Artículo de revisión

Biología de la zona de membrana basal

Biology of the basement membrane

Margarita María Becerra M.

Recibido: Noviembre 23 de 2006
Aceptado: Febrero 14 de 2007

RESUMEN

LAS MEMBRANAS basales son estructuras especializadas ubicadas entre las células y su estroma adyacente o entre diferentes clases de células en distintos tejidos. En la piel existen dos tipos: una vascular y otra que separa epidermis de dermis. Esta última sirve como sustrato para sujeción de células, plantilla para reparación de tejidos, matriz para migración celular y barrera de permeabilidad.

El estudio de la biología de la Zona de Membrana Basal (ZMB) permite un mayor entendimiento de las enfermedades ampollosas hereditarias y autoinmunes.

Palabras clave: membrana basal, anatomía e histología, fisiología, antígeno.

SUMMARY

Basement membranas are specialized structures localized between cells and stromal tissue or between cells. There are two tipes in skin: one between epidermis and dermis and the other in vessels. The former one supports the epithelium, it is a mold for tissue repair, a matrix for cell migration and a permeability barrier.

Studies of basement membrane provide an understanding about congenital or immunological blistering diseases.

Key words: basement membrana, anatomy and histology, physiology, antigen.

Residente de III año Dermatología Universidad del Valle
Correspondencia: Margarita María Becerra, Hospital Universitario del Valle, Calle 5 No. 36-08, Cali, Colombia
Correo electrónico: margarita.becerra@gmail.com

EMBRIOLOGÍA

Durante el desarrollo embrionario temprano la ZMB es plana y contiene una lámina densa y una lámina lúcida identificables. Cerca de las nueve semanas de gestación ya se pueden identificar placas hemidesmosomales con filamentos asociados.[1]

Los queratinocitos, de origen ectodérmico, producen colágeno IV y VII, laminina 5 y 6, heparán sulfato proteoglicanos (HSPG). Los fibroblastos, de origen mesodérmico, producen nidogén, perlecán, colágeno IV y VII.[2]

ULTRAESTRUCTURA

La ZMB es una estructura altamente compleja cuyos componentes han sido objeto de estudio por años con éxito limitado. La microscopía electrónica, los análisis bioquímicos, los estudios de piel separada por cloruro de sodio o intacta por medio de inmunohistoquímica han logrado identificar antígenos que desempeñan una función en la unión dermo-epidérmica.

Actualmente se reconocen cuatro subregiones diferentes (Gráfico 1 y Figura 1)

- Citoesqueleto, placas hemidesmosomales, membrana plasmática de queratinocitos basales.
- Región electrolúcida con filamentos que conectan los HD de los queratinocitos con la lámina densa subyacente: plectina, BPAG 1 y 2, integrina, laminina.
- Región electrodensa o MB propiamente dicha: laminina, entactina, HSPG, colágeno IV.
- Sublámina densa con fibrillas de unión, placas de anclaje y filamentos de dermis papilar: colágeno VII, IV, I, III, elastina, fibulina, linquina, etc.

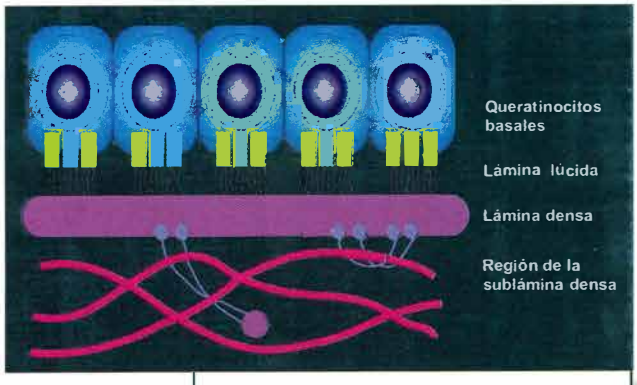
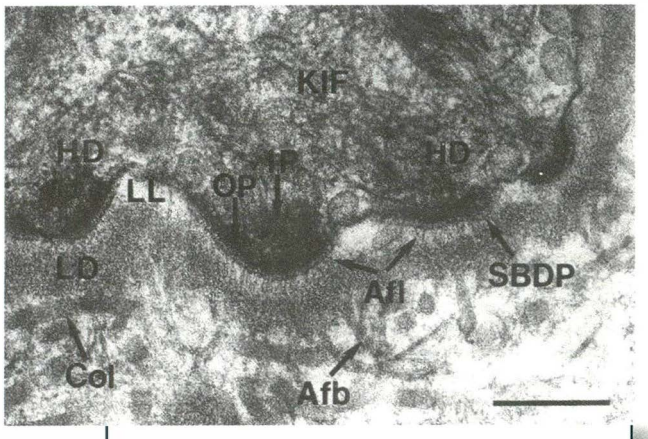


