

## ESTUDIOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO

### Estudio in vivo del papel de la valencia de los anticuerpos del pénfigo vulgar en la patogenia de la enfermedad\*

**Resumen.**—El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad ampollosa autoinmune mediada por autoanticuerpos. Cuando se inyecta a ratones por vía intraperitoneal la IgG de PV y sus fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, pero no los fragmentos Fab', estos reproducen todos los hallazgos de esta enfermedad. Se ha postulado por ello que es necesario que los anticuerpos sean bivalentes y den lugar a un entrecruzamiento del antígeno para que se produzca la acantólisis.

Para probar esta hipótesis se realizaron inyecciones de IgG de PV y sus fragmentos proteolíticos F(ab')<sub>2</sub> y Fab por vía subcutánea a ratones recién nacidos. Se purificaron las fracciones IgG, F(ab')<sub>2</sub> y Fab de tres sueros de pacientes con PV y dos de voluntarios sanos. Todos los ratones inyectados con la IgG y los fragmentos proteolíticos F(ab')<sub>2</sub> y Fab provenientes del suero de los tres pacientes reprodujeron los aspectos clínicos, histológicos e inmunopatológicos de la enfermedad de una forma dosis-dependiente siguiendo un mismo curso evolutivo. Además, tanto la IgG como sus fragmentos Fab indujeron acantólisis tan sólo dos horas después de haber sido inyectadas.

Estos resultados demuestran por primera vez que los fragmentos Fab monovalentes de los anticuerpos de PV son patógenos.

**Palabras clave:** Pénfigo vulgar. Desmogleínas. Modelo animal. Fragmentos Fab. Adhesión celular.

JOSÉ-MANUEL MASCARÓ GALY  
Departamento de Dermatología. Hospital  
Clínico. Barcelona.

La realización de este trabajo fue subvencionada por las becas de ampliación de estudios número 94/5590 y 96/5421 del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, así como por un Research Fellowship de la Dermatology Foundation (Estados Unidos).

\*Resumen de la Tesis Doctoral que fue galardonada con el «Premio SmithKline Beecham, 1999».

Correspondencia:

Dr. JOSÉ-MANUEL MASCARÓ GALY. Departamento de Dermatología. Hospital Clínico. Vilarroel, 170. 08036 Barcelona.

Aceptado el 12 de mayo de 1999.

### INTRODUCCIÓN

El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad ampollosa autoinmune caracterizada por una pérdida de cohesión de los queratinocitos entre sí (acantólisis) que da lugar a la formación de ampollas intraepidérmicas en la piel. El PV es la forma más frecuente de pénfigo en nuestro medio. Se trata de una enfermedad grave, con una mortalidad superior al 90% en las épocas previas a la introducción de los corticoides sistémicos en el tratamiento. Aún en nuestros días la mortalidad y morbilidad por PV siguen siendo importantes. Estos pacientes poseen anticuerpos de tipo IgG contra los espacios intercelulares de la epidermis. Los

anticuerpos se pueden detectar unidos a la superficie de los queratinocitos acantolíticos de la epidermis lesional o bien circulantes en el suero de los pacientes mediante técnicas de inmunofluorescencia (1-3). Los estudios para caracterizar el antígeno contra el cual van dirigidos la mayoría de los anticuerpos en el PV han demostrado que se trata de una glicoproteína de 130 kD localizada a nivel de los desmosomas de la epidermis (4-6). Amagai y cols. pudieron clonar el ADN complementario de esta proteína utilizando anticuerpos purificados a partir del suero de pacientes (7). Se objetivó entonces que este antígeno presentaba similitudes importantes con las cadherinas, una familia de moléculas de adhesión celular, y particularmente

con la desmogleína 1, el antígeno del pénfigo foliáceo (8). Por dicho motivo el antígeno del PV se conoce actualmente con el nombre de desmogleína 3 (9). Se ha visto además que, aproximadamente el 50-60% de los pacientes con PV tiene anticuerpos contra la desmogleína 1 (10-13), y recientemente se ha podido entrever que ambas poblaciones de anticuerpos (anti-desmogleína 1 y anti-desmogleína 3) juegan un papel relevante en la patogenia de las lesiones cutáneas de estos pacientes (13, 14).

Los anticuerpos del PV son patógenos, tal como se ha podido demostrar mediante experimentos de transferencia pasiva. La inyección de la fracción IgG de cinco pacientes con PV a ratones recién nacidos de tipo BALB/c reprodujo todas las características típicas de la enfermedad humana en estos animales (15). En estudios posteriores se investigó el papel de la valencia de los anticuerpos de PV en la acantólisis. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y Fab' de la IgG de un paciente con PV fueron inyectados por vía intraperitoneal a ratones recién nacidos (16). Mientras que todos los animales que habían sido inyectados con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> desarrollaron lesiones cutáneas, ninguno de los ratones que se inyectaron con fragmentos Fab' presentó lesiones, a pesar de que la inmunofluorescencia directa mostró que estos fragmentos se unían a los espacios intercelulares de la epidermis de estos animales. Se concluyó entonces que los fragmentos Fab' de la IgG de PV no eran capaces de inducir acantólisis a pesar de que mantenían su capacidad para unirse a la epidermis. Esto hizo que se postulase que el entrecruzamiento (*cross-linking*) del antígeno del PV era un paso importante en el desarrollo de la acantólisis (17). Además, este mecanismo de acantólisis sería específico del PV dado que en el pénfigo foliáceo se ha observado que tanto los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> como Fab' son patógenos cuando se inyectan por vía subcutánea a ratones recién nacidos (18, 19).

