

## Penfigoide de mucosas: anticuerpos IgG e IgA contra el antígeno BP180

Agustín España<sup>a</sup>, Julio del Olmo<sup>a</sup>, Miren Marquina<sup>a</sup> y Cassian Sitaru<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Dermatología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona. España.

<sup>b</sup>Departamento de Dermatología. Universidad de Lübeck. Alemania.

**Resumen.**—*Introducción.* El penfigoide de mucosas (PM) es un grupo de enfermedades ampollosas autoinmunes, mediada por autoanticuerpos dirigidos contra diferentes proteínas de la unión dermoepidérmica, entre otras el antígeno BP180.

*Pacientes, materiales y métodos.* Se incluyen en este estudio 5 pacientes con PM. Estudiamos la presencia de autoanticuerpos circulantes frente al antígeno BP180 y frente a fragmentos extracelulares recombinantes de esta proteína.

*Resultados.* En todos los pacientes se detectó la presencia de anticuerpos circulantes frente a BP180. Los estudios de inmunofluorescencia indirecta (IFI) fueron positivos en 2 pacientes (20%), así como en también en 2 pacientes mediante la técnica *salt-split*. En 3 pacientes se encontró reactividad frente al fragmento extracelular del BP180 (LAD-1), dos de ellos mediante IgA y uno con IgG. Solamente el suero de 2 pacientes reconoció el fragmento NC16A, y 4 de los 5 pacientes presentaron anticuerpos frente al dominio carboxiterminal BP180 4575.

*Conclusiones.* Las técnicas de biología molecular son de gran importancia para complementar el diagnóstico de PM, en especial cuando los estudios de hematoxilina-eosina o de IF no ofrecen unos resultados satisfactorios para realizar un diagnóstico de PM.

**Palabras clave:** penfigoide de mucosas, autoinmunidad, autoanticuerpos, enfermedades vesiculobullosas.

### MUCOUS MEMBRANE PEMPHIGOID: IgG AND IgA ANTIBODIES AGAINST THE BP180 ANTIGEN

**Abstract.**—*Introduction.* Mucous membrane pemphigoid is a group of autoimmune bullous diseases, mediated by autoantibodies directed against different proteins in the dermoepidermal junction, including the BP180 antigen.

*Patients, material and methods.* We included five patients with MMP in this study. We studied the presence of circulating autoantibodies against the BP180 antigen and against recombinant extracellular fragments of this protein.

*Results.* We detected the presence of circulating antibodies against BP180 in all of the patients. Indirect immunofluorescence (IIF) studies were positive in 2 patients (20%), as well as in 2 patients via salt-split studies. We found reactivity to the extracellular fragment of BP180 (LAD-1) in 3 patients, 2 of them via IgA and 1 with IgG. The serum of only 2 patients recognized the NC16A fragment, and 4 of the 5 patients had antibodies against the carboxy-terminal domain BP180 4575.

*Conclusions.* Molecular biology techniques are very important to complement the diagnosis of MMP, especially when the results of hematoxylin-eosin or IF studies are not satisfactory for a diagnosis of MMP.

**Key words:** mucous membrane pemphigoid, autoimmunity, autoantibodies, vesiculobullous diseases.

## INTRODUCCIÓN

El penfigoide cicatrizal (PC) es un grupo de enfermedades autoinmunes, mediadas por autoanticuerpos IgG (inmunoglobulina) y/o IgA, que consisten en la aparición de ampollas subepidérmicas, que afectan principalmente a las mucosas, y en menor medida a la piel<sup>1</sup>. En los últimos años, esta enfermedad ha recibido muchas denominaciones, como penfigoide benigno de mucosas, penfigoide oral o penfigoide ocular<sup>2</sup>. No obstante, el curso no siempre es benigno; deja importantes secuelas en el paciente, y en ocasiones pueden observarse lesiones en varias localiza-

ciones. Por este motivo, hoy día es más aceptado el nombre de penfigoide de mucosas (PM) para designar este grupo de enfermedades<sup>3</sup>.