Diagrama que muestra las cuatro subregiones de la ZMB:
Placas de HD en queratinocitos
Lámina lúcida
Lámina densa
Sublámina densa

Gráfico 1



Magnificación de ZMB: microscopía electrónica:
KIF: filamentos de keratina
IP: placa interna
OP: placa externa
HD: hemidesmosoma
LL: lámina lúcida
LD: lámina densa
Afl: filamentos de anclaje
Afb: fibrillas de anclaje
Col: colágeno
SBDP: placa subbasal

Figura 1

Cuando se evalúa la ZMB siguiendo una técnica de alta presión, la lámina densa aparece íntimamente asociada con la superficie celular, sin que exista realmente una lámina lúcida que parece más bien producto de la deshidratación; pero, sin importar cuál es su papel *in vivo*, la evaluación de la lámina lúcida por microscopía electrónica ha permitido la identificación de estructuras específicas que de otra manera habrían sido difíciles de detectar.[3]

PROTEÍNAS DE LA ZONA DE MEMBRANA BASAL

1. BPAG1 – BP230: antígeno (Ag) del penfigoide ampolloso: Es una plaquina de 230 KDa. Promueve la adherencia de los filamentos intermedios del citoesqueleto con las unidades de adhesión (HD).[4] Está codificada por el cromosoma 6p11-12; tiene un dominio central en forma de varilla alfa helicoidal en espiral que contiene residuos de aminoácidos ácidos y básicos con cierta periodicidad. El terminal amino se asocia a un dominio citoplasmático de BPAG2 y B4 integrina. El terminal carboxiglobular se une a filamentos de keratina. (Gráfico 2).

   Los anticuerpos contra este Ag participan en la patogénesis del penfigoide ampolloso junto con los dirigidos contra el BP180.[5]

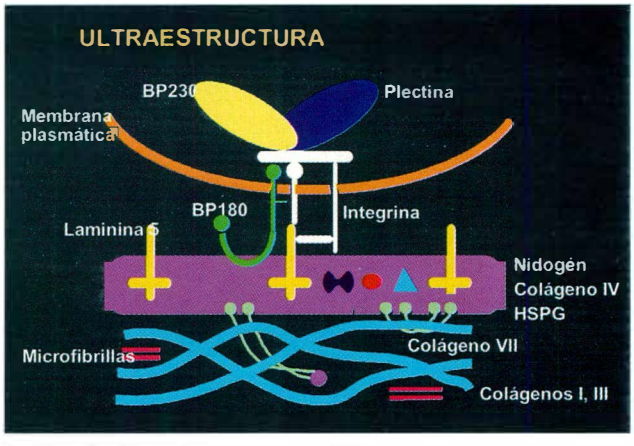


Gráfico 2. Ultraestructura de la ZMB.

2. Plectina: Proteína de la familia plectina de 500 KDa. Codificada por gen ubicado en el cromosoma 8q24-13.

   Su terminal carboxi se une a filamentos intermedios de keratina y el amino tiene dominios que se unen a B4 integrina, BPAG2 y actina.[6]

Las mutaciones genéticas en la plectina llevan a epidermolisis ampollosa simple relacionada con distrofia muscular. Anticuerpos (Ac) dirigidos contra este Ag podrían estar relacionados con el penfigoide ampolloso por el fenómeno de diseminación de epítopes.[7]

3. BPAG2 – BP180: Ag del penfigoide ampolloso 2: Es un colágeno transmembrana y está codificado en el cromosoma 10q.[8]

   El terminal amino es citoplasmático, tiene forma globular y contiene 500 residuos de aminoácidos (aa).