En el presente estudio se ha examinado la hipótesis de que es necesario que los anticuerpos del PV provoquen un entrecruzamiento del antígeno para que se produzca la acantólisis. Para ello se inyectaron ratones recién nacidos por vía subcutánea con los fragmentos Fab obtenidos del suero de tres pacientes con PV. Todos los ratones inyectados con la IgG y los fragmentos proteolíticos F(ab')<sub>2</sub> y Fab provenientes del suero de estos tres pacientes reprodujeron los aspectos clínicos, histológicos e inmunopatológicos de la enfermedad de una forma dosis-dependiente siguiendo un mismo curso evolutivo. Además, tanto la IgG como sus fragmentos Fab indujeron acantólisis al cabo de dos horas de haber sido inyectadas. Este estudio demuestra así por primera vez que en el PV, tal como

también ocurre en el pénfigo foliáceo, no es necesario un entrecruzamiento del antígeno diana para que se produzca la acantólisis en ratones recién nacidos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Sueros humanos empleados

Se utilizaron cinco sueros humanos: dos sueros de voluntarios sanos que se emplearon como controles negativos, y los sueros de tres pacientes con PV (RL, EK y VDV) que habían sido obtenidos por plasmaféresis.

### Producción de desmogleína 3 recombinante utilizando el sistema de expresión del baculovirus

La región extracelular de la desmogleína 3 que se empleó para caracterizar los sueros mediante inmunoblot e inmunoprecipitación se obtuvo utilizando el sistema de expresión proteica del baculovirus siguiendo la técnica descrita por Amagai y cols. (13, 20).

### Caracterización de los sueros

Previamente a la preparación y purificación de las distintas fracciones, todos los sueros fueron estudiados mediante inmunofluorescencia indirecta, inmunoblot e inmunoprecipitación utilizando métodos ya descritos (11, 13, 21-24). La inmunofluorescencia indirecta se realizó empleando esófago de mono como sustrato y anticuerpos policlonales de cabra dirigidos contra la fracción Fc de la IgG humana marcados con fluoresceína (Cappel, Durham, North Carolina, Estados Unidos) (11). Se determinaron también las distintas subclases de IgG de los sueros de los tres pacientes utilizando anticuerpos monoclonales de ratón como anticuerpos secundarios, y posteriormente se emplearon anticuerpos policlonales de oveja dirigidos contra la IgG de ratón marcados con fluoresceína como anticuerpos terciarios (21). En los estudios de inmunoblot se emplearon como sustratos extractos de epidermis humana, y la proteína recombinante con la secuencia de la región extracelular de la desmogleína 3 obtenida mediante el sistema del baculovirus (13, 2, 23). La presencia de anticuerpos contra la desmogleína 3 se investigó también por inmunoprecipitación utilizando desmogleína 3 recombinante radiomarcada con I<sup>125</sup> mediante el método de la cloramina T (13). La presencia de anticuerpos contra la desmogleína 1 se investigó mediante inmunoprecipitación utilizando fragmentos proteolíticos de epidermis bovina radiomarcados (24).

### Preparación y purificación de las distintas fracciones inyectadas en los experimentos de transferencia pasiva

La fracción IgG de pacientes y controles se obtuvo mediante precipitación del suero con sulfato amónico al 50%, realizándose a continuación una cromatografía en gel utilizando columnas de Sephadex G-200 (Pharmacia Biotech, Washington, District of Columbia, Estados Unidos) (25). Los fragmentos  $F(ab')_2$  se obtuvieron mediante digestión enzimática con pepsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, Estados Unidos) de cada una de las fracciones de IgG purificada de pacientes y controles (26), realizándose a continuación una cromatografía de afinidad con columnas de sefaroza-proteína G estafilocócica (Pharmacia Biotech). Los fragmentos Fab se obtuvieron mediante digestión enzimática con papaína (Sigma Chemical Co.) de cada una de las fracciones de IgG (27), realizándose a continuación una cromatografía de afinidad con columnas de sefaroza-proteína G estafilocócica. Las distintas fracciones IgG,  $F(ab')_2$ , y Fab así obtenidas se concentraron por ultrafiltración (Amicon, Lexington, Massachusetts, Estados Unidos), se dializaron con PBS, y fueron finalmente esterilizadas mediante filtración a través de membranas con poros de  $0,22 \mu\text{m}$  (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, Estados Unidos). Se comprobó la pureza de todas las fracciones mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, doble inmunodifusión en gel, e inmunofluorescencia indirecta.

### Animales de experimentación

Para realizar los experimentos de transferencia pasiva se emplearon ratones recién nacidos de tipo BALB/c que tenían entre 24 y 48 horas de vida, y cuyo peso oscilaba entre 1,3 y 2 gramos. Los ratones se obtuvieron de una colonia de progenitores mantenida en el Animal Resource Center del Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Estados Unidos.

### Experimentos de transferencia pasiva a animales de experimentación

Con la excepción del grupo de ratones que fueron inyectados por vía intraperitoneal (experimento 5), todos los ratones recién nacidos fueron inyectados por vía subcutánea en la espalda (región interescapular) utilizando jeringas de insulina. Se realizaron los siguientes grupos de experimentos:

#### 1. Evaluación de la patogenicidad de las fracciones IgG, $F(ab')_2$ y Fab de los sueros de pacientes con PV

Las distintas fracciones IgG,  $F(ab')_2$  y Fab de pacientes y controles fueron administradas a diferentes

grupos de ratones que recibieron dos dosis separadas por un intervalo de 12 horas. Las dosis totales administradas a los ratones oscilaron entre 50 y 250  $\mu\text{l}$  según las fracciones. El examen de los animales se realizó a las 24 horas de la primera inyección.

#### 2. Curso evolutivo de la enfermedad inducida por la fracción Fab del PV

Se utilizó la fracción Fab del suero VDV, inyectándose una dosis única de 1 mg (20 nmol de Fab) a cuatro grupos de tres ratones que fueron examinados al cabo de dos, tres, cuatro y cinco horas después de la inyección, respectivamente.

#### 3. Comparación del curso evolutivo de las fracciones IgG y Fab del PV

Se emplearon aquí unas fracciones IgG y Fab obtenidas del suero RL. Se inyectó una dosis única de 3,6 mg de IgG o de 1,2 mg de Fab (24 nmol de cada fracción) de forma simultánea a dos grupos de 27 ratones que fueron sacrificados de tres en tres al cabo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 y 24 horas después de la inyección, respectivamente.

