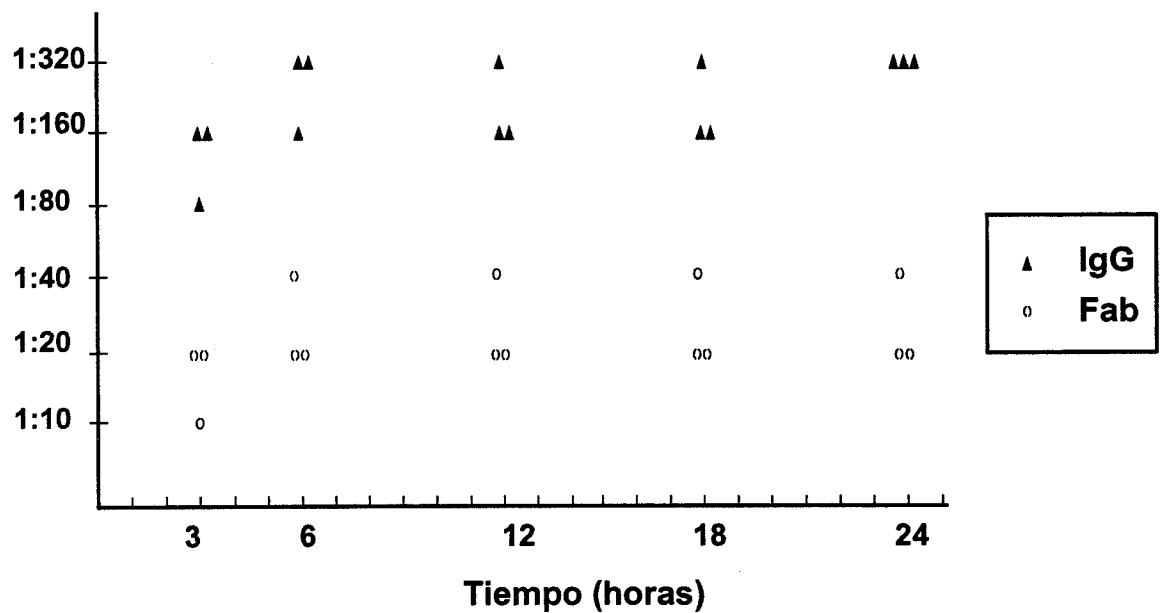


FIGURA 18. Se determinó por inmunofluorescencia indirecta los títulos de autoanticuerpos de grupos de ratones recién nacidos (n=3) inyectados con dosis equimolares de Fab e IgG de pénfigo vulgar que fueron sacrificados en diferentes momentos. Como se demuestra en la figura, los títulos de autoanticuerpos fueron más bajos en los ratones inyectados con fragmentos Fab que en los ratones inyectados con IgG.

3.3. Diferentes dosis equimolares de las fracciones IgG y Fab de pénfigo vulgar no difieren en cuanto a su patogenicidad en el ratón.

En este grupo de experimentos se compararon diferentes cantidades de IgG con dosis equimolares de fragmentos Fab obtenidos del mismo suero de un paciente con pénfigo vulgar respecto a su potencia a la hora de causar enfermedad en ratones recién nacidos. Se utilizaron aquí las mismas fracciones empleadas en el estudio anterior y los ratones fueron examinados al cabo de 6 horas dado que en el estudio anterior se había confirmado que los signos clínicos se manifiestan completamente a partir de las 6 horas de inyección.

Con ambas fracciones la dosis más baja que fue capaz de inducir ampollas microscópicas correspondió a 6 nmol por ratón (0.9 mg y 0.3 mg de IgG y Fab respectivamente). La intensidad de la enfermedad ampollosa que desarrollaron los ratones así como el número de animales enfermos aumentó a medida que se aumentaba la dosis de IgG y Fab. Se observó que la inmunofluorescencia directa fue positiva en todos los animales inyectados. Incluso aquellos animales que habían sido inyectados con dosis de 3 y 1.5 nmol, que no fueron capaces de causar lesiones clínicas o histológicas, tenían depósitos de autoanticuerpos a nivel de los espacios intercelulares de la epidermis de la piel perilesional. Todos estos datos se hallan resumidos en la **TABLA 10**.

TABLA 10. Comparación de la patogenicidad de dosis equimolares de IgG y Fab de un suero de pénfigo vulgar*						
Dosis (nmol por ratón)[†]	IgG			Fab		
	Número de ratones (4 por grupo)			Número de ratones (4 por grupo)		
	Signos clínicos	Signos histológicos	IF directa positiva	Signos clínicos	Signos histológicos	IF directa positiva
24	4	4	4	4	4	4
12	2	3	4	2	2	4
6	2	2	4	1	1	4
3	0	0	4	0	0	4
1.5	0	0	4	0	0	4

*Se inyectaron por vía subcutánea grupos de 4 ratones recién nacidos de tipo BALB/c con diferentes dosis equimolares de IgG y Fab del paciente RL. Los animales recibieron una dosis única y fueron examinados a las 6 horas de la inyección.

[†]1nmol equivale a 0.15 mg de IgG, y a 0.05 mg de Fab.

3.4. Las inyecciones subcutáneas de Fab de pénfigo vulgar son más eficaces que las intraperitoneales a la hora de causar enfermedad en los animales de experimentación.

En este experimento se comparó la eficacia de dos vías de administración (intraperitoneal vs subcutánea) de la Fab de un suero de pénfigo vulgar (RL). Se inyectaron tres ratones con dos dosis intraperitoneales de 100 μ l de la fracción Fab mientras que un segundo grupo de ratones recibió dos dosis subcutáneas de 50 μ l de la misma fracción. Los ratones inyectados por vía intraperitoneal no mostraban signos clínicos de enfermedad a las 24 horas de la primera inyección, a pesar de que todos tenían ampollas suprabasales al realizarse el examen histológico de la piel. Por el contrario, todos los ratones inyectados vía subcutánea fueron positivos tanto clínica como histológicamente. En todos los ratones la inmunofluorescencia indirecta fue negativa a dilución de 1:20 mientras que la directa demostró la presencia de fragmentos Fab en los espacios intercelulares de la epidermis de todos los animales.

DISCUSIÓN

El pénfigo vulgar es una enfermedad ampollosa que fue descrita por primera vez por Ferdinand von Hebra en 1860. Se trata de la forma más frecuente de pénfigo en los países desarrollados. En esta enfermedad crónica de la piel se producen ampollas dentro de la epidermis debido a una pérdida de cohesión de los queratinocitos entre sí. Se trata de una patología grave, que era mortal en la mayoría de los pacientes en épocas previas a la introducción de los corticoides como arma terapéutica, y aún en nuestros días la mortalidad y morbilidad del pénfigo vulgar sigue siendo importante.

El primer hito dentro de la investigación de la patogenia de esta enfermedad fue el descubrimiento en el año 1964, por Ernst Beutner y Robert Jordon de que estos pacientes presentaban unos anticuerpos en el suero que estaban dirigidos contra los espacios intercelulares de la epidermis (Beutner y Jordon, 1964). La presencia de estos anticuerpos en el suero, así como la observación posterior de que también se podían hallar unidos *in vivo* a nivel de la piel de los pacientes hizo pensar entonces que quizás estos anticuerpos jugasen un papel en la aparición de las lesiones de estos enfermos.

A partir de aquel momento se empezaron a realizar distintos trabajos de investigación en los que se intentó demostrar el papel patogénico de estos anticuerpos. Por una parte se realizaron estudios *in vitro* utilizando cultivos celulares o fragmentos de piel en medio de cultivo. Schiltz y Michel fueron los primeros en publicar en la literatura de habla inglesa un trabajo en el que demostraban que el suero de pacientes con pénfigo era capaz de inducir acantolisis en la epidermis de fragmentos de piel humana mantenidos en medio de cultivo (Schiltz y Michel, 1976). Parece ser, sin embargo, que los investigadores italianos Bellone y Leone habían hecho observaciones similares años antes de que se descubriese la existencia de

estos anticuerpos en el suero de los pacientes, y por lo tanto deberían compartir el prestigio de los autores americanos (Bellone y Leone, 1956).