Varias proteínas constitutivas de la membrana basal de la epidermis se han implicado como antígenos en la patogenia del PM, destacando con una frecuencia mayor el antígeno del penfigoide ampolloso 2 (APA-2) o BP180<sup>4-8</sup>. También se ha relacionado el (APA)-I o BP230<sup>4-8</sup>, la integrina  $\alpha 6\beta 4$ <sup>9,10</sup>, la laminina 5<sup>11-13</sup>, la laminina 6<sup>13</sup> y el colágeno tipo VII<sup>14</sup>. Además, un mismo paciente puede presentar autoanticuerpos dirigidos frente a varios de estos antígenos<sup>13,15,16</sup>. Esta variedad antigénica muestra el gran espectro clínico de esta enfermedad, y la variabilidad clínica en su expresión. El diagnóstico de cada una de estas formas clínicas requiere, además de la presencia de los típicos hallazgos clínicos, de la utilización de técnicas de biología molecular y de inmunofluorescencia especiales, tal y como se ha establecido recientemente<sup>3</sup>.

Se presenta nuestra experiencia en 5 pacientes con PM atendidos en nuestro departamento, en los que

*Correspondencia:*

Agustín España. Departamento de Dermatología. Clínica Universitaria de Navarra. España. Universidad de Navarra. Apto. 4209. 31080 Pamplona. España. aespana@unav.es

Recibido el 20 de diciembre de 2004.

Aceptado el 20 de abril de 2005.

**TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES**

Caso n.º	Sexo/ edad	Localizaciones de las lesiones							IFD			IFI (EM)	IFI (salt-split)		IB BP180 (LAD-1)		IB BP180 (NC16A)		ELISA BP180 (NC16A)		IB BP180 (4575)	
		P	Oc	Or	N	F	A	G	IgG	IgA	C3	IgG	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA	IgG	IgA
1	M/60	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1:320	-	-	-	-	+	-	NR	-	+	
2	V/41	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	NR	NR	-	+	-	+	NR	+	+	
3	V/46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	NR	-	+	-	
4	V/63	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1:80	+1:80(E)	-	-	-	NR	NR	-	+	-	
5	M/69	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+1:640(E)	+1:160(E)	+	-	NR	NR	-	-	-	

M: mujer; V: varón; P: piel; Oc: mucosa ocular; Or: mucosa oral; N: mucosa nasal; F: mucosa faríngea; A: mucosa anal; G: mucosa genital; IFD: inmunofluorescencia directa; EM: esófago de mono; IFI: inmunofluorescencia indirecta; NR: no realizada; E: epidermis.

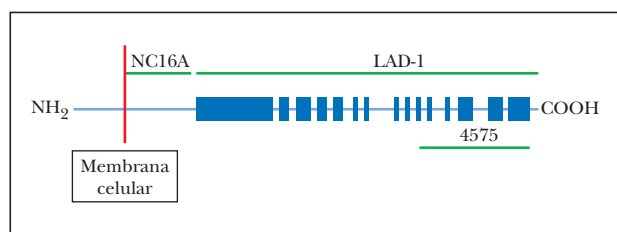


Fig. 1.—Diagrama que representa de forma esquemática el antígeno 2 del penfigoide ampolloso (BP180), con sus tres partes: porción intracelular, porción transmembrana y región extracelular. En este estudio se utilizan tres fragmentos recombinantes del BP180: fragmento extracelular LAD-1 (no es conocido exactamente el inicio de este fragmento, pero su extremo distal se extiende hasta el aminoácido 1497); el fragmento NC16A (desde el aminoácido 490 hasta el 565); y el fragmento carboxiterminal del ectodominio extracelular BP180 4575 (desde el aminoácido 1365 hasta el 1413).

se realizaron diferentes técnicas de biología molecular y de inmunofluorescencia que ayudaron a realizar un diagnóstico correcto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes y caracterización de los sueros

Nuestro estudio incluye 5 pacientes, 2 mujeres y 3 varones, diagnosticados de PM en el Departamento de Dermatología de la Clínica Universitaria de Navarra. Las características clínicas e inmunológicas de cada uno de los pacientes están incluidas en la tabla 1. La edad estuvo comprendida entre los 41 y los 69 años. Todos los pacientes presentaron afectación de mucosa oral, y solamente en 2 casos se observaron lesiones en la piel. En todos los casos se realizó biopsia de las lesiones, siguiendo las directrices indicadas<sup>3</sup>. Los hallazgos histológicos de hematoxilina-eosina fueron compatibles con enfermedad ampollosa subepidérmica. Se realizaron estudios de inmunofluorescencia directa (IFD) e indirecta (IFI), incluyendo la técnica de *salt-split* mediante el empleo de piel humana incubada en una solución de cloruro sódico 1M.