#### 4. Comparación del poder patógeno de diferentes dosis de IgG y Fab de PV

Se utilizaron aquí las mismas fracciones IgG y Fab obtenidas del suero RL que se habían utilizado en el experimento 3. Se inyectó una dosis única de 1,5, 3, 6, 12, y 24 nmol de IgG y Fab de forma simultánea a grupos de cuatro ratones que fueron examinados al cabo de seis horas después de la inyección.

#### 5. Comparación de la patogenicidad de la Fab de PV utilizando dos vías diferentes de inyección

Se inyectaron dos dosis de una fracción Fab obtenida del suero RL separadas por un intervalo de 12 horas a dos grupos de tres ratones utilizando dos vías diferentes de inyección. El primer grupo recibió dosis subcutáneas de 50  $\mu\text{l}$ , mientras que el segundo recibió dosis intraperitoneales de 100  $\mu\text{l}$ . El examen de los animales se realizó a las 24 horas de la primera inyección.

### Examen de los animales

El examen clínico de los ratones se realizó tal como ya se ha descrito en otros trabajos (18, 19, 21). Tras inspeccionar el aspecto de la piel, se friccionó ésta para in-

tentar obtener un despegamiento de la epidermis (signo de Nikolsky). Los animales fueron entonces sacrificados por decapitación, y se obtuvieron biopsias de piel lesional y perilesional para la realización de los exámenes de microscopía óptica e inmunofluorescencia directa, respectivamente. Se obtuvo también sangre para realizar los exámenes de inmunofluorescencia indirecta. Los estudios de inmunofluorescencia directa e indirecta se realizaron utilizando anticuerpos de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra la región Fc y F(ab')<sub>2</sub> humanas (estos últimos reconocen tanto los fragmentos Fab como los F(ab')<sub>2</sub>), y la fracción C3 del complemento murino (Cappel) (18, 19, 21). Se utilizó esófago de mono como sustrato para realizar la inmunofluorescencia indirecta. Todas las muestras fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia Nikon.

## RESULTADOS

### Caracterización de los sueros

El suero del paciente RL que se empleó para purificar la fracción IgG tenía un título de anticuerpos de 1:320, y la distribución por subclases fue la siguiente: IgG<sub>1</sub>, 1:80; IgG<sub>2</sub>, 1:20; IgG<sub>3</sub>, negativa; e IgG<sub>4</sub>, 1:1280. Fue negativo por inmunoblot con ambos sustratos (extractos de epidermis humana y desmogleína 3 recombinante), pero positivo por inmunoprecipitación (Fig. 1) reconociendo una banda de 66 kD correspondiente a la región extracelular de la desmogleína 3. El suero del pa-

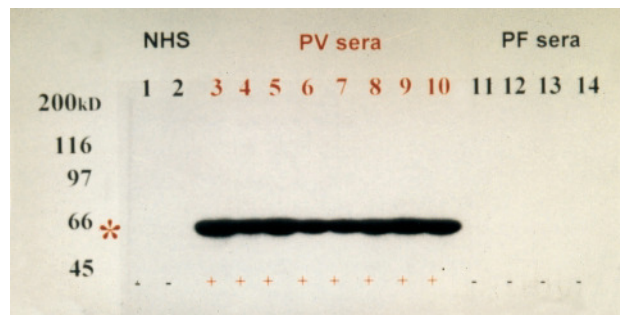


FIG. 1.—Estudio de inmunoprecipitación utilizando la región extracelular de la desmogleína 3 recombinante obtenida mediante el sistema de baculovirus radiomarcada con I<sup>125</sup>. Las hileras uno y dos corresponden al suero de voluntarios sanos; las hileras tres, cuatro y cinco corresponden a los sueros de los tres pacientes con pénfigo vulgar incluidos en este estudio (RL, EK y VDV, respectivamente); las hileras 6 a 10 corresponden a los sueros de otros cinco pacientes con pénfigo vulgar; las hileras 11 a 14 corresponden a los sueros de cuatro pacientes con pénfigo foliáceo. A la izquierda se indican los marcadores de peso moleculares (200, 116, 97, 66 y 45 kD). NHS, suero humano normal; PV, pénfigo vulgar; y PF, pénfigo foliáceo. El asterisco indica la localización de la banda de 66 kD correspondiente a la región extracelular de la desmogleína 3. Aunque la desmogleína 3 nativa tiene un peso molecular de 130 kD, la proteína recombinante corresponde a la región extracelular, cuyo peso molecular es de 66 kD.

ciente EK tenía un título de 1:160, y la distribución por subclases fue: IgG<sub>1</sub>, 1:20; IgG<sub>2</sub>, 1:20; IgG<sub>3</sub>, negativa; e IgG<sub>4</sub>, 1:640. Aunque el inmunoblot fue negativo con los dos sustratos empleados, también reconoció la banda de 66 kD por inmunoprecipitación (Fig. 1). El suero de la paciente VDV tenía un título de 1:640, y la distribución por subclases fue: IgG<sub>1</sub>, 1:80; IgG<sub>2</sub>, 1:20; IgG<sub>3</sub>, negativa; e IgG<sub>4</sub>, 1:1280. En los estudios de inmunoblot es-

**TABLA I:** DOSIS Y TÍTULO POR INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA DE LAS DISTINTAS FRACCIONES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO\*

Suero	Fracción	Concentración (mg/ml)	Título inmunofluorescencia
RL	IgG	90	1:1280
	F(ab') <sub>2</sub>	25	1:1280
	Fab (2 fracciones diferentes)	5.5	1:1280
		6	1:2560
	IgG**	73	1:2560
	Fab**	11	1:2560
VDV	IgG	50	1:2560
	F(ab') <sub>2</sub>	20.5	1:5120
	Fab**	11.5	1:5120
EK	IgG	45	1:640
	F(ab') <sub>2</sub>	17	1:1280
	Fab	11.5	1:2560
SVS	IgG	54	Negativa
	F(ab') <sub>2</sub>	40	Negativa
	Fab (2 sueros diferentes)	5.2	Negativa
		5.8	Negativa

\*SVS, suero de voluntarios sanos.