Otra línea de investigación fue la realización de estudios de patogenicidad de los anticuerpos *in vivo* utilizando animales de experimentación (Anhalt y Díaz, 1989). Los primeros estudios que se hicieron tratando de inducir lesiones cutáneas en animales mediante la transferencia pasiva de anticuerpos de pacientes fueron infructuosos. En ellos se realizó la transferencia de anticuerpos por medio de transfusiones o bien por vía subcutánea a monos u otros animales (Sams y Jordon, 1971; Holubar y cols., 1973). A pesar de que se podía observar que los anticuerpos eran capaces de fijarse a los espacios intercelulares de la epidermis de los animales de experimentación todos estos estudios obtuvieron resultados negativos en cuanto a la producción de lesiones cutáneas. Finalmente la naturaleza autoinmune del pénfigo vulgar quedó bien establecida con la demostración fehaciente de que los anticuerpos antiepidérmicos de este grupo de pacientes eran capaces de reproducir las características clínicas, histológicas e inmunopatológicas de la enfermedad humana cuando fueron administrados por vía intraperitoneal a ratones recién nacidos de tipo BALB/c (Anhalt y cols., 1982). En este último estudio el pequeño tamaño de los animales y la gran concentración a la que se administró la IgG de pacientes contribuyeron sin duda a la obtención de resultados positivos. Ambos factores permitieron que se administrase una gran cantidad de anticuerpos en relación al peso de los animales, lo cual es un factor muy importante a la hora de producir lesiones en este modelo animal (Mascaró, observación personal). Otro factor importante fue la ausencia de pelo de los ratones recién nacidos, lo que facilitaba mucho el examen clínico de estos animales respecto a otras especies.

Se ha podido observar en estudios posteriores que los autoanticuerpos de los pacientes con pénfigo vulgar se hallan dirigidos

contra la desmogleína 3, una glicoproteína epidérmica de 130-kDa. Más recientemente se ha podido demostrar que los anticuerpos dirigidos contra la desmogleína 3 son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c (Amagai y cols., 1992). Además, una forma recombinante de la región extracelular de la desmogleína 3 sintetizada utilizando el sistema del baculovirus fue capaz de absorber la mayoría de los anticuerpos patógenos del suero de pacientes con pénfigo y evitar la aparición de lesiones clínicas en estos animales (Amagai y cols., 1994b). Por otra parte los anticuerpos policlonales de un conejo inmunizado con desmogleína 3 recombinante lograron inducir ampollas intraepidérmicas cuando fueron inyectados a ratones recién nacidos (Memar y cols., 1996a). Es interesante hacer notar que sólo los conejos inmunizados con toda la molécula de desmogleína 3 recombinante produjeron anticuerpos patógenos, mientras que aquellos inmunizados solamente con el dominio extracelular produjeron anticuerpos pero estos no fueron patógenos al ser inyectados en ratones recién nacidos (Memar y cols., 1996b). En conclusión, todos estos estudios sugieren que los autoanticuerpos del suero de los pacientes con pénfigo vulgar son los responsables de iniciar y producir las lesiones cutáneas de los enfermos y que se hallan dirigidos principalmente contra la región extracelular de la desmogleína 3.

Como se puede ver, la mayoría de los estudios recientes han estudiado el mecanismo fisiopatológico por el que aparecen las ampollas en el pénfigo vulgar desde el punto de vista del antígeno. Sin embargo, en el presente estudio que ha sido el objeto de esta Tesis Doctoral se investigaron los mecanismos por los cuales los autoanticuerpos de pénfigo vulgar daban lugar a enfermedad en animales de experimentación al unirse a su antígeno epidérmico, de manera a poder entender los mecanismos que dan lugar a la formación de ampollas intraepidérmicas. En particular, se miró si la valencia de los autoanticuerpos tenía importancia a la hora de producir

la acantolisis en la epidermis de ratones recién nacidos de tipo BALB/c a los que administró la IgG o sus fragmentos $F(ab')_2$ y Fab de sueros de pénfigo vulgar mediante experimentos de transferencia pasiva.

En este estudio se demuestra claramente que las inyecciones subcutáneas de IgG o sus fragmentos $F(ab')_2$ y Fab de sueros de pénfigo vulgar produce la aparición de vesículas epidérmicas. Además, la enfermedad producida tras la inyección de las fracciones IgG y Fab mostró un curso cronológico y una relación dosis-respuesta similar en estos animales. A pesar de que se desconoce por el momento el significado patógeno de la población de anticuerpos dirigidos contra la desmogleína 1 en el pénfigo vulgar hemos utilizado aquí el suero de dos pacientes que sólo presentaban anticuerpos contra la desmogleína 3 (RL y EK), así como el suero de otra paciente que además presentaba anticuerpos contra la desmogleína 1 (VDV). Los resultados obtenidos con todos los sueros parecen ser similares por lo que probablemente estos resultados puedan ser aplicables a ambos grupos de pacientes independientemente de la presencia o no de anticuerpos contra la desmogleína 1.

El papel de la valencia de los autoanticuerpos en la patogenia del pénfigo vulgar y del pénfigo foliáceo ya había sido estudiado en el pasado (Anhalt y cols., 1986a; Rock y cols., 1990). Se había demostrado así que los fragmentos Fab' de la IgG obtenida del suero de un paciente con pénfigo foliáceo endémico eran patógenos cuando fueron inyectados por vía subcutánea a ratones recién nacidos. Sin embargo, esto no había podido ser demostrado cuando se inyectó por vía intraperitoneal los fragmentos $F(ab')_2$ y Fab' obtenidos del suero de un sólo paciente con pénfigo vulgar (Anhalt y cols., 1986a). Los 7 ratones inyectados con fragmentos $F(ab')_2$ en dicho estudio desarrollaron lesiones cutáneas, pero ninguno de los 5 animales a los que se inyectaron fragmentos Fab' desarrolló lesiones clínicas o microscópicas. No obstante, el examen por inmunofluorescencia

directa de la piel de los ratones inyectados tanto con $F(ab')_2$ como con Fab' de pénfigo vulgar demostró la presencia de depósitos intercelulares de estos fragmentos en todas las biopsias. La inmunofluorescencia indirecta fue negativa o sólo mostró títulos muy bajos de anticuerpos en el suero de los ratones inyectados con fragmentos Fab'. Estos hallazgos fueron entonces interpretados mediante la hipótesis de que para que aparezca acantolisis en el pénfigo vulgar es necesario que los anticuerpos bivalentes produzcan un entrecruzamiento de la molécula antigénica en la superficie de los queratinocitos epidérmicos (Anhalt y Díaz, 1989).

En el estudio actual hemos encontrado que los fragmentos monovalentes Fab de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos cuando son inyectados por vía subcutánea a ratones recién nacidos. Estos resultados difieren notablemente de los hallados previamente por Anhalt y colaboradores (Anhalt y cols., 1986) que concluyeron que era necesaria la unión de un anticuerpo bivalente para que apareciese la acantolisis *in vivo*. De todos modos, esta discordancia podría explicarse porque en aquel estudio se utilizó la vía intraperitoneal para inyectar la fracción Fab de un sólo paciente con pénfigo vulgar. Además, sólo se inyectaron 5 ratones lo cual es un número ciertamente pequeño.

Las inyecciones subcutáneas de Fab de pénfigo vulgar son mucho más eficaces que las intraperitoneales a la hora de inducir enfermedad por transferencia pasiva a animales de experimentación, tal como queda demostrado por el presente estudio. Cuando se inyectan los fragmentos Fab por vía subcutánea, la enfermedad que se observa en los animales es posiblemente consecuencia de un efecto local de los anticuerpos que difunden a través de la dermis hasta los espacios intercelulares epidérmicos y pueden unirse aquí al antígeno diana. Por el contrario, cuando la fracción Fab es inyectada por vía intraperitoneal los anticuerpos patógenos deberán entrar primero en el torrente circulatorio y después penetrar en la piel para

ser capaces de inducir enfermedad.