### Inmunofluorescencia y técnica de *salt-split*

Las técnicas de IFD e IFI se realizaron según se ha descrito en la literatura médica<sup>17</sup>. Para llevar a cabo la técnica de *salt-split* se siguieron las directrices de Zillikens et al<sup>18</sup>. Se incubó piel humana en una solución de cloruro sódico 1M. Los cortes obtenidos por congelación se pusieron en contacto con suero de los pacientes a una dilución 1:10 durante 30 min a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, se lavó la muestra suero salino, y se incubaron con anticuerpos anti-IgA a anti-IgG humana marcados con fluoresceína (FITC), a una dilución de 1:100.

### Técnicas de *immunoblot* y proteínas de fusión

Estas técnicas se llevaron a cabo en colaboración con el Departamento de Dermatología de la Universidad de Lübeck de Alemania (Dr. Cassian Sitaru), tal y como se ha descrito en la literatura médica<sup>18</sup>. Las proteínas de fusión utilizadas se muestran en la figura 1, siguiendo la técnica propuesta por Georgi et al<sup>19</sup> y basándose en la secuenciación descrita por Giudice et al<sup>20</sup>. La región soluble del ectodominio del BP180 (LAD-1) se aisló de un cultivo de células Ha CaT<sup>21</sup>, creciendo en un medio para queratinocitos en condiciones de calcio bajo (Clonetics, La Jolla, CA, EE.UU.) hasta llegar a una confluencia del 70-80 %<sup>21</sup>. El concentrado del cultivo de queratinocitos se separó con geles de electroforesis de poliacrilamida-sulfato dodecil-sódico (SDS-PAGE) al 8 % y electrotransferidos a papeles de nitrocelulosa. Se realizaron tiras de este papel, incubándose con sueros, a una dilución de 1:100 durante 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con suero con albúmina bovina al 1 % en solución tampón salino-TRIS, y se incubaron con anticuerpos específicos frente a IgG a IgA humanas, marcados con peroxidasa del rábano picante<sup>21</sup>.

Los fragmentos BP180 NC16 (desde los aminoácidos 490 a 562) y BP180 4575 (desde los aminoácidos

1365 a 1413) se expresaron en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ <sup>7</sup>. La proteína de fusión recombinante glutatión-S-transferasa (GST)-BP180 NC16A purificada se separó en geles de electroforesis de SDS-PAGE al 15 % y se electrotransfirió a papeles de nitrocelulosa. Se realizaron tiras de este papel, incubándose con los sueros de los pacientes, a una dilución de 1:100, a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con suero con albúmina bovina al 1 % en solución tampón salino-TRIS, y se incubaron con anticuerpos específicos frente a IgG e IgA humanas, marcados con peroxidasa del rábano picante.

### Técnica de ELISA para BP180 NC16A

Se realizó determinación de anticuerpos frente al fragmento recombinante NC16A mediante técnica de análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), según está descrita en la literatura médica<sup>22</sup>.

## RESULTADOS

### Inmunofluorescencia y técnica de *salt-split*

A pesar de presentar todos los pacientes lesiones características de PM, sólo en un caso se encontró IFD positiva en la biopsia de la piel (paciente 3). En 2 casos con IFD negativa la IFI fue positiva para IgG, con unos valores de 1:320 y 1:80. En 2 casos la IFI fue positiva mediante *salt-split*. En uno de ellos se observó únicamente positividad para IgG con un título de 1:80, con depósitos lineales en el lado epidérmico (fig. 2). En el otro, se encontró positividad con un título de 1:640 para IgG, y de 1:160 para IgA (fig. 3), con depósitos lineales en el lado epidérmico (tabla 1).

### Immunoblot para BP180 LAD-1, BP180 NC16A, y BP180 4575. ELISA para BP180 NC16A

Tres de los cinco sueros reaccionaron frente a la proteína LAD-1, en 2 casos con IgA, y en otro caso fue IgG, encontrándose una banda de 116 kDa en cada uno de los casos (fig. 4A). Se realizó también inmunoblot frente a NC16A en 3 pacientes, que resultó positivo en 2 casos, en uno con IgG y otro con IgA, con un peso molecular de 38 kDa en ambos (fig. 4B). En los 2 pacientes en los que no se realizó inmunoblot frente a esta última proteína, se realizó técnica de ELISA frente a este mismo fragmento, que resultó negativo en ambos casos. Por último, se llevó a cabo inmunoblot frente a la porción más terminal del BP180 (BP180 4575), encontrando una positividad en 4 pacientes, en dos con IgG, en uno con IgA y en un caso con ambos anticuerpos, observándose una banda de 33 kDa en cada uno de los casos (tabla 1) (fig. 4C).