\*\* Fracciones empleadas en los estudios de curso evolutivo y de comparación de dosis.

te suero identificó una banda de 130 kD utilizando extractos epidérmicos, y de 66 kD cuando se empleó desmogleína 3 recombinante. También reconoció la banda de 66 kD por inmunoprecipitación (Fig. 1). Sólo se objetivó la presencia anticuerpos contra la desmogleína 1 en el suero de la paciente VDV que, al igual que un suero control de pénfigo foliáceo, inmunoprecipitó unas bandas de 66 y 45 kD correspondientes a los fragmentos proteolíticos de la desmogleína 1 bovina (24). Los sueros de los dos voluntarios sanos utilizados en este estudio fueron negativos por inmunofluorescencia indirecta, inmunoblot e inmunoprecipitación.

### Fracciones utilizadas en los experimentos de transferencia pasiva

La concentración y los títulos de inmunofluorescencia indirecta de las distintas fracciones utilizadas en los experimentos realizados en este estudio se hallan resumidos en la tabla I.

### Experimentos de transferencia pasiva a animales de experimentación

#### 1. Los fragmentos Fab de la IgG de pacientes con PV son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c (tabla II)

Ninguno de los ratones inyectado con las fracciones IgG, F(ab')<sub>2</sub> o Fab obtenidas de los sueros de dos voluntarios sanos mostró signos de enfermedad cutánea.

Los estudios de microscopía óptica y de inmunofluorescencia de la piel y del suero de estos animales fueron siempre normales o negativos. Como era de esperar, todos los ratones a los que se inyectó la fracción IgG obtenida a partir de alguno de los tres sueros de pacientes con PV desarrollaron lesiones ampollas en la piel (15). El examen histológico demostró que las lesiones que presentaban los animales eran ampollas suprabasales. La inmunofluorescencia directa mostró la tinción de los espacios intercelulares de la epidermis murina cuando se utilizaban anticuerpos anti-Fc humano y/o anti-C3 de ratón. Los títulos de anticuerpos circulantes determinados por inmunofluorescencia indirecta de los animales oscilaron entre 1:80 y 1:320.

También se pudo confirmar la observación previa de que los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de PV son patógenos cuando se utiliza un modelo animal experimental (16). Todos los ratones a los que se inyectó con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de la fracción IgG de los tres sueros de pacientes con PV desarrollaron lesiones en la piel. Dichas lesiones fueron idénticas a las que se habían podido observar en los ratones inyectados con la molécula de IgG intacta, y el examen histológico demostró que las ampollas se producían justo por encima de la capa de queratinocitos basales de la epidermis. La inmunofluorescencia directa de los ratones inyectados con F(ab')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub>. Por inmunofluorescencia indirecta se pudo

**TABLA II:** 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	IgG/F(ab') <sub>2</sub>	C3 de ratón	
IgG-SVS	5	0	-	-	-
IgG-RL	27	27	+	+/-	80-320
IgG-EK	8	8	+	+/-	80-160
IgG-VDV	2	2	+	+/-	320
F(ab') <sub>2</sub> -SVS	3	0	-	-	-
F(ab') <sub>2</sub> -RL	16	16	+	-	160-320
F(ab') <sub>2</sub> -EK	5	5	+	-	80-160
F(ab') <sub>2</sub> -VDV	2	2	+	-	160
Fab-SVS	6	0	-	-	-
Fab-RL	23	23	+	-	<20-80
Fab-EK	9	9	+	-	40-80
Fab-VDV	4	4	+	-	40-80

\*SVS, sueros de voluntarios sanos. Se inyectó subcutáneamente la fracción IgG, o los fragmentos proteolíticos F(ab')<sub>2</sub> y Fab de la IgG de tres sueros pacientes con pénfigo vulgar o 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 la primera inyección.

\*\*La inmunofluorescencia (IF) directa e indirecta se realizaron con anticuerpos de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra la fracción Fc (ratones inyectados con IgG) o contra la fracción F(ab')<sub>2</sub> de la IgG humana (ratones inyectados con F(ab')<sub>2</sub> o Fab). Ambos exámenes fueron negativos en ratones inyectados con F(ab')<sub>2</sub> o Fab cuando se utilizaron anticuerpos de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra la fracción Fc.



FIG. 2.—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 inyectados.

demostrar la presencia de anticuerpos circulantes contra los espacios intercelulares en los animales inyectados, con títulos que oscilaron entre 1:80 y 1:320 cuando se emplearon anticuerpos policlonales de cabra anti-F(ab')<sub>2</sub> humana marcados con fluoresceína como anticuerpos secundarios. Los sueros de los animales fueron siempre negativos cuando se emplearon como anticuerpos secundarios anticuerpos policlonales de cabra anti-Fc humana marcados con fluoresceína.

Sorprendentemente, todos los ratones inyectados con fragmentos Fab de los tres pacientes con PV también desarrollaron lesiones ampollosas cutáneas, al igual que lo habían hecho aquellos a los que se habían inyectado las fracciones IgG y F(ab')<sub>2</sub> de estos mismos sueros. Las lesiones fueron idénticas a las que habían presentado los otros dos grupos de animales (Fig. 2). Los