   Se une con P230, integrinas y plectina. La porción extracelular tiene 15 repeticiones ininterrumpidas de secuencias de aa: Gly-X-Y. Estas 15 secciones se denominan Coll y cada una va seguida de un número. El Coll15 alcanza la lámina lúcida, se inserta en la densa donde contacta la laminina y el terminal carboxi hace un bucle hacia atrás hasta alcanzar de nuevo la lámina lúcida. Esta disposición N terminal citoplasmática y C terminal ectodominio extracelular hace que esta proteína sea una proteína transmembrana tipo II. (Gráfico 3).[9]

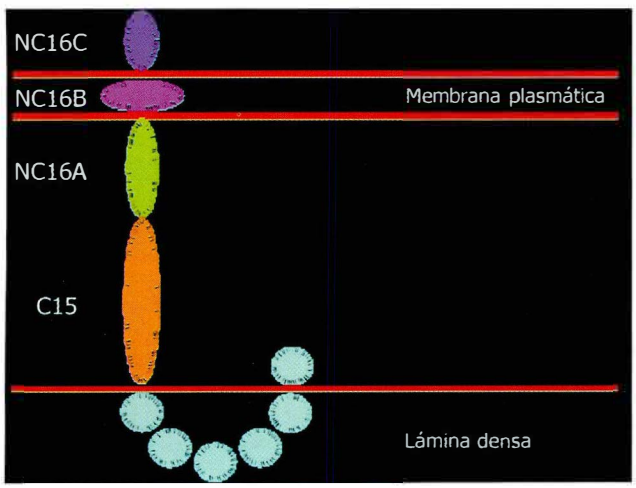


Gráfico 3. BP180: proteína transmembrana tipo II.

El sitio más antigénico es el primer segmento extracelular denominado NC16A, tiene 76 residuos de aa y forma 6 epítopes definidos que se nombran MCW 0, MCW 1 hasta MCW 5. Existen diferencias notables entre la secuencia que define NC16 en el ratón y en el hombre, y este es el motivo por el cual fue difícil durante mucho tiempo demostrar la relevancia de los anticuerpos contra BP180 en el penfigoide ampolloso. En 1993 se logró inyectar a un ratón recién nacido los anticuerpos de un conejo que había sido inmunizado previamente con BP180 murino: ¡la piel del ratón desarrolló penfigoide ampolloso!

Además del penfigoide ampolloso, el BP180 está implicado como Ag en otras patologías ampollosas como penfigoide gestacional, penfigoide cicatrizal, dermatitis ampollosa IgA lineal, liquen plano penfigoide. Congénitamente puede haber una pérdida completa de la proteína, lo que lleva a la expresión de una epidermolisis ampollosa atrófica generalizada no Herlitz.[10]

4. Integrinas: son heterodímeros AB transmembrana que funcionan como receptores que modulan la adhesión celular y la transducción de señales.

   Tienen un dominio citoplasmático generalmente corto, otro transmembrana que es hidrofóbico y otro extracelular que alterna A y B para cambiar la especificidad de unión del ligando.[16]

   - A6B4: B4 integrina es necesaria para la organización de plectina, BP180 y BP230.[17,18] Mutaciones en los genes A6 o B4 llevan a epidermolisis ampollosa de unión con atresia pilórica.[19] Ac contra B4 producen una variante clínica específica del penfigoide cicatrizal.[20]
   - A3B1: no influye en la unión de los HD pero sí proporciona señales claves en la regulación de la unión del citoesqueleto, en la función de A6B4 y en el mantenimiento de la MB. Ratones sin A3 presentan ampollamiento.