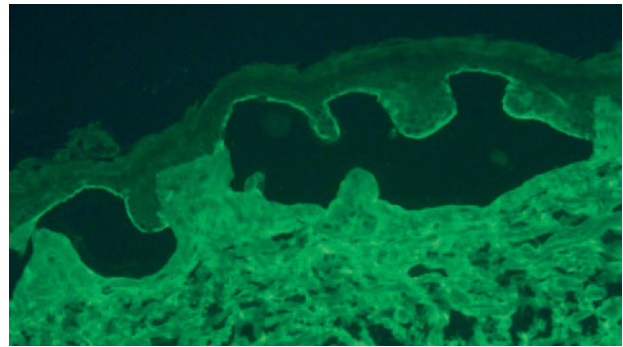


Fig. 2.—Depósitos lineales de autoanticuerpos IgG en la unión dermoepidérmica en el PM. La técnica de *salt-split* se realizó con piel humana en cloruro sódico 1M. Los anticuerpos anti-IgG humana marcan el lado epidérmico de la ampolla formada artificialmente (flechas) (paciente 4) ( $\times 200$ ).

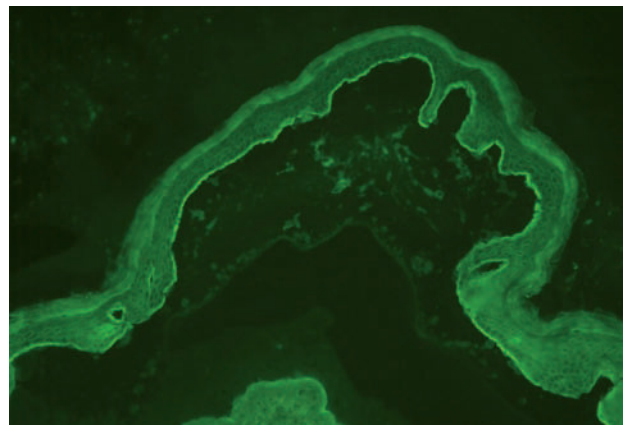


Fig. 3.—Depósitos lineales de autoanticuerpos IgA en la unión dermoepidérmica en el PM. Los anticuerpos anti-IgA humana marcan el lado epidérmico de la ampolla formada artificialmente (flechas) (paciente 5) ( $\times 200$ ).

## DISCUSIÓN

En este estudio se ha caracterizado la respuesta inmunológica frente al BP180 en 5 pacientes con PM. En la primera reunión de consenso sobre PM celebrada en Chicago el año 2002<sup>3</sup>, se estableció que para el diagnóstico de esta enfermedad es necesario, además de las lesiones clínicas características, la presencia de IFD, IFI convencional y técnica de *salt-split* positivas. No obstante, estos hallazgos no se encuentran en todos los casos de PM descritos en la literatura médica<sup>1,23,24</sup>, al igual que ha ocurrido en nuestros casos. Resultados semejantes encontraron Setterfield et al<sup>23,24</sup>, observando que los pacientes en los que la IFD resultó negativa, la IFI en cambio fue positiva, al igual que en nuestros pacientes (tabla 1). Los resultados negativos en la IFD pueden deberse a la dificultad técnica de tomar una biopsia de mucosas, con el riesgo de que resulte un falso negativo. Por este motivo, cuando las lesiones clínicas son características y tenemos resultados negativos en los estudios de inmunofluores-