Si se compara la vida media de los fragmentos Fab con la de la IgG y los fragmentos $F(ab')_2$, los primeros tienen una vida media mucho más corta debido a que son eliminados rápidamente por el riñón. Se ha visto que la vida media de fragmentos Fab heterólogos administrados a conejos, cobayas y ratones suele ser inferior a 12 horas (Spiegelberg y Weigle, 1965). Algunos autores han encontrado incluso que en los ratones puede ser tan sólo de 3 horas y media (Wochner y cols., 1967). Además, el volumen de distribución de la Fab es mucho mayor que el volumen plasmático, y se ha estimado que puede ser hasta 9 veces mayor que el volumen de distribución de la IgG cuando se inyectan fracciones IgG y Fab heterólogas a animales de experimentación (Smith y cols., 1979). Estas dos circunstancias (un catabolismo aumentado y un mayor volumen de distribución) pueden ayudar a explicar el hecho que la vía subcutánea sea mucho más eficaz que la intraperitoneal, así como el hallazgo del presente estudio de que los títulos de autoanticuerpos fuesen mucho más bajos cuando se administraban fragmentos Fab de pénfigo vulgar a pesar de que las dosis administradas a los ratones fuesen equimolares a las de la IgG. Estos hallazgos son también coherentes con los del estudio de Anhalt en que halló que los títulos de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta en ratones inyectados con Fab por vía intraperitoneal fueron negativos o muy bajos.

Otros hallazgo interesante del presente estudio es la demostración que las fracciones IgG y Fab de un paciente con pénfigo vulgar no difirieron en cuanto al curso evolutivo de la enfermedad producida en ratones inyectados. Así, tanto la fracción IgG como la Fab de este paciente fueron capaces de inducir ampollas microscópicas tan sólo 2 horas después de haber sido inyectadas. En ambos casos se observaron también signos clínicos evidentes de enfermedad al cabo de un periodo de 4 a 6 horas tras

la inyección subcutánea de anticuerpos. Esto también se pudo observar tras la inyección subcutánea de la Fab de otro de los tres pacientes con pénfigo vulgar incluidos en este estudio. Estos hallazgos se han podido también corroborar con la IgG de varios pacientes con pénfigo vulgar no incluidos en este estudio (Mascaró, observación personal). Así, cuando se inyecta la fracción IgG ó Fab de pacientes con pénfigo vulgar por vía subcutánea a ratones recién nacidos se observa la aparición de signos clínicos de enfermedad de forma predecible entre las 4 y las 6 horas post-inyección, aunque pueden detectarse ampollas suprabasales microscópicas tan sólo 2 horas después. La presencia de anticuerpos unidos a los espacios intercelulares de la epidermis murina se observa al cabo de tan sólo 1 hora de la inyección de anticuerpos. Estos hallazgos sobre el curso evolutivo de la enfermedad experimental son sin duda interesantes dado que hasta la fecha sólo ha habido un estudio en el que se haya estudiado el curso evolutivo en ratones tras la inyección de IgG de pénfigo vulgar (Takahashi y cols., 1985). En aquel estudio los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal y por inmunofluorescencia directa se detectaron indicios de unión de IgG humana a los espacios intercelulares tan sólo 1 hora después de la inyección, siendo máxima a las 6 horas. El examen ultraestructural con microscopía electrónica mostró una pérdida de cohesión entre los queratinocitos tan sólo 1 hora después de la inyección, y al cabo de 6 horas los espacios intercelulares se habían separado a nivel de los desmosomas. A pesar de todo, las lesiones cutáneas y la positividad del signo de Nikolsky no aparecían hasta transcurridas 18 h tras la inyección de anticuerpos de pénfigo vulgar. Este estudio no daba información, sin embargo, acerca de los hallazgos histológicos con microscopía óptica. Estos resultados y los que hemos observado en este estudio no pueden compararse dado que la vía de inyección es diferente y esto modifica completamente la cronología. En los estudios más recientes en los que se ha utilizado este modelo animal

experimental del pénfigo vulgar se ha utilizado casi siempre la vía subcutánea. No obstante no se ha valorado la cronología, ni se ha estudiado el curso evolutivo de la enfermedad, y en la mayoría de ellos los ratones son examinados y sacrificados al cabo de 18 a 24 horas tras la inyección (Amagai y cols., 1992 y 1994b; Memar y cols., 1996a y 1996b).

En resumen, los hallazgos de este estudio demuestran que los anticuerpos monovalentes de pénfigo vulgar son capaces de inducir ampollas intraepidérmicas en animales de experimentación. Por lo tanto, no debe de ser necesario que los anticuerpos patógenos en el pénfigo vulgar den lugar a un entrecruzamiento (*cross-linking*) de los antígenos diana en la superficie de los queratinocitos para inducir acantolisis. Además, apoyan la hipótesis, ya sugerida en el caso del pénfigo foliáceo, de que la acantolisis es desencadenada por la unión simple de la molécula de anticuerpo (y más concretamente su fracción Fab) a algún(os) epítomos importantes de la región extracelular de la desmogleína. Dicha unión podría producir la activación de señales de transducción intracelulares que a su vez provocarían una pérdida de la función adhesiva de la desmogleína, una activación de las proteasas, o ambas a la vez. En este estudio se ha demostrado por primera vez que los anticuerpos patógenos del pénfigo vulgar son capaces de inducir acantolisis *in vivo* de forma independiente a la valencia de la molécula de anticuerpo.

CONCLUSIONES

Los diferentes estudios que se han realizado en la presente Tesis Doctoral han permitido alcanzar las siguientes conclusiones respecto a los objetivos que se habían fijado inicialmente y que se detallan a continuación:

- **Los fragmentos $F(ab')_2$ de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en animales de experimentación. El hecho que estos fragmentos, desprovistos de fracción Fc y por tanto incapaces de activar el sistema del complemento, sean capaces de inducir la enfermedad en animales va en contra de un papel prominente del complemento en la patogenia de esta enfermedad.**
- **Los fragmentos monovalentes Fab de la IgG de pacientes con pénfigo vulgar son patógenos en animales de experimentación. Esto permite afirmar que la simple unión de los anticuerpos al antígeno diana en la superficie celular es capaz de desencadenar la acantolisis y permite descartar las hipótesis que sugerían que era necesario un entrecruzamiento (*cross-linking*) del antígeno para desencadenar la enfermedad. Este hecho permite en cierto modo apoyar la hipótesis patogénica que sugiere que las lesiones son debidas a una pérdida de la adhesividad de la desmogleína 3 inducida por la unión de los autoanticuerpos.**

- Los ratones inyectados con fragmentos Fab de la IgG de pénfigo vulgar presentaron lesiones microscópicas al cabo de tan sólo dos horas de inyectarse los anticuerpos. Las lesiones clínicas se evidenciaron al cabo de 4 a 6 horas de haber inyectado los anticuerpos.
- El curso evolutivo de la enfermedad producida en ratones inyectados con fragmentos Fab de pénfigo vulgar fue similar al de los ratones inyectados con la fracción IgG del mismo suero. En ambos casos se observaron depósitos intercelulares de anticuerpos al cabo de 1 hora, aparición de ampollas microscópicas al cabo de 2 horas y lesiones clínicas tras 4 a 6 horas de haber inyectado los anticuerpos. Esto sugiere que el mecanismo patogénico de ambas fracciones es similar. También sugiere que lo que sucede entre la unión de los anticuerpos y la aparición de acantolisis se produce en un periodo breve de tiempo.
- Cuando se administran dosis equimolares de las fracciones IgG y Fab de pénfigo vulgar de un mismo paciente no se observa que estas difieran en cuanto a su poder patógeno en animales de experimentación. Ello también sugiere que el mecanismo patogénico de ambas fracciones es similar.