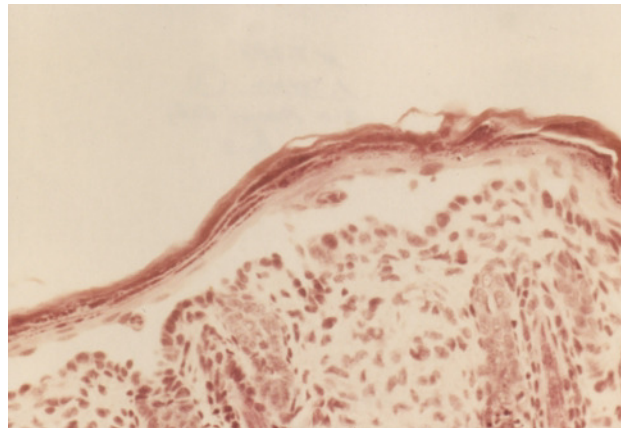


FIG. 3.—El examen histológico mostró que las lesiones de los ratones inyectados con fragmentos Fab correspondían a ampollas intraepidérmicas suprabasales típicas de pénfigo vulgar.

hallazgos histológicos también fueron idénticos a los de los animales a los que se había inyectado IgG y F(ab')<sub>2</sub> de estos mismos pacientes, observándose ampollas intraepidérmicas suprabasales típicas de PV (Fig. 3). No pudieron detectarse depósitos de Fc humana o C3 de ratón al realizar la inmunofluorescencia directa. Si que se observó, sin embargo, la presencia de depósitos de fragmentos Fab a nivel de los espacios intercelulares de la epidermis (Fig. 4). A diferencia de lo observado con los animales inyectados con IgG y F(ab')<sub>2</sub>, los títulos de anticuerpos circulantes en los animales inyectados con los fragmentos Fab fueron muy bajos, oscilando entre 1:80 e inferiores a 1:20 (es decir que la inmunofluorescencia indirecta fue negativa a dilución 1:20).

## 2. Los ratones inyectados con fragmentos Fab de PV presentan lesiones microscópicas tan solo dos horas después de la inyección (tabla III)

En este experimento se observó que los primeros signos enfermedad aparecían tan sólo dos horas después de la inyección subcutánea de la fracción Fab a los ratones. Estos animales no tenían signos clínicos de enfermedad, pero si que presentaban ampollas suprabasales

**TABLA III:** ESTUDIO DEL CURSO EVOLUTIVO DE LA ENFERMEDAD PRODUCIDA EN RATONES INYECTADOS CON FRAGMENTOS FAB DE PÉNFIGO VULGAR\*

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

\*IF, inmunofluorescencia. Se inyectaron grupos de tres ratones recién nacidos de tipo BALB/c con una sola dosis subcutánea de 20 nmol de la fracción Fab del suero de la paciente VDV. Los animales fueron examinados en diferentes momentos tras la inyección.



**TABLA IV:** 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 tres 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 examinados en diferentes momentos tras la inyección.

sales al realizar el examen con microscopía óptica. Los primeros signos clínicos que se pudieron observar aparecieron al cabo de tres horas y consistieron en erosiones mínimas al frotar la piel. Las lesiones clínicas se hicieron más evidentes al cabo de cuatro-cinco horas de la inyección de Fab. La inmunofluorescencia directa mostró depósitos de Fab en los espacios intercelulares de todos los animales inyectados.

*3. El curso evolutivo de la enfermedad producida en ratones inyectados con fragmentos Fab de PV es similar al de los animales inyectados con la fracción IgG del mismo suero (tabla IV)*

En este experimento se comparó el curso evolutivo de la enfermedad que aparece en los ratones tras la transferencia pasiva de anticuerpos de tipo IgG o Fab. Los hallazgos fueron muy similares con ambas fracciones. Así, por inmunofluorescencia directa se pu-

dieron detectar anticuerpos (IgG o Fab) unidos a los espacios intercelulares de la epidermis murina tan sólo una hora después de la inyección de estas fracciones. Los primeros signos histológicos de enfermedad (ampollas suprabasales mínimas) no aparecieron hasta pasadas dos horas de la inyección subcutánea de anticuerpos. Los primeros signos clínicos, manifestados en forma de erosiones mínimas, se pudieron apreciar al cabo de tres horas. A las seis 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 seis horas.

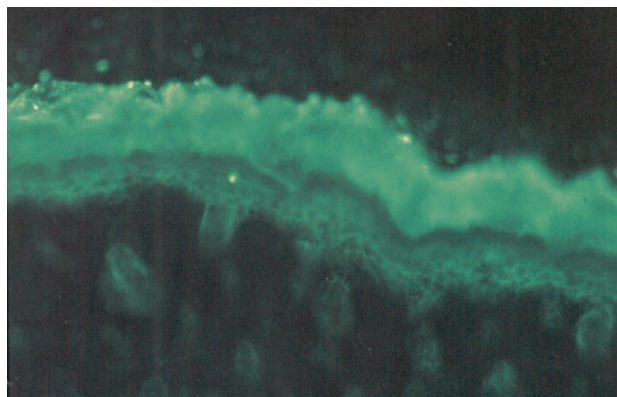


FIG. 4.—Al realizar la inmunofluorescencia directa se detectaron depósitos de fragmentos Fab en los espacios intercelulares de la epidermis de los ratones. No se detectaron fragmentos Fc (correspondientes a IgG intacta) ni depósitos de C3 murino.

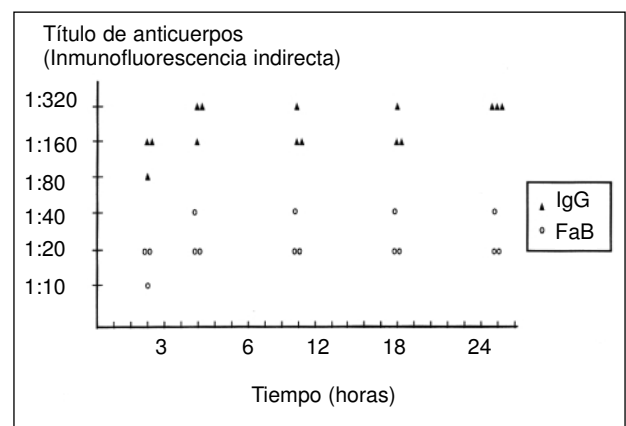


FIG. 5.—Se inyectaron varios grupos de tres ratones recién nacidos con una dosis única de 24 nmol de Fab o de IgG de pénfigo vulgar. Los animales fueron sacrificados a las 3, 6, 12, 18 y 24 horas después de la inyección, y se realizó la determinación de los títulos de anticuerpos circulantes en el suero por inmunofluorescencia indirecta. Como se observa en el gráfico, los títulos de anticuerpos fueron significativamente más bajos en los ratones inyectados con fragmentos Fab que en los ratones inyectados con IgG.