5. Lamininas: Son proteínas heterodiméricas de estructura semirrígida que constituyen un componente estructural de matriz extracelular y/o MB y sirven como puentes que se unen a integrinas proporcionando señales claves. Cada laminina tiene tres subunidades: Alfa: de la cual hay cinco tipos; Beta: con tres tipos diferentes; Gamma: tres tipos. Los diferentes tipos de subunidades se pueden mezclar y así determinan 15 isoformas con ubicaciones titulares específicas y funciones diferentes, pero todas ellas con apariencia de cruz: con un brazo largo de125 nm y 3 cortos de hasta 80 nm, y con dominios globulares en cada extremo.[21]

   - Laminina 1: 800 KDa. A1B1G1. La subunidad A1 se une con el nidogén, el cual a su vez se conecta con la red de colágeno IV y HSPG. Esta laminina está en poca cantidad en la MB epidérmica y en cambio es abundante en las MB microvasculares de la piel.[22]

- Laminina 5: 165 KDa. A3B3G2. Conocida como niceina, kalinina, epiligrina. La laminina 5 se une con el colágeno VII y con las integrinas pero carece de la subunidad A1 que le permita unirse con nidogén y a su vez al colágeno IV y HSPG. Así, la laminina 5 se une en su extremo amino covalentemente con los puntos de bifurcación de los brazos cortos de las lamininas 6 y 7 que sí tienen A1.[23]

Cuando existe una alteración en los genes que codifican la laminina 5 (LAMA3, LAMB3, LAMC2) se produce ampollamiento en el contexto de una epidermólisis ampollosa de unión Herlitz.[24] Si hay Ac contra la subunidad A de esta laminina los pacientes presentan un cuadro de penfigoide cicatrizal con ampollas principalmente en mucosas.

6. Colágeno IV: Es una macromolécula específica de las MB.[25] Su estructura es muy similar a la del procolágeno: una forma intracelular que retiene los dominios globulares en sus terminaciones amino y carboxilo. Tiene tres subunidades: A1, A2, fijas en todas las MB y una tercera subunidad que puede variar y ser A3, 4 ó 5 si hablamos del glomérulo o A5 y 6 si hablamos de la epidermis. La triple hélice que se forma de 330 nm tiene una estructura extendida algo rígida, resistente a las proteasas ordinarias (tripsina) y sensible a las especializadas (colagenasas). La estabilidad de esta hélice depende de las secuencias de aa que se repiten : Gly-X-Y. Existen, sin embargo, discontinuidades: glicina no siempre está en cada tercer lugar, creando así dominios no helicoidales que aumentan la flexibilidad.[26]

   Woodley y Chen[27] describieron la macromolécula de colágeno IV como un bastón de jockey, donde la pala del bastón corresponde al dominio amino 7S; el mango, a la porción helicoidal triple y el asa, al dominio globular corto C1 en el terminal carboxilo. Si se unen cuatro dominios 7S se crea un colágeno IV en forma de araña con mangos orientados perpendicularmente. Si se polimerizan por enlaces covalentes las arañas en los lugares contiguos a los extremos carboxilo, se forma la retícula de colágeno.

   En el síndrome de Alpont existe una mutación en el gen COL4A5 que codifica A5 (transtornos en la audición, anomalías oculares, hematuria, IR). En el síndrome Good Pasteure hay autoanticuerpos dirigidos contra el dominio NC1 de A3 (hemorragia pulmonar y GMN).[28,29]

7. Nidogén o entactina: Es una glicoproteína de 150 KDa. Está localizada en la lámina densa donde se une a redes de colágeno IV, HSPG y a varias isoformas de lamininas que tienen A1 como la laminina 6, 7, 1 y 10.

   Hasta el momento no hay una enfermedad que se haya relacionado directamente con el nidogén. Hasta donde se sabe, ratones que carecen de esta proteína no padecen ninguna anomalía evidente, hecho que se ha intentado explicar por el reciente descubrimiento de nidogén 2, glicoproteína que se asemeja a la clásica en un 45% y que podría estar compensando la falta de esta última.[30]

8. Heparán sulfato proteoglicanos (HSPG) o perlecan: Proteína central revestida de glucosaminoglicanos (sulfato de condroitín y queratán), la mayor parte con ácido hialurónico como eje central (Gráfico 4). Su función es contribuir a la matriz global de la MB y determinar en gran medida la permeabilidad de ésta ya que su alto contenido de sulfatos los carga negativamente y los vuelve hidrófilos.