Además, durante la realización de esta Tesis Doctoral se realizaron otras observaciones que han permitido llegar a conclusiones adicionales que no habían sido planteadas inicialmente en los objetivos y que se detallan a continuación:

- **Los títulos de autoanticuerpos circulantes que se detectan por inmunofluorescencia indirecta tras haber inyectado la fracción Fab de pénfigo vulgar a ratones recién nacidos son notablemente más bajos que los que se detectan en ratones a los que se han inyectado dosis equimolares de la fracción IgG del mismo paciente. Esto podría ser debido a una metabolización más rápida y un mayor volumen de distribución de la Fab respecto a la IgG.**
- **Las inyecciones subcutáneas de Fab de pénfigo vulgar son más eficaces que las intraperitoneales a la hora de causar enfermedad en animales de experimentación. Este resultado y el anterior permiten explicar en parte porque los estudios que se habían realizado previamente habían sido negativos.**
- **No existieron diferencias objetivables en la enfermedad que presentaron los animales inyectados con las distintas fracciones de sueros de pacientes con pénfigo vulgar con anticuerpos contra la desmogleína 1 respecto a los que fueron inyectados con sueros que no presentaban anticuerpos contra dicha proteína. A pesar de que se desconoce cuál es el papel de los anticuerpos contra la desmogleína 1 en el pénfigo vulgar, este resultado sugiere que no tienen un papel primordial en el desarrollo de las lesiones.**

BIBLIOGRAFÍA

- Aberle H, Butz S, Stappert J, y cols. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 1994;107:3655-3663.
- Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: Protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996;61:514-523.
- Ahmed RA, Kurgis BS, Rogers III RS. Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24:987-1000.
- Allen EM, Giudice GJ, Diaz LA . Subclass reactivity of pemphigus foliaceus autoantibodies with recombinant human desmoglein. *J Invest Dermatol* 1993; 100:685-691.
- Allen E, Yu Q, Fuchs E. Mice expressing a mutant desmosomal cadherin exhibit abnormalities in desmosomes, proliferation, and epidermal differentiation. *J Cell Biol* 1996;133:1367-1382.
- Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991; 67:869-877.
- Amagai M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against the amino terminal cadherin like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* 1992; 90:919-926.
- Amagai M, Karpati S, Klaus-Kovtun V, y cols. Extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) mediates weak homophilic adhesion. *J Invest Dermatol* 1994a;102:402-408.
- Amagai M, Hashimoto M, Shimizu N, Nishikawa T. Absorption of pathogenic autoantibodies by the extracellular domain of pemphigus vulgaris antigen (Dsg3) produced by baculovirus. *J Clin Invest* 1994b; 94:59-67.
- Amagai M, Fujimori T, Masunaga T, y cols. Delayed assembly of desmosomes in keratinocytes with disrupted classic cadherin-mediated cell adhesion by a dominant negative mutant. *J Invest Dermatol* 1995a;104:27-32.

Amagai M, Hashimoto T, Green KJ, Shimizu S, Nishikawa T. Antigen-specific immunoabsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 1995b; 104:895-901.

Amagai M. Pemphigus: Autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv Dermatol* 1996;11: 319-352.

Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T, Stanley JR. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* 1996;106:351-355.

Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Diaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982; 306:1189-1196.

Anhalt GJ, Till GO, Diaz LA, Labib RS, Patel HP, Eaglstein NF. Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice. *J Immunol* 1986a; 137:2835-2840.

Anhalt GJ, Patel HP, Labib RS, Diaz LA, Proud D. Dexamethasone inhibits plasminogen activator activity in experimental pemphigus in vivo but does not block acantholysis. *J Immunol* 1986b; 136:113-117.

Anhalt GJ, Diaz LA . Animal models for bullous pemphigoid. *Clin Dermatol* 1987; 5:117-125.

Anhalt GJ y Diaz LA . In vivo studies of antibody dependent acantholysis. En: Norris DA ed. Immune mechanisms in cutaneous disease. Marcel Dekker, Inc. New York, 1989; 291-316.

Anhalt GJ, Kim SC, Stanley JR, y cols. Paraneoplastic pemphigus: an autoimmune mucocutaneous disease associated with neoplasia. *N Engl J Med* 1990; 323:1729-1735.

Arneman J, Sullivan KH, Magee AI, y cols. Stratification-related expression of isoform of desmosomal cadherins in human epidermis. *J Cell Sci* 1993;104:741-750.

Aultbrinker EA, Starr MB, Donnenfeld ED. Linear IgA disease. The ocular manifestations. *Ophthalmology* 1988; 95: 340-343.

Balding SD, Prost C, Diaz LA, y cols. Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 141-146.

Bellone AG, Leone V. Ricerche sull'influenza esercitata da sieri di soggetti sani o affetti da pemfigo su pelle umana normale e pemfigosa coltivata "in vitro". *G Ital Dermatol Sif* 1956; 97:97-109.

Bernard P, Prost C, Lecerf V, y cols. Studies of cicatricial pemphigoid autoantibodies using direct immunoelectron microscopy and immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 630-635.

Bernard P, Prost C, Durepaire N, y cols. The major cicatricial pemphigoid antigen is a 180-kDa protein that shows immunologic cross-reactivities with the bullous pemphigoid antigen. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 174-179.

Beutner EH, Jordon RE. Demonstration of skin antibodies in the sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964; 117:505-510.

Beutner EH, Prigenzi LS, Hale W, y cols. Immunofluorescent studies of autoantibodies to intercellular areas of epithelia in Brazilian pemphigus foliaceus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 127:81-86.

Borradori L, Caldwell JB, Briggaman RA, y cols. Passive transfer of autoantibodies from a patient with mutilating epidermolysis bullosa acquisita induces specific alterations in the skin of neonatal mice. *Arch Dermatol* 1995; 131:590-595.

Buxton RS, Cowin P, Franke WW, y cols. Nomenclature of desmosomal cadherins. *J Cell Biol* 1993; 121:481-483.

Calvanico NJ, Martins CR, Diaz LA. Characterization of pemphigus foliaceus antigen from human epidermis. *J Invest Dermatol* 1991; 96:815-821.

Cartaud A, Ludosky MA, Courvalin JC, Cartaud J. A protein antigenically related to nuclear lamin B mediates the association of intermediate filaments with desmosomes. *J Cell Biol* 1990;111:581-588.

Caux F, Kirtschig G, Lemarchand-Venencie F, y cols. IgA-epidermolysis bullosa acquisita in a child resulting in blindness. *Br J Dermatol* 1997; 137:270-275.

Chan LS, Fine JD, Briggaman RA, y cols. Identification and partial characterization of a novel 105-kDalton lower lamina lucida autoantigen associated with a novel immune-mediated subepidermal blistering disease. *J Invest Dermatol* 1993; 101:262-267.

- Chang SN, Kim SC, Lee IJ, Seo SJ, Hong CK, Park WH. Transition from pemphigus vulgaris to pemphigus foliaceus. *Br J Dermatol* 1997; 137:303-305.
- Chen M, Chan LS, Cai X, O'Toole EA, Sample JC, Woodley DT. Development of an ELISA for rapid detection of anti-type VII collagen autoantibodies in epidermolysis bullosa acquisita. *J Invest Dermatol* 1997; 108 :68-72.
- Chidgey MAJ, Clarke JP, Garrod DR. Expression of full-length desmosomal glycoproteins (desmocollins) is not sufficient to confer strong adhesion on transfected L929 cells. *J Invest Dermatol* 1996;106:689-695.
- Chitaley NA, Leube RE, Troyanovsky RB, y cols. The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: Patterns of bindings sites and topogenic potential. *J Cell Biol* 1996;133:359-369.
- Chorzelski TP, Jablonska S. IgA linear dermatosis of childhood (chronic bullous disease of childhood). *Br J Dermatol* 1979; 101:535-542.
- Civatte A. Diagnostic histopathologique de la dermatite polymorphe douloureuse ou maladie de Duhring-Brocq. *Ann Dermatol Syph* 1943; 3:1-30.
- Collins JE, Legan PK, Kenny TP, MacGarvie J, Holton JL, Garrod DR. Cloning and sequence analysis of desmosomal glycoproteins 2 and 3 (Desmocollins): Cadherin-like desmosomal adhesion molecules with heterogeneous cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 1991; 113:381-391.
- Cowin P, Kapprell HP, Franke WW y cols. Plakoglobin: A protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* 1986;46:1063-1073.
- Cowin P, Matthey D, Garrod DR. Identification of desmosomal surface components (desmocollins) and inhibition of desmosome formation by specific Fab'. *J Cell Sci* 1984;70:41-60.
- Darling TN, Cardenas AA, Beard JS, y cols. A child with antibodies targeting both linear IgA bullous dermatosis and bullous pemphigoid antigens. *Arch Dermatol* 1995; 131: 1438-1442.
- Determann H. *Gel Chromatography*. Springer-Verlag New York Inc, New York, 1968, 87-98.

Diaz LA, Marcelo CL. Pemphigoid and pemphigus antigens in cultured epithelial cells. *Br J Dermatol* 1978; 98:631-637.