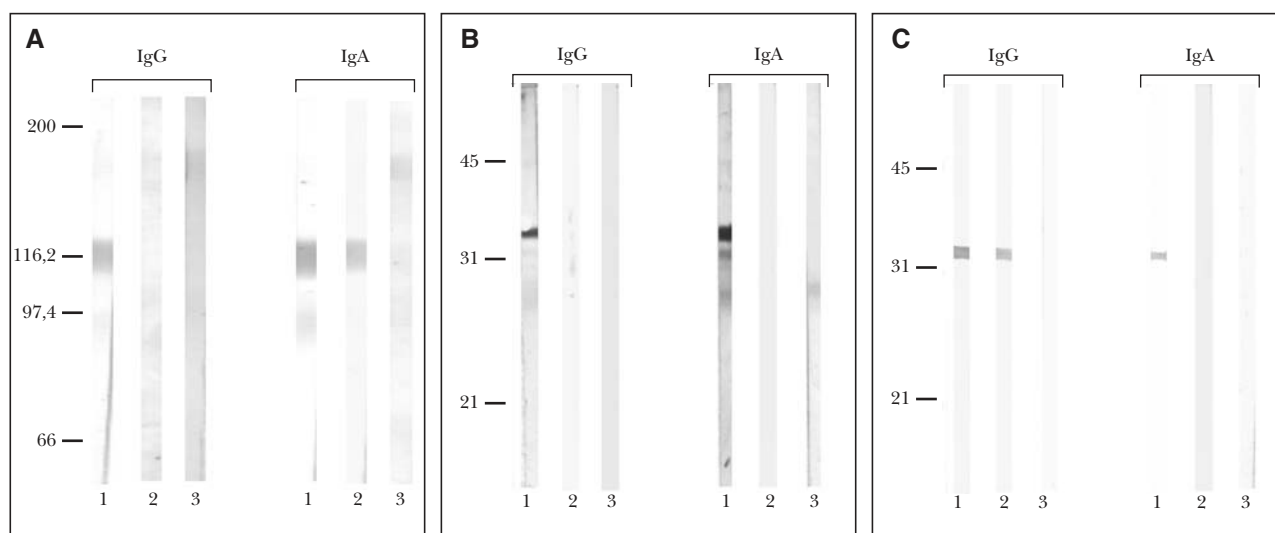


Fig. 4.—A) Inmunoblot para IgA e IgG frente al ectodominio LAD-1 del BP180. Línea 1, con suero control de penfigoide ampuloso; línea 2, con suero de nuestro paciente 3; línea 3, con suero de sujeto sano. El suero de nuestro paciente 3 no mostró reactividad al ectodominio soluble LAD-1 del BP180 para IgG pero sí para IgA. B) Inmunoblot para IgA e IgG frente a BP180 NC16A. Línea 1, con suero control de paciente con penfigoide ampuloso; línea 2, con suero de nuestro paciente 3; línea 3, con suero de sujeto sano. El suero de nuestro paciente 3 no mostró reactividad al dominio NC16A del BP180 para IgG ni para IgA. C) Inmunoblot para IgA e IgG frente a la porción carboxi-(C)-terminal de BP180 (BP180 4575). Línea 1, suero control de paciente con penfigoide cicatrizal; línea 2, con suero de nuestro paciente 3; línea 3, con suero de sujeto sano. El suero de nuestro paciente 3 mostró reactividad al dominio 4575 del BP180 para IgG, pero no para IgA.

encia, son necesarias otras técnicas diagnósticas que permitan argumentar tratamientos inmunosupresores sistémicos, como es el caso de pacientes que presentan afectación ocular, o en aquellos en que existe una afectación importante de otras mucosas<sup>1,25,26</sup>.

Observamos IFI positiva únicamente en 2 casos de los cinco estudiados, resultados semejantes a los observados en la literatura especializada<sup>1,21</sup>, y en el 50 % de los casos mediante la técnica de *salt-split*, al igual que en el estudio de Schmidt et al<sup>21</sup>. En los casos en los que fue positiva, se observó que el depósito asentaba en el lado epidérmico, tal y como se ha descrito cuando está implicado el BP180 y la integrina  $\alpha 6\beta 4$ . Por el contrario, cuando están implicadas la laminina 5 o 6, o el colágeno tipo VII, los depósitos se observan en el lado dérmico<sup>27,28</sup>. En otros estudios, esta positividad fue del 80 % cuando existía afectación de piel y mucosas en el PM, descendiendo al 18 % cuando los pacientes presentaban únicamente afectación de mucosas, y sólo del 7 % en aquellos casos en los que existía afectación de mucosa ocular<sup>29</sup>. La detección de anticuerpos circulantes en este grupo de pacientes puede ofrecer unos resultados más positivos si los sueros se estudian mediante radioinmunoanálisis<sup>30</sup>, o mediante *salt-split* concentrando más los sueros estudiados<sup>31</sup>.