   Las distintas membranas basales tienen HSPG de configuraciones y tipos diferentes.

   Ratones sin perlecan exhiben membranas deterioradas en regiones sometidas a estrés mecánico como miocardio y piel, resultando en anomalías cardíacas, ampollamiento y letalidad embrionaria.[2]

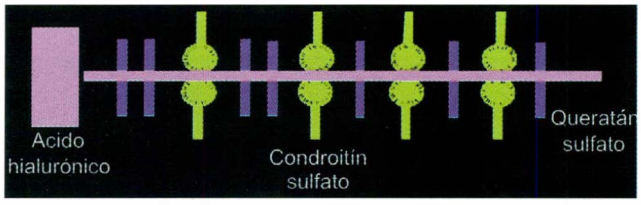


Gráfico 4. Disposición en escobillón de HSPG.

9. Colágeno VII: Está formado por tres cadenas A idénticas de 290 KDa cada una.[31]

   En el extremo amino tiene un dominio NC globular 1 y en el carboxi un dominio más pequeño NC2. Por sus colas NC2 se pueden unir moléculas individuales en un patrón antiparalelo (Gráfico 5) y luego, por proteolisis, se liberan estos dominios globulares quedando, pues, una molécula larga como una varilla central con NC1 en cada extremo. Esta estructura dimérica se une lateralmente con otras iguales y forma fascículos que reciben el nombre de fibrillas de unión. Los dominios NC1 quedan libres para ligarse a otros elementos de la matriz de la MB en la lámina densa.

El colágeno VII está limitado a los epitelios escamosos estratificados y allí se ubica en la lámina densa, desde donde puede formar un bucle hacia atrás que entra en la sublámina densa, bien sea para regresar a la lámina densa o para profundizarse más en ella y conectarse con las llamadas placas de unión, que son realmente porciones de lámina densa que han "caído" como consecuencia de la remodelación periódica de la MB.[32]

El gen que codifica el colágeno VII es COL7A1 ubicado en el brazo corto del cromosoma 3. Anomalías en él llevan a epidermólisis ampollosa distrófica que puede ser recesiva o dominante. En el primer caso, los portadores sanos sólo tendrán un alelo mutante que es silencioso y del alelo normal se derivarán cantidades suficientes de colágeno VII; mientras que los homocigotos tendrán dos alelos mutantes y por lo tanto no habrá fibrillas en la membrana basal. En la EAD dominante el alelo mutado tiene un efecto negativo sobre la proteína del alelo normal, y por tanto las fibrillas tendrán un aspecto anormal o estarán disminuidas en las MB.

Anticuerpos contra el dominio NC1 del colágeno VII producen el cuadro clínico de una epidermolisis ampollosa adquirida con ampollamiento generalmente resultante de trauma mecánico. En el lupus ampolloso se observan de igual forma Ac IgG circulantes contra NC1 de colágeno VII.[33]

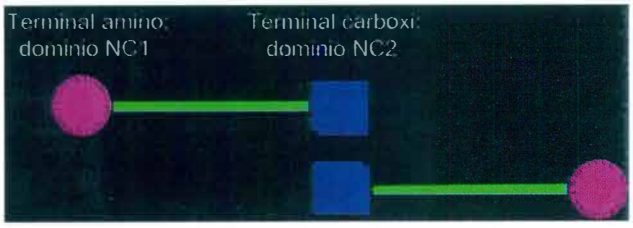


Gráfico 5. Moléculas individuales de colágeno se unen por sus dominios NC2.

10. Microfibrillas: Las fibras elásticas tienen dos componentes: uno amorfo (elastina) y otro microfibrilar (fibrilin, fibulina, glicoproteínas). En la dermis papilar los elementos microfibrilares se insertan en forma vertical dentro de la lámina densa y se llaman fibras de oxilatán (ausencia de componente amorfo). En su cara inferior estas fibras se unen a los elementos que se orientan paralelo a la superficie de la piel y contienen algún componente amorfo. Se llaman elaunina. Más profundamente hay elementos microfibrilares asociados con cantidades sustanciales de componente amorfo: fibras elásticas maduras.