Diaz LA, Ratrie III H, Saunders WS, Futamura S, Squiquera HL, Anhalt GJ, Giudice GJ. Isolation of a human epidermal cDNA corresponding to the 180-kDa autoantigen recognized by bullous pemphigoid and herpes gestationis sera. Immunolocalization of this protein to the hemidesmosome. *J Clin Invest* 1990 ; 86:1088-1094.

Ding X Aoki V, Mascaró Jr JM, Lopezswiderski A, Diaz LA, Fairley JA. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 1997; 109:592-596.

Dmochowski M, Hashimoto T, Amagai M, y cols. The extracellular aminoterminal domain of bovine desmoglein 1 (Dsg1) is recognized only by certain pemphigus foliaceus sera, whereas its intracellular domain is recognized by both pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus sera. *J Invest Dermatol* 1994: 103:173-177.

Domloge-Hultsch N, Gammon W, Briggaman R, y cols. Epiligrin, the major human keratinocyte integrin ligand, is a target in both an acquired autoimmune and an inherited subepidermal blistering skin disease. *J Clin Invest* 1992; 90: 1628-1633.

Domloge-Hultsch N, Anhalt G, Gammon WR, y cols. Antiepiligrin cicatricial pemphigoid. A subepithelial bullous disorder. *Arch Dermatol* 1994; 130: 1521-1529.

Drachman DB, Angus CW, Adams RN, Michelson JD, Hoffman GJ. Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N Engl J Med* 1978 ; 298:1116-1122.

Drachman DB. Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1994, 330:1797-1810.

Emery DJ, Diaz LA, Fairley JA, Lopez A, Taylor AF, Giudice GJ. Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein 1. *J Invest Dermatol* 1995; 104:323-328.

Esaki C, Seishima M, Yamada T, y cols. Pharmacologic evidence for involvement of phospholipase C in pemphigus IgG-induced inositol 1,4,5-triphosphate generation, intracellular calcium increase, and plasminogen activator secretion in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 1995;105:329-333.

Bibliografía

España A, Diaz LA, Mascaró JM, Giudice GJ, Fairley JA, Till GO, Liu Z. Mechanisms of acantholysis in pemphigus foliaceus. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85:83-89.

Eyre RW, Stanley JR. Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. *J Exp Med* 1987; 165:1719-1724.

Eyre RW, Stanley JR. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *J Clin Invest* 1988a; 81:807-812.

Eyre RW, Stanley JR. Maternal pemphigus foliaceus with cell surface antibody bound in neonatal epidermis. *Arch Dermatol* 1988b;124:25-26.

Fairley JA, Scott GA, Jensen KD, Goldsmith LA, Diaz LA. Characterization of keratocalmin, a calmodulin-binding protein of human epidermis. *J Clin Invest* 1991; 88:315-322.

Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia *J Cell Biol* 1963;17:375-412.

Foedinger D, Anhalt GJ, Boescoer B, Elbe A, Wolff K, Rappersberger K. Autoantibodies to desmoplakin I and II in patients with erythema multiforme. *J Exp Med* 1995; 181:169-179.

Foisner R, Wiche G. Intermediate filament associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1991;3:75-81.

Franke WW, Schid E, Grund C, y cols. Antibodies to high molecular weight polypeptides of desmosomes: Specific localization of a class of junctional proteins in cells and tissues. *Differentiation* 1981;20:217-241.

Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the location of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 1994; 127:1617-1626.

Gammon WR, Briggaman RA, Inman AO III, y cols. Differentiating anti-lamina lucida and anti-sublamina densa anti-BMZ antibodies by indirect immunofluorescence on 1.0 M sodium chloride-separated skin. *J Invest Dermatol* 1984; 82:139-144.

Gammon WR, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita and bullous systemic lupus erythematosus. *Dermatol Clin* 1993; 11:535-547.

Ghohestani RF, Nicolas JF, Kanitakis J, Claudy A. Linear IgA bullous dermatosis with IgA antibodies exclusively directed against the 180- or 230-kDa epidermal antigens. *J Invest Dermatol* 1997a; 108:854-858.

Ghohestani RF, Nicolas JF, Rouselle P, Claudy AL. Diagnostic value of indirect immunofluorescence on sodium chloride-split skin in differential diagnosis of subepidermal autoimmune bullous dermatoses. *Arch Dermatol* 1997b; 133:1102-1107.

Giudice, GJ, Squiquera HL, Elias PM, Diaz LA. Identification of two collagen domains within the bullous pemphigoid autoantigen, BP180. *J Clin Invest* 1991; 87:734-738.

Giudice GJ, Emery DJ, Diaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen, BP180. *J Invest Dermatol* 1992; 99:243-250.

Giudice GJ, Emery DJ, Zelickson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Diaz LA. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 1993; 151:5742-5750.

Giudice GJ, Wilske KC, Anhalt GJ, Fairley JA, Taylor AF, Emery DJ, Hoffman RG, Diaz LA. Development of an ELISA to detect anti-BP180 autoantibodies in bullous pemphigoid and herpes gestationis. *J Invest Dermatol* 1994; 102:878-881.

Green KJ, Parry AD, Steinert PM, y cols. Isolation of cDNAs encoding desmosomal plaque proteins: Evidence that bovine desmoplakins I and II are derived from two mRNAs and a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;265:2613-2617.

Green KJ, Virata ML, Elgart GW, Stanley JR, Parry DA . Comparative structural analysis of desmoplakin, bullous pemphigoid antigen and plectin : members of a new gene family involved in organization of intermediate filaments. *Int J Biol Macromol* 1992 ; 14 :876-880.

Green KJ, Jones JC. Desmosomes and hemidesmosomes: Structure and function of molecular components. *FASEB J* 1996;10:871-881.

Gumbriner BM. Cell adhesion: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84:345-357.

Haftak M, Hansen MU, Kaiser HW, y cols. Interkeratinocyte adherens junctions: Immunocytochemical visualization of cell-cell junctional structures, distinct from desmosomes, in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1996;106:498-504.

Hashimoto K, Shafran KM, Webber PS, Lazarus GS, Singer KH. Anti-cell surface pemphigus autoantibody stimulates plasminogen activator activity of human epidermal cells. A mechanism for the loss of epidermal cohesion and blister formation. *J Exp Med* 1983; 157:259-272.

Hashimoto T, Ogawa MM, Konohana A, Nishikawa T. Detection of pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus antigen by immunoblot analysis using different antigen sources. *J Invest Dermatol* 1990; 94:327-331.

Hashimoto T, Amagai M, Watanabe K, y cols. Characterization of paraneoplastic pemphigus autoantigens by immunoblot analysis. *J Invest Dermatol* 1995; 104:829-834.

Helou J, Allbritton, Anhalt GJ. Accuracy of indirect immunofluorescence testing in the diagnosis of paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32:441-447.

Hennings H, Holbrook KA. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. *Exp Cell Res* 1983;143:127-142.

Hieda Y, Tsukita S, Tsukita S. A new high molecular mass protein showing unique localization in desmosomal plaque. *J Cell Biol* 1989;109:1511-1518.

Hirako Y, Usukura, Nishizawa Y, Owaribe K. Demonstration of the molecular shape of BP180-kDa bullous pemphigoid antigen and its potential for trimer formation. *J Biol Chem* 1996; 271 :13739-13745.

Holubar K, Chorzieski TP, Guato M, Beutner EH. Studies in immunodermatology. III. Induction of intraepithelial lesions in monkeys by intramucosal injections of pemphigus antibodies. *Int Arch Allergy* 1973; 44:631-643.

Hopkinson, SB, Riddelle KS, Jones JCR. Cytoplasmic domain of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen, a hemidesmosomal component: molecular and cell biologic characterization. *J Invest Dermatol* 1992; 99:264-270.

Horn TD, Anhalt GJ. Histologic features of paraneoplastic pemphigus. *Arch Dermatol* 1992; 128: 1091-1095.

Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assays with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol* 1997; 59:2010-2017.

Ishiko A, Hashimoto T, Shimizu H, y cols. Epidermolysis bullosa acquisita: report of a case with comparison of immunogold electron microscopy using pre- and postembedding labeling. *Br J Dermatol* 1996a; 134:147-151.

Ishiko A, Shimizu H, Masunaga T, y cols. 97-kDa linear IgA bullous dermatosis (LAD) antigen localizes to the lamina lucida of the epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 1996b; 106: 739-743.