En nuestro estudio se ha estudiado únicamente la autoinmunidad frente al BP180 en pacientes con PM. Este es el antígeno que con más frecuencia se ha implicado en el PM<sup>7</sup> y por este motivo fue el antígeno que estudiamos en nuestros casos. No se descarta que, además y al igual que se ha descrito en la literatura especializada, junto al BP180 puedan existir en nues-

tros pacientes otros antígenos implicados<sup>13,15,16</sup>. Esto puede deberse a que durante el proceso de inflamación quedan expuestos otros antígenos que resultan accesibles al sistema inmunitario. Este fenómeno se ha denominado *epitope spreading* (expansión de epítomos), y se ha demostrado su papel en la progresión de ciertas enfermedades autoinmunes<sup>32,33</sup>.

En todos nuestros casos se produjeron resultados positivos frente a alguno de los fragmentos estudiados de BP180. Resultados semejantes observaron Schumann et al<sup>28</sup> y Balding et al<sup>7</sup>, encontrando anticuerpos frente al BP180 en el 100 y 96 % de sus pacientes con PM, respectivamente, o en el 84 % en el estudio de Schmidt et al<sup>21</sup>.

El dominio NC16A es una región inmunodominante del BP180, donde asientan epítomos implicados en enfermedades como el penfigoide ampuloso (PA), herpes gestacional, liquen plano-penfigoide (LPP) y PM<sup>27,28,34</sup>. En el presente estudio, se observa que en 2 de los 4 pacientes en los que se realiza inmunoblot frente a NC16A, se encontró positividad, uno con IgG y otro con IgA. En un paciente más en el que se realizó la técnica de ELISA, ésta fue negativa. En otros estudios, al igual que en nuestros pacientes, se ha observado que en el 58 % de los pacientes con PM esta determinación fue positiva, principalmente para IgG<sup>21</sup>. Así pues, este dominio del BP180 está implicado en la patogenia de muchas enfermedades autoinmunes ampulosas, interviniendo diferentes epítomos en cada una de ellas<sup>27</sup>.

Se ha descrito también que el antígeno de la enfermedad IgA lineal del adulto (LAD-1) asienta también

en el BP180 y, en concreto, en el ectodominio de esta proteína, con un peso molecular de 120 kDa<sup>35</sup>, o un fragmento suyo de 97 kDa<sup>36</sup>. Los estudios de reactividad frente al fragmento LAD-1 que llevamos a cabo mostraron una positividad del 75 % (3 de los 4 pacientes en los que lo estudiamos), dos de ellos para IgA y uno para IgG. Schmidt et al<sup>21</sup> observaron únicamente anticuerpos frente a este dominio en el 42 % de los pacientes, principalmente de tipo IgA. Si se considera globalmente la positividad frente a NAC16A y frente a LAD-1, tanto para IgG como para IgA, encontramos que el 80 % presentaron autoanticuerpos, al menos frente a uno de los dos fragmentos. Estos hallazgos se corresponden con los observados en otros estudios, donde esta positividad fue del 84 %<sup>21</sup> y 85 %<sup>37</sup>, y demuestra que la sensibilidad de la técnica de inmunoblot es superior a la IFI.

En 4 de los 5 pacientes (80 %) en los que determinamos la presencia de autoanticuerpos frente al fragmento BP180 4575, se observó positividad para IgG o IgA, lo que demuestra una inmunorreactividad alta en nuestros pacientes para este fragmento del BP180. En algunos estudios solamente estos autoanticuerpos se han detectado en el 32 % de los casos con PM<sup>21</sup>. Sólo encontramos un paciente en el que la determinación de anticuerpos frente a LAD-1 y NC16A fueron negativos (paciente 4) (tabla 1), pero que presentaba anticuerpos IgG frente a la región C-terminal (fragmento BP180 4575) del BP180. En el paciente 5 no se encontraron anticuerpos frente a este fragmento, pero en cambio observamos una positividad para BP180 LAD-1. Estos hallazgos demuestran la inmunorreactividad tan distinta que existe frente al BP180 en la patogenia del PM.

Recientemente, Setterfield et al<sup>23</sup>, demostraron que aquellos pacientes con PM que presentaban IFI positiva mediante la técnica de *salt-split*, tanto para IgG como para IgA, tenían un curso clínico peor que cuando solamente uno de los dos autoanticuerpos era positivo. Esta situación únicamente se encontró en un paciente (paciente 5) y su evolución no ha sido peor que la del resto de los pacientes. Por lo tanto, se necesitan más casos para confirmar esta observación.