Parece existir una proteína llamada linquina que une estos haces microfibrilares con colágeno VII, I y III.

MEMBRANA BASAL EPIDÉRMICA EN ENFERMEDADES AMPOLLOSAS

La formación de ampollas en la ZMB se puede dar por mutaciones genéticas en una de las proteínas estructurales de la piel o por posibles respuestas de tipo autoinmune a epítopes relevantes de las mismas moléculas. (Gráfico 6).



Gráfico 6. Mutaciones genéticas o pérdida de autotolerancia pueden llevar a enfermedades ampollosas.

- Enfermedades genéticas: Este grupo comprende básicamente las epidermolisis ampollosas bien sea simple, de unión o distrófica. En el Gráfico 7 se muestra la plectina como clave en la EAS con distrofia muscular, la integrina A6B4 en la EAU con atresia pilórica, el BP180 y la laminina 5 en la EAU no Herlitz, la laminina 5 en la EAU Herlitz, y el colágeno VII en las formas dominante y recesiva de la EAD.

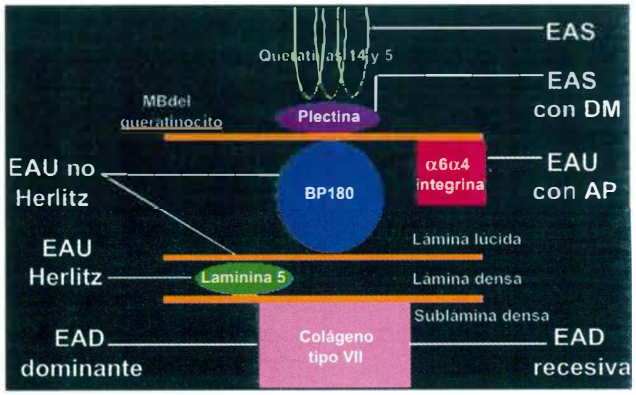
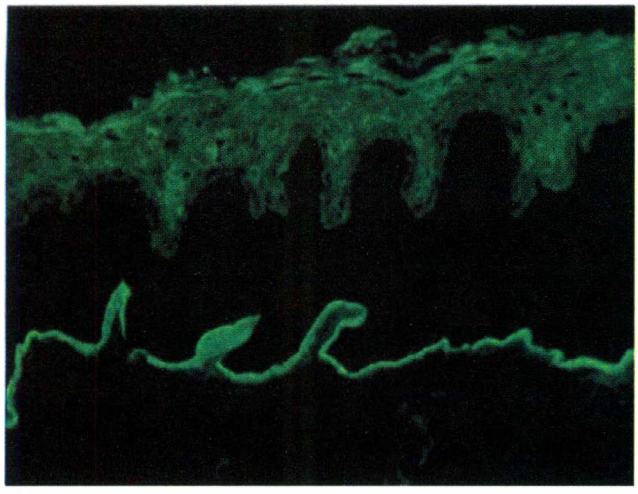


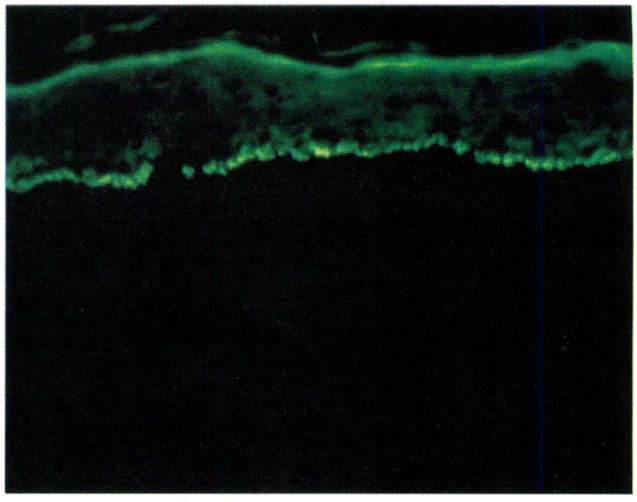
Gráfico 7. Enfermedades ampollosas de la unión dermoepidérmica determinadas genéticamente

- Enfermedades autoinmunes: Existen dificultades para su clasificación, ya que frecuentemente hay una superposición clínica entre ellas y, además, la histología e inmunofluorescencia no son siempre predictivas: hay Ag comunes a varias enfermedades y pueden ser varios los epítopes antigénicos en una sola enfermedad.