Iwatsuki K, Takigawa M, Hashimoto T, Nishikawa T, Yamada M. Can pemphigus vulgaris become pemphigus foliaceus? *J Am Acad Dermatol* 1991; 25:797-800.

Jones DA, Hunt III SW, Prisanh PS, y cols. Immunodominant autoepitopes of type VII collagen are short, paired peptide sequences within the fibronectin type III homology region of the noncollagenous (NC1) domain. *J Invest Dermatol* 1995; 104:231-235.

Jordon RE, Beutner EH, Witebsky E, y cols. Basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid. *JAMA* 1967; 200:751-756.

Kachar B, Reese TS. Evidence for the lipidic nature of tight junction strands. *Nature* 1982;296:464-466.

Kaiser HW, Ness W, Junblut I, y cols. Adherens junctions: Demonstration in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1993;100:180-185.

Karpati S, Amagai M, Prussick R, Cehrs K, Stanley JR. Pemphigus vulgaris antigen, a desmoglein type of cadherin, is located within keratinocyte desmosomes. *J Cell Biol* 1993; 122:409-415.

Kawana S, Hashimoto T, Nishikawa T, Nishiyama S. Changes in clinical features, histologic findings, and antigen profiles with development of pemphigus foliaceus from pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 1994; 130:1534-1538.

Kelly DE. Fine structure of desmosomes, hemidesmosomes and an epidermal globular layer in developing new epidermis. *J Cell Biol* 1966; 28:51-72.

Kelly S, Wojnarowska F. The use of chemically split tissue in the detection of circulating anti-basement membrane zone antibodies in bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol* 1988; 118:31-40.

Kim SC, Kwon YD, Lee IJ, Chang SN, Lee TG. cDNA cloning of the 210-kDa paraneoplastic pemphigus antigen reveals that envoplakin is a component of the antigen complex. *J Invest Dermatol* 1997; 109:365-369.

Kirtschig G, Marinkovich P, Burgeson RE, et cols. Anti-basement membrane autoantibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the α subunit of laminin 5. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 543-548.

Kitajima Y. Adhesion molecules in the pathophysiology of bullous diseases. *Eur J Dermatol* 1996; 6:399-405.

Klatte DH, Kurpakus MA, Grelling KA, Jones JCR. Immunochemical characterization of three components of the hemidesmosome and their expression in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* 1989 ;109:3377-3390.

Koch PJ, Walsh MJ, Schmelz M, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Franke WW. Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol* 1990 ; 53:1-12.

Koch PJ, Goldschmidt MD, Walsh MJ, Zimbelmann R, Franke WW. Complete amino acid sequence of the epidermal desmoglein precursor polypeptide and identification of a second type of desmoglein gene. *Eur J Cell Biol* 1991; 55:200-208.

Koch PJ, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Troyanovsky R, Franke WW. Complexity and expression patterns of the desmosomal cadherins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:353-357.

Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, Murphy GF, Whitakermenezes D, Stanley JR. Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *J Cell Biol* 1997; 137:1091-1102.

Kouklis PD, Hutton E, Fuchs E. Making a connection: Direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J Cell Biol* 1994;127:1049-1060.

Korman NJ, Eyre RW, Klaus-Kovtum V, Stanley JR. Demonstration of an adhering-junction molecule (Plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *N Engl J Med* 1989; 321:631-635.

Kowalczyk AP, Borgwardt JE, Green KJ. Analysis of desmosomal cadherin-adhesive function and stoichiometry of desmosomal cadherin-plakoglobin complexes. *J Invest Dermatol* 1996;107:293-300.

Kowalewski C, Haftek M, Jablonska S, y cols. Ultrastructural localization of binding sites of sera from patients with linear IgA bullous dermatosis. *J Invest Dermatol* 1995; 287: 633-640.

Kapprell HP, Owaribe K, Franke WW. Identification of A basic protein of Mr 75.000 as an accessory desmosomal plaque protein in stratified and complex epithelia. *J Cell Biol* 1988;106:1679-1691.

Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Diaz LA. Molecular heterogeneity of bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol* 1986; 136:1231-1235.

Labib RS, Rock B, Martins CR, Diaz LA. Pemphigus foliaceus antigen: characterization of an immunoreactive tryptic fragment from BALB/c mouse epidermis recognized by all patients' sera and major autoantibody subclasses. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 57:317-329.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

Lapiere JC, Woodley DT, Parente MG, Iwasaki T, Wynn KC, Christiano AM, Uitto J. Epitope mapping of type VII collagen. Identification of discrete peptide sequences recognized by sera from patients with acquired epidermolysis bullosa. *J Clin Invest* 1993; 92:1831-1839.

Lazarova Z, Yee C, Darling T, Briggaman RA, Yancey KB. Passive transfer of anti-laminin 5 antibodies induces subepidermal blisters in neonatal mice. *J. Clin. Invest* 1996 ; 98:1509-1518.

Legan PK, Yue KKM, Chidgey MAJ, y cols. The bovine desmocollin family: A new gene and expression patterns reflecting epithelial cell proliferation and differentiation. *J Cell Biol* 1994;126:507-518.

Leonard JN, Hobday CM, Haffenden GP, y cols. Immunofluorescent studies in ocular cicatricial pemphigoid. *Br J Dermatol* 1988; 118: 209-217.

Lever WF. Pemphigus. *Medicine* 1953; 32:1-123.

Lewis JE, Jensen PJ, Wheelock MJ. Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium. *J Invest Dermatol* 1994;102:870-877.

Li K, Sawamura D, Giudice GJ, y cols. Genomic organization of collagenous domains and chromosomal assignment of human 180-kDa bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a novel collagen of stratified squamous epithelium. *J Biol Chem* 1991; 266:24064-24069.

Liu AY, Valenzuela R, Helm TN, y cols. Indirect immunofluorescence on rat bladder transitional epithelium: a test with high specificity for paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 1993a; 28:696-699.

Liu Z, Diaz LA, Troy JL, y cols. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. *J Clin Invest* 1993b; 92:2480-2488.

Liu Z, Giudice GJ, Swartz SJ, y cols. The role of complement in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1995; 95:1539-1544.

Liu Z, Giudice GJ, Zhou XY, y cols. Major role for neutrophils in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 1997; 100:1256-1263.

Mage MG. Preparation of Fab fragments from IgGs of different animal species. *Method Enzymol* 1980; 70:142-150.

Marinkovich MP, Taylor TB, Keene DR, y cols. LAD-1, the linear IgA bullous dermatosis autoantigen, is a novel 120-kDa anchoring filament protein synthesized by epidermal cells. *J Invest Dermatol* 1996; 106:734-738.

Mascaró Jr JM, Diaz LA. New concepts in the pathogenesis of pemphigus foliaceus. En: *Current Opinion in Dermatology*, vol.3. Dahl MV, Ed. Rapid Science Publishers, Philadelphia, 1996b; 10-15.

Mascaró Jr JM, Fairley JA, Giudice GJ, Diaz LA. Autoantibodies in pemphigus vulgaris. En: *Autoantibodies*. Shoenfeld Y, Peters JB eds. Elsevier Science Publications, Amsterdam, 1996a; 749-753.

Mascaró Jr JM, Fairley JA, Giudice GJ, Diaz LA. Autoantibodies in paraneoplastic pemphigus. En: *Autoantibodies*. Shoenfeld Y, Peters JB eds. Elsevier Science Publications, Amsterdam, 1996b; 759-761.

Mathur M, Goodwin L, Cowin P. Interactions of the cytoplasmic domain of the desmosomal cadherin Dsg1 with plakoglobin. *J Biol Chem* 1994;14075-14080.

Mechanic S, Raynor K, Hill JE, Cowin P. Desmocollins form a subset of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4476-4480.

Memar OM, Rajaraman S, Thotakura R, y cols. Recombinant Desmoglein 3 has the necessary epitopes to absorb and induce blister-causing antibodies. *J Invest Dermatol* 1996a; 106; 261-268.

Memar OM, Christensen B, Rajaraman S, y cols. Induction of blister-causing antibodies by a recombinant full-length, but not the extracellular, domain of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3). *J Immunol* 1996b; 157:3171-3177.