En resumen, se piensa que la realización de técnicas de biología molecular es de gran ayuda en aquellos pacientes en los que, a pesar de presentar lesiones clínicas características, los estudios histológicos o de inmunofluorescencia no muestran los resultados esperados. Esta información será fundamental antes de establecer tratamientos inmunosupresores sistémicos en una enfermedad que puede producir morbilidad importante en los pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Fleming TE, Korman NJ. Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43:571-91.
- Ahmed AR, Kurgis BS, Rogers III RS. Cicatricial pemphigoid. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24:987-1001.
- Chan LS, Ahmed AR, Anhalt GJ, et al. The first international consensus on mucous membrane pemphigoid. Definition, diagnostic criteria, pathogenic factors, medical treatment, and prognostic indicators. *Arch Dermatol.* 2002;138:370-9.
- Zillikens D, Giudice GJ. BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders or the dermal-epidermal junction. *Arch Dermatol Res.* 1999;291:187-94.
- Labib RS, Anhalt GJ, Patel HP, Mutasim DF, Díaz LA. Molecular heterogeneity of the bullous pemphigoid antigens as detected by immunoblotting. *J Immunol.* 1986;136:1231-5.
- Bernard P, Prost C, Lecerf V, et al. Studies of cicatricial pemphigoid autoantibodies using direct immunoelectron microscopy and immunoblot analysis. *J Invest Dermatol.* 1990;94:630-5.
- Balding SD, Prost C, Díaz LA, et al. Cicatricial pemphigoid autoantibodies react with multiple sites on the BP180 extracellular domain. *J Invest Dermatol.* 1996;106:141-6.
- Bedane C, McMillan JR, Balding SD, et al. Bullous pemphigoid and cicatricial pemphigoid autoantibodies react with ultrastructural separable epitopes on the BP180 ectodomain: evidence that BP180 spans the lamina lucida. *J Invest Dermatol.* 1997;108:901-7.
- Tyagi S, Bhol K, Natarajan K, Livir-Rallatos C, Foster CS, Ahmed AR. Ocular cicatricial pemphigoid antigen: partial sequence and biochemical characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14714-9.
- Bhol KC, Dans MJ, Simmons RK, Foster CS, Giancotti FG, Ahmed AR. The autoantibodies to  $\alpha 6\beta 4$  integrin of patients affected by ocular cicatricial pemphigoid recognize predominantly epitopes within the large cytoplasmic domain of human  $\beta 4$ . *J Immunol.* 2000;165:2824-9.
- Domloge-Hultsch N, Gammon WR, Briggaman RA, Gil SG, Carter WG, Yancey KB. 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;90:1628-33.
- Kirtschig G, Marinkovich M, Burgeson RE, Yancey KB. Anti-basement membrane antibodies in patients with anti-epiligrin cicatricial pemphigoid bind the  $\alpha$  subunit of laminin 5. *J Invest Dermatol.* 1995;105:543-8.
- Chan LS, Majumdar AA, Tran HH, et al. Laminin-6 and laminin-5 are recognized by autoantibodies in a subset of cicatricial pemphigoid. *J Invest Dermatol.* 1997;108:848-53.
- Luke MC, Darling TN, Hsu R, et al. Mucosal morbidity in patients with epidermolysis bullosa acquisita. *Arch Dermatol.* 1999;135:954-9.
- Leverkus M, Bhol K, Hirako Y, et al. Cicatricial pemphigoid with circulating autoantibodies to  $\beta 4$  integrin, bullous pemphigoid 180 and bullous pemphigoid 230. *Br J Dermatol.* 2001;145:998-1004.
- Kawahara Y, Amagai M, Ohata Y, et al. A case of cicatricial pemphigoid with simultaneous IgG autoantibodies against the 180 kD bullous pemphigoid antigen and laminin 5. *J Am Acad Dermatol.* 1998;38:624-7.
- Korman NJ, Watson RD. Immune-mediated subepithelial blistering diseases of the mucous membranes. Improving the detection of circulating autoantibodies by the use of concentrated serum samples. *Arch Dermatol.* 1996;132:1194-8.
- Zillikens D, Herzele K, Georgi M, et al. Autoantibodies in a subgroup of patients with linear IgA diseases react with