**TABLA V:** 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) Signos clínicos	Signos histológicos	IF directa positiva	Número de ratones (4 por grupo) 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 grupos de cuatro 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 seis horas de la inyección.

\*\*1nmol equivale a 0,15 mg de IgG, y a 0,05 mg de Fab.

*El título de anticuerpos circulantes en los ratones inyectados con fragmentos Fab de PV es mucho más bajo que tras la inyección de la fracción IgG del mismo suero (Fig. 5).* En este experimento se pudo comprobar que, tal como se había observado en el experimento 1, los títulos de anticuerpos circulantes son más bajos tras la inyección de Fab que de IgG. La determinación de los títulos de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta en los animales sacrificados a las 3, 6, 12, 18 y 24 horas utilizando anticuerpos policlonales de carnero marcados con fluoresceína dirigidos contra el fragmento F(ab')<sub>2</sub> de la IgG humana (que es capaz de unirse tanto a la IgG intacta como a los fragmentos Fab) evidenció que el título de anticuerpos era mucho más bajo en los ratones inyectados con Fab, a pesar de que ambos grupos recibieron dosis equimolares de anticuerpos (Fig. 5).

#### 4. Diferentes dosis equimolares de las fracciones IgG y Fab de PV no difieren en cuanto a su patogenicidad en el ratón (tabla V)

En este grupo de experimentos se comparó la potencia de diferentes cantidades de IgG con dosis equimolares de fragmentos Fab. La dosis más baja que fue capaz de inducir ampollas microscópicas con ambas fracciones 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, incluso en aquellos que habían sido inyectados con dosis que no fueron capaces de causar lesiones clínicas o histológicas.

#### 5. La inyección de Fab de PV por vía subcutánea es más eficaz que por vía intraperitoneal a la hora de causar enfermedad en los animales de experimentación

Todos los ratones inyectados vía subcutánea fueron positivos tanto clínica como histológicamente a

las 24 horas de la primera inyección, mientras que los ratones inyectados por vía intraperitoneal no mostraban signos clínicos de enfermedad, a pesar de que todos tenían ampollas suprabasales microscópicas. La inmunofluorescencia indirecta fue negativa a dilución de 1:20 en todos los ratones, mientras que la directa demostró la presencia de fragmentos Fab en los espacios intercelulares de la epidermis de todos los animales.

## DISCUSIÓN

El primer hito dentro de la investigación de la patogenia del PV fue el descubrimiento por Ernst Beutner y Robert Jordon en el año 1964 de que estos pacientes presentaban unos anticuerpos en el suero que estaban dirigidos contra los espacios intercelulares de la epidermis (1). 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 quizá jugaban un papel en la aparición de las lesiones de los 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 se demostraba que el suero de pacientes con pénfigo era capaz de inducir acantólisis en la epidermis de fragmentos de piel humana mantenidos en medio de cultivo (28). Parece ser, sin embargo, que los italianos Bellone y Leone habían hecho observaciones similares años antes de que se descubriese la existencia de anticuerpos en el suero de los pacientes, y por lo tanto deberían compartir el prestigio de los autores americanos (29).



Otra línea de investigación fue la realización de estudios de patogenicidad de los anticuerpos *in vivo* utilizando animales de experimentación (17). 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 (30, 31). Todos estos estudios obtuvieron resultados negativos en cuanto a la producción de lesiones cutáneas 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. La naturaleza autoinmune del PV quedó finalmente bien establecida con la demostración de que los anticuerpos anti-epidérmicos 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 (15). Fue sin duda el tamaño pequeño de estos animales y la gran concentración a la que se administró la IgG de los pacientes lo que contribuyó a la obtención de estos resultados que no habían podido obtener otros investigadores. 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 obtener lesiones en este modelo animal (Mascaró JM, observación personal). Otro factor importante fue la ausencia de pelo de los ratones recién nacidos, facilitando el examen clínico de estos animales respecto a otras especies.

En estudios posteriores se ha podido observar que los anticuerpos de los pacientes con PV se hallan dirigidos contra la desmogleína 3, una glicoproteína epidérmica de 130 kD (4, 6). Más recientemente se ha podido demostrar que los anticuerpos dirigidos contra la desmogleína 3 son patógenos en ratones recién nacidos de tipo BALB/c (32). 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 dos pacientes con PV (20). 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 (33, 34). Se ha visto también que un 50-60% de los pacientes con PV tiene anticuerpos contra la desmogleína 1, el antígeno del pénfigo foliáceo (8, 10-13). Se piensa en la actualidad que en las primeras fases de la enfermedad los anticuerpos anti-desmogleína 3 serían los responsables de la aparición de las lesiones orales con las que debuta la

gran mayoría de pacientes con PV (13, 14). La aparición posterior de anticuerpos anti-desmogleína 1 en estos pacientes provocaría que ambas poblaciones de anticuerpos (anti-desmogleína 1 y anti-desmogleína 3) diesen lugar a la aparición de lesiones cutáneas (13, 14). Todos estos estudios sugieren que los anticuerpos del suero de los pacientes con PV se hallan dirigidos principalmente contra la región extracelular de la desmogleína 3, y que son los responsables de iniciar y producir las lesiones cutáneas de estos enfermos, contribuyendo los anticuerpos anti-desmogleína 1 a la aparición y extensión de las lesiones en la piel.