Mohimen A, Neumann R, Foster SC, y cols. Detection and characterization of ocular pemphigoid antigens on COLO and ScaBER tumor cell lines. *Curr Eye Res* 1993; 12: 741-752.

Morioka S, Lazarus G, Jensen P. Involvement of urokinase-type plasminogen activator in acantholysis induced by pemphigus IgG. *J Invest Dermatol* 1987; 89:474-477.

Morley SM, Lane EB. The keratinocyte cytoskeleton. En: *The keratinocyte handbook*. Leigh IM, Lane EB, Watt FM, eds. Cambridge University Press, Cambridge, 1994.

Morrison LH, Labib RS, Zone JJ, Diaz LA, Anhalt GJ. Herpes gestationis autoantibodies recognize a 180-kDa human epidermal antigen. *J Clin Invest* 1988; 81:2023-2026.

Mutasim DF, Takahashi Y, Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Diaz LA. A pool of bullous pemphigoid antigen(s) is intracellular and associated with the basal cell cytoskeleton-hemidesmosome complex. *J Invest Dermatol* 1985; 84:47-53.

Mutasim DF, Pelc NJ, Anhalt GJ. Paraneoplastic pemphigus. *Dermatol Clin* 1993a; 11:473-481.

Mutasim DF, Pelc NJ, Anhalt GJ. Cicatricial pemphigoid. *Dermatol Clin* 1993b; 11: 499-510.

Nishikawa, Y, Uematsu J, Owaribe K. HD4, a 180-kDa bullous pemphigoid antigen, is a major transmembrane glycoprotein of the hemidesmosome. *J Biochem* 1993;113:493-501.

North AJ, Chidgey MAJ, Clarke JP, y cols. Distinct desmocollin isoforms occur in the same desmosomes and show reciprocally graded distributions in bovine nasal epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7701-7705.

O'Keefe E, Briggman RA, Herman B. Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes. *J Cell Biol* 1987;105:807-817.

Olague-Alcala M, Giudice GJ, Diaz LA. Pemphigus foliaceus sera recognize an N-terminal fragment of bovine desmoglein 1. *J Invest Dermatol* 1994; 102:882-885.

Osada K, Seishima M, Kitajima Y. Pemphigus IgG activates and translocates protein kinase C from the cytosol to the particulate/cytoskeleton fractions in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1997; 108:482-487.

Ousler J, Ariss-Abdo L, Labib RS, y cols. Human autoantibodies against desmoplakins in paraneoplastic pemphigus. *J Clin Invest* 1992; 89:1775-1782.

Owaribe K, Kartenbeck J, Stumpp S, Magin TM, Krieg T, Diaz LA, Franke WW. The hemidesmosomal plaque, I: Characterization of a major constituent protein as a differentiation marker for certain forms of epithelia. *Differentiation* 1990; 45:207-220.

Pas HH, Kloosterhuis GJ, Heeres K, van der Meer JB, Jonkman MF. Bullous pemphigoid and linear IgA dermatosis sera recognize a similar 120-kDa keratinocyte collagenous glycoprotein with antigenic cross-reactivity to BP180. *J Invest Dermatol* 1997; 108:423-429.

Peers C, Johnston I, Lang B, Wray D. Cross-linking of presynaptic calcium channels: a mechanism of action for Lambert-Eaton myasthenic syndrome antibodies at the mouse neuromuscular junction. *Neurosci Lett* 1993; 153:45-48.

Person JR, Rogers RS. Bullous and cicatricial pemphigoid. Clinical, histopathologic, and immunopathologic correlation. *Mayo Clin Proc* 1977; 52:54-66.

- Power WJ, Neves RA, Rodriguez A, y cols. Increasing the diagnostic yield of conjunctival biopsy in patients with suspected ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology* 1995; 102:1158-1163.
- Rocha-Alvarez R, Friedman H, Campell IT, Souza-Aguiar L, Martins-Castro R, Diaz LA. Pregnant women with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) give birth to disease-free babies. *J Invest Dermatol* 1992; 99:78-82.
- Rock B, Martins CR, Theofilopoulos AN y cols. The pathogenic effect of IgG4 autoantibodies in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *N Engl J Med* 1989; 320: 1463-1469.
- Rock B, Labib RS, Diaz LA. Monovalent Fab' immunoglobulin fragments from endemic pemphigus foliaceus autoantibodies reproduce the human disease in neonatal BALB/c mice. *J Clin Invest* 1990; 85:296-299.
- Roh JY, Stanley JR. Plakoglobin binding by human Dsg3 (pemphigus vulgaris antigen) in keratinocytes requires the cadherin-like intracytoplasmic segment. *J Invest Dermatol* 1995;104:720-724.
- Roh JY, Stanley JR. Intracellular domain of desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) confers adhesive function on the extracellular domain of E-cadherin without binding catenins. *J Cell Biol* 1995;128:939-947.
- Roscoe JT, Diaz LA, Sampaio SAP y cols. Brazilian pemphigus foliaceus autoantibodies are pathogenic to BALB/c mice by passive transfer. *J Invest Dermatol* 1985; 85:538-541.
- Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B. Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J Cell Biol* 1996;135:215-225.
- Rusenko KW, Gammon WR, Briggaman RA. Type VII collagen is the antigen recognized by IgA anti-sub lamina densa autoantibodies. *J Invest Dermatol* 1989; 92:510.
- Sams WJ, Jordon RE. Pemphigus antibodies : their role in disease. *J Invest Dermatol* 1971; 56:474-479.
- Sarret Y, Reano A, Nicholas JF, y cols. Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid: immunoblotting detection of involved autoantigens. *Autoimmunity* 1989; 2:145-2153.

Sarret Y, Hall R, Cobo LM, y cols. Salt-split human skin substrate for the immunofluorescent screening of serum from patients with cicatricial pemphigoid and a new method of immunoprecipitation with IgA antibodies. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 952-958.

Sawamura D, Li K, Chu M-L, Uitto J. Human bullous pemphigoid antigen (BPAG1). Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. *J Biol Chem* 1991; 266:17784-17790.

Schultz JR, Michel B. Production of epidermal acantholysis in normal human skin in vitro by the IgG fraction from pemphigus serum. *J Invest Dermatol* 1976; 67:254-260.

Schwartz MA, Owaribe K, Kartenbeck J, Franke WW. Desmosomes and hemidesmosomes: Constitutive Molecular Components. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 6:461-491.

Seishima M, Esaki C, Osada K, Mori S, Hashimoto T, Kitajima Y. Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5-triphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 1995; 104:33-37.

Seishima M, Satoh S, Nojiri M, Osada K, Kitajima Y. Pemphigus IgG induces expression of urokinase plasminogen activator receptor on the cell surface of cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1997; 109:650-655.

Setterfield J, Bhogal B, Morgan P, y cols. Clinical and immunopathological correlation in cicatricial pemphigoid: a study of 36 cases. *Br J Dermatol* 1995; 132:647.

Shimizu H, Masunaga T, Ishiko A, y cols. Autoantibodies from patients with cicatricial pemphigoid target different sites in epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 370-373.

Smith EP, Taylor TB, Meyer LJ, y cols. Identification of a basement membrane zone antigen reactive with circulating IgA antibody in ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1993; 101:619-623.

Shimoyama Y, Nagafuchi A, Fujita S, y cols. Cadherin dysfunction in a human cancer line: Possible adhesiveness. *Cancer Res* 1992;52:5770-5774.

Schafer S, Koch PJ, Franke WW. Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res* 1994;211:391-399.

Seishima M, Esaki C, Osada K, y cols. Pemphigus IgG, but not bullous pemphigoid IgG, causes a transient increase in intracellular calcium and inositol 1,4,5- triphosphate in DJM-1 cells, a squamous cell carcinoma line. *J Invest Dermatol* 1995;104:33-37.

Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, y cols. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol* 1995;128:949-957.

Shornick JK, Bangert JL, Freeman RG, y cols. Herpes gestationis: clinical and histologic features of twenty-eight cases. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8:214-224.

Smith EP, Taylor TB, Meyer LJ, y cols. Identification of a basement membrane zone antigen reactive with circulating IgA antibody in ocular cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 619-623.

Smith EP, Zone JJ. Dermatitis herpetiformis and linear IgA bullous dermatosis. *Dermatol Clin* 1993; 11:511-526.