- the NC16A domain of BP180. *J Invest Dermatol.* 1999;113:947-53.
19. Georgi M, Scheckenbach C, Kromminga A, et al. Mapping of epitopes on the BP180 ectodomain targeted by IgA and IgG autoantibodies in patients with the lamina lucida-type of linear IgA disease. *Arch Dermatol Res.* 2001;293: 109-14.
  20. Giudice GJ, Emery DJ, Díaz LA. Cloning and primary structural analysis of the bullous pemphigoid autoantigen BP180. *J Invest Dermatol.* 1992;99:243-50.
  21. Schmidt E, Skrobek C, Kromminga A, et al. Cicatricial pemphigoid: IgA and IgG autoantibodies target epitopes on both intra- and extracellular domains of bullous pemphigoid antigen 180. *Br J Dermatol.* 2001;145:778-83.
  22. Ogilvie P, Trautmann A, Dummer E, Rose C, Brocker EB, Zillikens D. Pemphigoid gestationis without blisters. *Hautarzt.* 2000;51:25-30.
  23. Setterfield J, Shirlaw PJ, Kerr-Muir M, et al. Mucous membrane pemphigoid: a dual circulating antibody response with IgG and IgA signifies a more severe and persistent disease. *Br J Dermatol.* 1998;138:602-10.
  24. Setterfield J, Shirlaw PJ, Bhogal BS, Tilling K, Challacombe SJ, Black MM. Cicatricial pemphigoid: serial titres of circulating IgG and IgA ant basement membrane antibodies correlate with disease activity. *Br J Dermatol.* 1999;140:645-50.
  25. Bohn J, Jonsson S, Holst R. Successful treatment of recalcitrant cicatricial pemphigoid with a combination of plasma exchange and cyclophosphamide. *Br J Dermatol.* 1999;141:536-40.
  26. Ahmed AR, Colon JE. Comparison between intravenous immunoglobulin and conventional immunosuppressive therapy regimens in patients with severe oral pemphigoid. *Arch Dermatol.* 2001;137:1181-9.
  27. Zillikens D, Giudice GJ. BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders or the dermal-epidermal junction. *Arch Dermatol Res.* 1999;291:187-94.
  28. Schumann H, Baetge J, Tasanen K, et al. The shed ectodomain of collagen XVII/BP180 is targeted by autoantibodies in different blistering skin diseases. *Am J Pathol.* 2000;156:685-95.
  29. Chan LS, Yancey KB, Hammerberg C, et al. Immune-mediated subepithelial blistering diseases of mucous membranes: pure ocular cicatricial pemphigoid is a unique clinical and immunopathological entity distinct from bullous pemphigoid and other subsets identified by antigenic specificities of autoantibodies. *Arch Dermatol.* 1993;129:448-55.
  30. Ahmed AR, Khan KN, Wells P, Rice BA, Foster CS. Preliminary serological studies comparing immunofluorescence assay with radioimmunoassay. *Curr Eye Res.* 1989;8:1011-9.
  31. Korman NJ, Watson RD. Immune-mediated subepidermal blistering diseases of the mucous membranes: improving the detection of circulating autoantibodies by the use of concentrated serum samples. *Arch Dermatol.* 1996;132:1194-8.
  32. Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:831-6.
  33. Chan LS, Vanderlugt CJ, Hashimoto T, et al. Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol.* 1998;110:103-9.
  34. Murakami H, Nishioka S, Setterfield J, et al. Analysis of antigens targeted by circulating IgG and IgA autoantibodies in 50 patients with cicatricial pemphigoid. *J Dermatol Sci.* 1998;17:39-44.
  35. Pas HH, Kloosterhuis CJ, Heeres K, Van der Meer JB, Jonkman MF. Bullous pemphigoid and linear IgA disease sera recognize a similar 120 kD keratinocyte collagenous glycoprotein with antigenic crossreactivity to BP180. *J Invest Dermatol.* 1997;108:423-9.
  36. Zone JJ, Taylor TB, Meyer LJ, Petersen MJ. The 97 kD linear IgA bullous disease antigen is identical to a portion of the extracellular domain of the 180 kD bullous pemphigoid antigen BPAg2. *J Invest Dermatol.* 1998;110:207-10.
  37. Christophoridis S, Büdinger L, Borradori L, Hunziker T, Merk HF, Hertl M. IgG, IgA and IgE autoantibodies against the ectodomain of BP180 in patients with bullous and cicatricial pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. *Br J Dermatol.* 2000;143:349-55.