Con la técnica denominada inmunofluorescencia con piel escindida en cloruro de sodio, que consiste en la ruptura de la piel a través de lámina lúcida por medio de la inmersión del tejido cutáneo en 1M NaCl por 48 horas a 4 grados centígrados, se ha logrado un avance valioso en el estudio de las diferentes enfermedades ampollosas. Permite, a través de un fragmento de piel perilesional, estudiar por IFD dónde se encuentran los inmunorreactivos *in situ*; o a través de IFI de piel sana, verificar si el paciente tiene Ac circulantes. Ag como BP180, 230, B4 integrina quedan ubicados en la parte superior de la ampolla que se forma al escindir la piel (techo), y laminina 5 y colágeno VII permanecen en el piso de la misma. En la parte A de la Figura 2 se observa una IF en piel escindida que muestra Ac unidos al techo de la ampolla: corresponde a un paciente con penfigoide ampolloso (BP180). En la parte B se ve el caso de un paciente con epidermolisis ampollosa adquirida: tiene una IFI con Ac en el piso de la ampolla (colágeno VII).



A Penfigoide ampolloso



B Epidermolisis ampollosa adquirida

Figura 2. Inmunofluorescencias de piel escindida en cloruro de sodio

BIBLIOGRAFÍA

1. Burgeson RE, Christiano AM. The dermal-epidermal junction. Curr Opin Cell Biol. 1997; 9 (5): 651-58.
2. Yancey K, Allen D. La biología de la membrana basal. En Bolognia J, Jorizzo J Dermatología. 1 edición en español. Madrid: Elsevier; 2004. 435-48.
3. Goldberg M, Escaig-Haye F. Is the lamina lucida of the basement membrane a fixation artifact? Eur J Cell Biol. 1986; 42 (2): 365-58.
4. Thoma-Uszynski S, Uter W, Schwietzke S, Hofmann SC, Hunziker T, Bernard P et al. BP230 and BP180 specific autoantibodies in bullous pemphigoid. J Invest Dermatol 2004; 122 (6): 1413- 22.
5. Kiss M, Husz S, Janossy T, Marczinovits I, Molnar J, Korom I et al. Experimental bullous pemphigoid generated in mice with an antigenic epitope of the human hemidesmosomal protein BP230. J Autoinmun 2005; 24 (1): 1-10.
6. Wiche G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. J Cell Sci. 1998; 111 (17): 2477-86.