Smith TW, Lloyd BL, Spicer N, Haber E. Immunology and kinetics of distribution and elimination of sheep digoxin-specific IgG and Fab fragments in the rabbit and baboon. *Clin Exp Immunol* 1979 ; 36:384-396.

Spiegelberg HL y Weigle WO. The catabolism of homologous and heterologous 7S gamma globulin fragments. *J Exp Med* 1965 ;121:323-338.

Squiquera HL, Diaz LA, Sampaio SAP, y cols. Serologic abnormalities in patients with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem), their relatives, and normal donors from endemic and non-endemic areas of Brazil. *J Invest Dermatol* 1988; 91:189-191.

Stanley, JR, Hawley-Nelson P, Yuspa SH, Shevach EM, Katz SI. Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified epithelia. *Cell* 1981; 24:897-903.

Stanley JR, Yaar M, Hawley Nelson P, Katz SI. Pemphigus antibodies identify a cell surface glycoprotein synthesized by human and mouse keratinocytes. *J Clin Invest* 1982; 70:281-288.

Stanley JR, Woodley DT, Katz SI. Identification and partial characterization of pemphigoid antigen extracted from normal human skin. *J Invest Dermatol* 1984a; 82:108.

Stanley JR, Koulu L, Thivolet C. Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Clin Invest* 1984b;74:313-320.

Stanley JR, Koulu L, Klaus-Kovtun V, Steinberg MS. A monoclonal antibody to the desmosomal glycoprotein desmoglein I binds the same polypeptide as human autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Immunol* 1986; 136: 1227-1230.

Stanley JR, Tanaka T, Mueller S, Klaus-Kovtun V, Roop D. Isolation of cDNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies. *J Clin Invest* 1988; 82:1864-1870.

Stanley JR: Pemphigus. En: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, y cols, eds. *Dermatology in general medicine*. 4th ed. New York; McGraw-Hill 1993; 606-615.

Stanley JR. Autoantibodies against adhesion molecules and structures in blistering skin diseases. *J Exp Med* 1995; 181:1-4.

Stanworth DR, Turner MW. Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits. En: DM Weir, ed.. *Handbook of Experimental Immunology: Immunochemistry*. Black Scientific Publications, Oxford, 1973; 10.1-10.97.

Stappenbeck TS, Green KJ. The desmoplakin carboxyl terminus coaligns with and specifically disrupts intermediate filament networks when expressed in cultured cells. *J Cell Biol* 1992;116:1197-1209.

Stappenbeck TS, Bornslaeger EA, Corcoran CM, y cols. Functional analysis of desmoplakin domains: Specification of the interaction with keratin versus vimentin intermediate filament networks. *J Cell Biol* 1993;123:691-705.

Stappenbeck TS, Lamb JA, Corcoran CM, Green KJ. Phosphorylation of the desmoplakin COOH terminus negatively regulates its interaction with keratin intermediate filament networks. *J Biol Chem* 1994;269:29351-29354.

Steinberg MS, Shida H, Giudice GJ, y cols. On the molecular organization, diversity and functions of desmosomal proteins. Ciba Foundation Symposium, 1987; 125 :3-19.

Stewart MI, Woodley DT, Briggaman RA. Epidermolysis bullosa acquisita and associated symptomatic esophageal webs. *Arch Dermatol* 1991; 127: 373-377.

Takahashi Y, Patel HP, Labib RS, Diaz LA, Anhalt GJ. Experimentally induced pemphigus vulgaris in neonatal BALB/c mice: a time-course study of clinical immunologic, ultrastructural, and cytochemical changes. *J Invest Dermatol* 1985 ; 84:41-46.

Tanaka T, Korman NJ, Shimizu H y cols. Production of rabbit antibodies against carboxy-terminal epitopes encoded by bullous pemphigoid cDNA. *J Invest Dermatol* 1990; 94:617-623.

Tanaka T, Parry DA, Klaus-Kovtun V, Steinert PM, Stanley JR. Comparison of molecularly cloned bullous pemphigoid antigen to desmoplakin I confirms that they define a newly family of cell adhesion junction plaque proteins. *J Biol Chem* 1991a; 266:12555-12559.

Tanaka T, Kadowaki K, Lazarides E, Solue K. Calcium-dependent regulation of the spectrin/actin interaction of calmodulin and protein 4.1. *J Biol Chem* 1991b;266:1134-1140.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.

Toyka KV, Drachman DB, Griffin DE, Pestronk A, Winkelstein JA, Firchbeck Jr. KH, Kao I. Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med* 1977 ; 296:125-131.

Troyanovsky SM, Eshkind LG, Troyanovsky RB, y cols. Contributions of cytoplasmic domains of desmosomal cadherins to desmosome assembly and intermediate filament anchorage. *Cell* 1993;72:561-574.

Troyanovsky SM, Troyanovsky RB, Eshkind LG, y cols. Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and plaque formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10790-10794.

Tsukita S, Tsukita S. Desmocalmin: A calmodulin-binding high molecular weight protein isolated from desmosomes. *J Cell Biol* 1985;101:2070-2080.

Walker DC, Kolar KA, Hebert AA, Jordon RE. Neonatal pemphigus foliaceus. *Arch Dermatol* 1995; 131:1308-1311.

Wang Y, Amagai M, Minoshima S, Sakai K, Green KJ, Nishikawa T, Shimizu N. The human genes for desmogleins (DSG1 and DSG3) are located in a small region on chromosome 18q12. *Genomics* 1994; 20:492-495.

Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S, y cols. Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J Cell Biol* 1994;127:247-256.

Wheeler GN, Parker AE, Thomas CL, y cols. Desmosomal glycoprotein DG1, a component of intercellular junctions, is related to the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88:4796-4800.

Wheelock NJ, Jensen PJ. Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin. *J Cell Biol* 1992;117:415-425.

Whitworth JM, Thomas I, Peltz SA, y cols. Vancomycin-induced linear IgA bullous dermatosis. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34:890-891.

Willsted E, Bhogal BS, Black MM. Use of 1M NaCl split skin in the indirect immunofluorescence of the linear IgA bullous dermatoses. *J Cutan Pathol* 1990; 17: 144-148.

Witcher LL, Colins R, Puttagunta S, y cols. Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *J Biol Chem* 1996;271:10904-10909.

Wochner RD, Strober W, Waldmann TA. The role of the kidney in the catabolism of Bence-Jones proteins and immunoglobulin fragments. *J Exp Med* 1967 ; 126:207-221.

Woodley DT, Briggaman RA, O'Keefe EJ, y cols. Identification of the skin basement-membrane autoantigen in epidermolysis bullosa acquisita. *N Engl J Med* 1984; 310:1007-1013.

Wojnarowska F, Collier PM, Allen J, y cols. The localization of the target antigens and antibodies in linear IgA disease is heterogeneous, and dependent on the methods used. *Br J Dermatol* 1995; 132:750-757.

Zillikens D, Kawahara Y, Ishiko A, y cols. A novel subepidermal blistering disease with autoantibodies to a 200-kDa antigen of the basement membrane zone. *J Invest Dermatol* 1996; 106:1333-1338.

Zillikens D, Rose PA, Balding SD, Liu Z, Olague-Marchan M, Diaz LA, Giudice GJ. Tight clustering of extracellular BP180 epitopes recognized by bullous pemphigoid autoantibodies. *J Invest Dermatol* 1997a; 109:573-579.

Zillikens D, Mascaró JM, Rose PA, y cols. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating anti-BP 180 autoantibodies associated with bullous pemphigoid. *J Invest Dermatol* 1997b; 109:679-683.

Zone JJ, Taylor TB, Kandunce DP, y cols. Identification of the cutaneous basement membrane zone antigen and 1013. isolation of antibody in linear immunoglobulin A bullous dermatosis. *J Clin Invest* 1990; 85:812-820.

Zone JJ, Taylor TB, Kadunce DP, y cols. IgA antibodies in chronic bullous disease of childhood react with a 97-kDa basement membrane zone protein. *J Invest Dermatol* 1996; 106:1277-1280.

Zone JJ, Taylor TB, Meyer LJ, Metersen MJ. The 97-kDa linear IgA bullous disease antigen is a portion of the extracellular domain of the 180-kDa bullous pemphigoid antigen. *J Invest Dermatol* 1997; 108:563.