La mayoría de los estudios han investigado el mecanismo por el cual aparecen las ampollas en el PV desde un punto de vista antigénico. En el presente estudio se ha investigado dicho mecanismo desde el punto de vista de los anticuerpos. Ello permitirá entender mejor cómo aparece la acantólisis y se forman las ampollas intraepidérmicas en el PV. Se ha examinado aquí el papel de la valencia de los anticuerpos en la producción de acantólisis en la epidermis de ratones recién nacidos de tipo BALB/c a los que administró IgG o sus fragmentos proteolíticos  $F(ab')_2$  y Fab obtenidos de tres sueros de pacientes con PV. Los resultados obtenidos demuestran claramente que tanto las inyecciones subcutáneas de IgG como de  $F(ab')_2$  y Fab de PV producen la aparición de vesículas epidérmicas en estos animales. 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. El papel de la valencia de los anticuerpos en la patogenia del PV y del pénfigo foliáceo ya había sido estudiado (16, 18). Rock y cols. demostraron que los fragmentos Fab' de la IgG obtenida del suero de un paciente con pénfigo foliáceo eran patógenos cuando fueron inyectados por vía subcutánea a ratones recién nacidos. Sin embargo, Anhalt y cols. no pudieron demostrar esto cuando inyectaron por vía intraperitoneal los fragmentos  $F(ab')_2$  y Fab' obtenidos del suero de un sólo paciente con PV (16). Mientras que los siete ratones inyectados con fragmentos  $F(ab')_2$  desarrollaron lesiones cutáneas, ninguno de los cinco 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 PV demostró la presencia de depósitos intercelulares de estos fragmentos en todos los animales. La inmunofluorescencia indirecta fue negativa o sólo mostró títulos muy bajos de anticuerpos en el suero de los ratones inyectados con fragmentos Fab'. Se formuló entonces la hipótesis de que para que apareciese la acantólisis en el PV era necesario que los anticuerpos

fueran bivalentes y se produjese así un entrecruzamiento (*cross-linking*) de la molécula antigénica en la superficie de los queratinocitos epidérmicos (16, 17).

Nuestros resultados difieren notablemente de los hallados previamente por Anhalt y cols. (16), pero esta discordancia podría explicarse porque en aquel estudio se utilizó la vía intraperitoneal para realizar las inyecciones. Tal como queda demostrado en el presente estudio, las inyecciones subcutáneas de Fab de PV son mucho más eficaces que las intraperitoneales a la hora de inducir enfermedad por transferencia pasiva a animales de experimentación. Cuando se inyectan fragmentos Fab por vía subcutánea, la enfermedad que se observa en los animales es consecuencia de un efecto local de los anticuerpos que difunden directamente desde la dermis hasta los espacios intercelulares de la epidermis. Por el contrario, cuando la fracción Fab es inyectada por vía intraperitoneal los anticuerpos deberán entrar primero en el torrente circulatorio, y después penetrar en la piel para ser capaces de inducir enfermedad. Además, si se compara la vida media de los fragmentos Fab con la de la IgG y los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, 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 (35). Algunos autores han encontrado incluso que en los ratones puede ser de tan sólo tres horas y media (36). Además, el volumen de distribución de la Fab es mucho mayor que el volumen plasmático, y se ha estimado que puede ser hasta nueve veces mayor que el volumen de distribución de la IgG cuando se inyectan fracciones IgG y Fab heterólogos a animales de experimentación (37). Estas dos circunstancias (un catabolismo aumentado y un mayor volumen de distribución) permiten 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 anticuerpos fuesen mucho más bajos cuando se administraron fragmentos Fab. Estos hallazgos son también coherentes con los del estudio de Anhalt y cols. en que halló que los títulos de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta en ratones inyectados con Fab por vía intraperitoneal fueron negativos o muy bajos (16).

Otro hallazgo interesante del presente estudio fue la demostración que las fracciones IgG y Fab de un paciente con PV no diferían 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 dos horas después de haber sido inyectadas. En ambos casos se observaron también signos clínicos

evidentes de enfermedad al cabo de un período de cuatro a seis horas después de la inyección. Esto también se pudo observar tras la inyección subcutánea de la Fab de otro de los tres pacientes con PV incluidos en este estudio. Estos hallazgos se han podido también corroborar con la IgG de otros pacientes con PV no incluidos en este estudio (Mascaró JM, observación personal). La presencia de anticuerpos unidos a los espacios intercelulares de la epidermis murina se observa tan sólo una hora después de la inyección de anticuerpos. Estos hallazgos son interesantes dado que hasta la fecha sólo ha habido un estudio en el que se haya estudiado el curso evolutivo tras la inyección de IgG de PV a ratones (38). En aquel estudio los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal y se detectaron indicios de unión de IgG humana a los espacios intercelulares por inmunofluorescencia directa al cabo de una hora de la inyección, siendo máxima a las seis horas. El examen ultraestructural con microscopía electrónica mostró una pérdida de cohesión entre los queratinocitos tan sólo una hora después de la inyección, y al cabo de seis 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 horas de la inyección de anticuerpos. Este estudio no daba información, sin embargo, acerca de los hallazgos histológicos con microscopía óptica. Los resultados de ambos estudios no son comparables dado que la vía de inyección fue diferente y esto modifica completamente la cronología. En los estudios más recientes se ha utilizado casi siempre la vía subcutánea pero no se ha estudiado el curso evolutivo de la enfermedad, y en la mayoría de ellos los ratones son examinados y sacrificados entre 18 y 24 horas después de la inyección (14, 20, 32-34).

En resumen, en este estudio se ha demostrado por primera vez que los anticuerpos del PV son capaces de inducir acantólisis *in vivo* de forma independiente a la valencia de la molécula de anticuerpo. No es necesario, por lo tanto, que los anticuerpos patógenos en el PV den lugar a un entrecruzamiento (*cross-linking*) de los antígenos diana en la superficie de los queratinocitos para inducir acantólisis. Además, apoyan que el mecanismo por el cual se produce la acantólisis es similar en el PV y en el pénfigo foliáceo. Esta se produciría por la simple unión de las moléculas de anticuerpo (y más concretamente su fracción Fab) a algunos epítomos de la región extracelular de las desmogleínas provocando una pérdida de su función adhesiva, y así la pérdida de una adhesión entre los queratinocitos epidérmicos.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente al profesor Luis Díaz, Jefe del Departamento de Dermatología y Director del Laboratorio de Inmunodermatología del Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Estados Unidos. Él ha sido la persona fundamental que me inspiró, ayudó y aconsejó en la realización de este trabajo. Agradezco también a todos mis compañeros (dermatólogos, miembros del «staff», y personal del laboratorio) del Departamento de Dermatología del Medical College of Wisconsin por su ayuda y amistad.