7. Laffitte E, Favre B, Fontao L, Riou S, Jaunin F, Tamm K et al. Plectin, an inusual target antigen in bullous pemphigoid. Br J of Dermatol 2001; 144 (1): 136-38.
8. Zillikens D. BP180 as the common autoantigen in blistering diseases with different clinical phenotypes. Keio J Medic 2002; 51 (1): 21-28.
9. Hopkinson S, Baker S, Jones J. Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen: identification of functionally important sequences within the BP180 molecule and evidence of an interaction between BP180 and a6 integrin. J Cell Biol 1995; 130 (1): 117-25.
10. Zillikens D, Giudice G. BP180/type XVII collagen: its role in acquired and inherited disorders to the dermal-epidermal junction. Arch Dermatol 1999; 291 (4): 187-94.
11. Mariotti F, Grosso F, Terracine M, Ruffelli M, Cordiali-Fei P, Sera F et al. Development of a novel ELISA system for detection of anti BP180 IgG and characterization of autoantibody profile in bullous pemphigoid patients. Br J Dermatol 2004; 151(5): 1004-1010.
12. Di Zenzo G, Grosso F, Terracine M, Mariotti F, De Pita O, Owaribe K et al. Characterization of the anti BP180 autoantibody reactive profile and epitope mapping in bullous pemphigoid patients. J Invest Dermatol 2004; 122 (1): 103-11.
13. Lui Z. Bullous pemphigoid: using animal models to study the immunopathology. J Invest Dermatol Symp Proc 2004; 9: 41-46.
14. Metz B, Ruggeri S, Hsu S, Reed JA, Ghohestani AS, Uitto J. Linear IgA dermatosis with IgA and IgG autoantibodies to the 180 KDa bullous pemphigoid antigen: evidence for a distinct subtype. Int J Dermatol 2004; 43 (6): 443-46.
15. Fontao L, Tasanen K, Huber M, Hohl D, Koster J, Bruckner-Tuderman L et al. Molecular consequences of deletion of the cytoplasmic domain of bullous pemphigoid 180 in a patient with predominant features of epidermolysis bullosa simplex. J Invest Dermatol 2004; 122 (1): 65-72.
16. Ruoslahti. Integrins. J Clin Invest. 1991; 87 (1): 1-5.
17. Schaapveld R, Borradori L, Geerts D, van Leusden MR, Kuikman I, Nievers MG et al. Hemidesmosome formation is iniciated by B4 integrin subunit, requires complex formation of B4 and HD 1/plectin, and involves a direct interation between B4 and the bullous pemphigoid antigen 180. J Cell Biol 1998; 142 (1): 271-84.
18. Hopkinson S, Baker S, Jones J. Molecular genetic studies of a human epidermal autoantigen; identification of functionally important sequences with the BP180 molecule and evidence for an interaction between BP180 and integrin. J Cell Biol. 1995; 130 (1): 117-25.
19. Ruzzi L, Gagnoux L, Pinola M, Belli S, Menequzzi G, D'Allesio M et al. A homozygous mutation in the integrin a6 gene in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. J Clin Invest. 1997; 99 (12): 2826-31.
20. Bickle K, Roark T, Hsu S. Autoimmune bullous dermatoses: a review. Am Fam Physician 2002; 65 (9): 1861-70.
21. Aumailley M, Rousselle P. Laminins of the dermo-epidermal junction. Matrix Biol. 1999; 18 (1): 19-28.
22. Yancey KB. Adhesion molecules. II: Interactions of keratinocytes with epidermal basement membrane. J Invest Dermatol 1995; 104: 1008-14.
23. Rousselle P, Keene D, Ruggiero F, Champliaud MF, Rest M, Burgerson RE. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. J Cell Biol. 1997; 138 (3): 719-28.
24. Eady R, Mc Grafth J, Mc Millan J. Ultraestructural clues to genetic disorders of skin: the dermal-epidermal junction. J Invest Dermatol 1994; 103 (5): 135-85.
25. Ghohestani R, Li K, Rousselle P. Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. Clin Dermatol 2001; 19 (5): 551-62.
26. Bruckner-Tuderman L. Membranas basales. En: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI editors. Fitzpatrick's: Dermatología en Medicina General. 6 edición. New York: McGraw-Hill; 2003. 212-21.
27. Woodley DT, Chen M. The basement membrane zone. En: Freinkel RK, Woodley DT editors. The Biology of the Skin. New York: Pathenon Publishing; 2001. 133-52.
28. Barker D, Hostikka S, Zhou J. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. Science. 1990; 248 (4960): 1224-7.
29. Turner N, Mason P, Brown R, Fox M, Povey S, ReesA et al. Molecular cloning of the human Goodpasteure antigen demonstrates it to be the alfa 3 chain of type IV collagen. J Clin Invest 1992; 89 (2): 592-601.
30. Kohfeldt E, Sasaki T, Gohring W, Timpl R. Nidogen 2: a new basement membrane protein with diverse biding properties. J Mol Biol. 1998; 282 (1): 99-109.
31. Ghohestani R, Rousselle P, Uitto J. Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. Clin Dermatol 2001; 19 (5): 551-62.
32. Burgeson R. Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol. 1993; 101(3): 252-5.
33. Díaz L, Giudice G. End of the century overview of skin blisters. Arch Dermatol 2000; 136 (1): 106-12.
34. Wong S, Chua S. Spectrum of subepidermal immunobullous disorders seen at the National Skin Center, Singapure: a 2 years review. Br J Dermatol 2002; 147 (3): 476-80.