**Abstract.**—Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune bullous disease that is mediated by autoantibodies. It has been shown that neonatal mice injected intraperitoneally with PV IgG and F(ab')<sub>2</sub> fragments, but not Fab' fragments, reproduced the key features of the disease. Therefore it was proposed that cross-linking of the antigen by bivalent autoantibodies could trigger acantholysis.

In the present study, subcutaneous injections of PV IgG and its proteolytic fragments F(ab')<sub>2</sub> and Fab into neonatal mice were used to test this hypothesis. The sera of 3 well-characterized PV patients and 2 normal human sera were used. All mice injected with PV IgG and its proteolytic fragments F(ab')<sub>2</sub> and Fab from three different patients' sera reproduced the human disease clinically, histologically and immunopathologically in a dose-dependent manner following a similar time-course. In addition, PV IgG and Fab fractions induced acantholysis as early as 2 hours after the injection.

These results demonstrate for the first time that PV monovalent Fab fragments are pathogenic.

*Mascaró Galy JM. In vivo study of the role of the pemphigus vulgaris antibody valence in the pathogenesis of the disease. Actas Dermosifiliogr 1999;90:361-372.*

**Key words:** Pemphigus vulgaris. Desmogleins. Animal model. Fab fragments. Cell adhesion.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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;117:505-10.
2. Stanley JR: Pemphigus. En: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K y cols. eds. *Dermatology in general medicine* 4.ª ed. New York: McGraw-Hill 1993;606-15.
3. Mascaró Jr JM, Fairley JA, Giudice GJ, Díaz LA. Autoantibodies in pemphigus vulgaris. En: *Autoantibodies*. Shoenfeld Y, Peters JB eds. Amsterdam: Elsevier Science Publications, 1996;749-53.
4. 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;70:281-8.
5. Stanley JR, Koulu L, Thivolet C. Distinction between epidermal antigens binding pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus autoantibodies. *J Clin Invest* 1984;74:313-20.
6. 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;122:409-15.
7. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991;67:869-77.
8. 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;136:1227-30.
9. Buxton RS, Cowin P, Franke WW y cols. Nomenclature of desmosomal cadherins. *J Cell Biol* 1993;121:481-3.
10. Eyre RW, Stanley JR. Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. *J Clin Invest* 1988; 81:807-12.
11. Emery DJ, Díaz LA, Fairley JA, López A, Taylor AF, Giudice GJ. Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein 1. *J Invest Dermatol* 1995;104:323-8.
12. Amagai M. Pemphigus: Autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv Dermatol* 1996;11:319-52.
13. Ding X Aoki V, Mascaró JM, Lopezswiderski A, Díaz LA, Fairley JA. Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 1997;109:592-6.
14. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103:461-8.
15. Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ, Beals TF, Díaz LA. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982;306:1189-96.
16. Anhalt GJ, Till GO, Díaz LA, Labib RS, Patel HP, Eaglstein NF. Defining the role of complement in experimental pemphigus vulgaris in mice. *J Immunol* 1986; 137:2835-40.
17. Anhalt GJ y Díaz LA. *In vivo* studies of antibody dependent acantholysis. En: Norris DA ed. *Immune mechanisms in cutaneous disease*. New York: Marcel Dekker Inc 1989:291-316.
18. Rock B, Labib RS, Díaz LA. Monovalent Fab' immunoglobulin fragments from endemic pemphigus foliaceus autoantibodies reproduce the human disease in neonatal BALB/c mice. *J Clin Invest* 1990;85:296-9.
19. España A, Díaz LA, Mascaró JM y cols. Mechanisms of acantholysis in pemphigus foliaceus. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;85:83-9.

20. 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* 1994;94:59-67.
21. 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;320:1463-9.
22. Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Díaz LA. Molecular heterogeneity of bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol* 1986;136:1231-5.
23. Giudice GJ, Emery DJ, Zelicson BD, Anhalt GJ, Liu Z, Díaz LA. Bullous pemphigoid and herpes gestationis autoantibodies recognize a common non-collagenous site on the BP180 ectodomain. *J Immunol* 1993;151:5742-50.
24. Labib RS, Rock B, Martins CR, Díaz 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;57:317-29.
25. Determann H. Gel Chromatography. New York: Springer-Verlag, 1968:87-98.
26. Stanworth DR, Turner MW. Immunochemical analysis of immunoglobulins and their subunits. En: DM Weir, ed. *Handbook of Experimental Immunology: Immunochimistry*. Oxford: Blackwell Scientific Pub, 1973;10.1-10.97.
27. Mage MG. Preparation of Fab fragments from IgGs of different animal species. *Method Enzymol* 1980;70:142-50.
28. Schiltz JR, Michel B. Production of epidermal acantholysis in normal human skin *in vitro* by the IgG fraction from pemphigus serum. *J Invest Dermatol* 1976;67:254-60.
29. 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.
30. Sams WJ, Jordon RE. Pemphigus antibodies: their role in disease. *J Invest Dermatol* 1971;56:47-9.
31. 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;44:631-43.
32. 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;90:919-26.
33. 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* 1996;106:261-8.
34. 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* 1996;157:3171-7.
35. Spiegelberg HL, Weigle WO. The catabolism of homologous and heterologous 7S gamma globulin fragments. *J Exp Med* 1965;121:323-38.
36. 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;126:207-21.
37. 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;36:384-96.
38. Takahashi Y, Patel HP, Labib RS, Díaz 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;84:41-6.