

## Evaluación inmunopatológica del pénfigo foliáceo endémico luego de seis meses de tratamiento: seguimiento de cinco casos de la Amazonía peruana

*Evaluation of the immunopathologic response in patients with endemic pemphigus foliaceus after six months of systemic corticosteroid therapy*

Willy Ramos,<sup>1</sup> Carlos Galarza,<sup>1</sup> Ericson Gutierrez,<sup>1</sup> Gerardo Jiménez,<sup>2</sup> Gerardo Ronceros,<sup>1</sup> Isabel Rojas,<sup>3</sup> Mayte Sánchez,<sup>4</sup> Jorge Hanco,<sup>4</sup> Alex Ortega-Loayza<sup>5</sup>

### RESUMEN

**OBJETIVO.** Describir la respuesta inmunopatológica de cinco pacientes peruanos con pénfigo foliáceo endémico antes y seis meses después de la terapia con corticosteroides sistémicos.

**MATERIAL Y MÉTODOS.** Estudio descriptivo de tipo serie de casos. Los pacientes fueron sometidos a examen físico, se obtuvo datos clínicos y, luego, una muestra de sangre, a la que se le realizó inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se usó como sustratos esófago de mono y piel humana normal, Elisa IgM antidesmogleína 1, Elisa IgG antidesmogleína 1 (total y subclases), inmunoprecipitación (IP) antidesmogleína 1 y antidesmogleína 3. Los pacientes recibieron tratamiento con corticosteroides sistémicos por seis meses obteniéndose nuevamente una muestra de sangre para estudiar su evolución inmunopatológica.

**RESULTADOS.** Al examen físico inicial tres pacientes presentaban la forma clínica generalizada y dos, la localizada; a los seis meses de tratamiento solo un paciente presentaba lesiones activas debido a que su tratamiento había sido irregular. La IgM anti-DSG-1 no mostró variaciones importantes manteniéndose positiva en un paciente y haciéndose positiva en un paciente inicialmente negativo. El Elisa para anticuerpos IgG4 se redujo notablemente en todos los pacientes incluidos los que tenían tratamiento irregular. De los dos pacientes que presentaban anticuerpos anti-DSG-3 (Elisa) uno redujo sus valores índices y el otro se hizo negativo; mientras que un paciente inicialmente negativo desarrolló al final del tratamiento anti-DSG-3.

**CONCLUSIÓN.** La respuesta antidesmogleína 1 IgG total e IgG4 así como la respuesta antidesmogleína 3 muestran reducción de sus valores índices con tendencia a la negativización luego de seis meses de tratamiento lo cual es evidenciado también con la IFI. La respuesta IgM antidesmogleína 1 no mostró variaciones importantes a pesar del tratamiento.

**PALABRAS CLAVE.** Pénfigo foliáceo endémico, inmunopatología, seguimiento inmunológico.

### ABSTRACT

**AIM.** To describe the immunopathologic response in five patients with endemic pemphigus foliaceus (EPF) before and after six months of therapy with systemic corticosteroids.

**MATERIAL AND METHODS.** Case series study. Each patient was examined by a dermatologist who gathered the clinical information. A serum sample was obtained for indirect immunofluorescence (IFI) with

monkey esophagous (ME) and normal human skin (NHS) as substrates. Also, Elisa for IgM and IgG (total and subclasses) anti desmoglein 1 antibodies and immunoprecipitation (IP) for anti desmoglein 1 and 3 were carried out. All the patients received treatment with systemic corticosteroids for six months and blood serum was drawn afterwards to assess the immunopathologic response.

**RESULTS.** On physical exam, 3 patients had the generalized form of EPF, 2 patients had the localized form and one patient had some active lesions because he was not compliant with the therapy. Anti-IgM desmoglein 1 values were decreased in 4 patients but a couple of the values remained unchanged or even increased because they were not completely compliant with the treatment. IgG4 desmoglein 1 antibodies were notably decreased in all

1. Instituto de Investigaciones Clínicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
2. Hospital Regional de Pucallpa. Ucayali, Perú.
3. Puesto de Salud de Pueblo Libre. Diresa Ucayali. Ucayali, Perú.
4. Facultad de Medicina. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú.
5. Departamento de Dermatología. Virginia Commonwealth University. EE UU.

the patients. A couple of patients who had antibodies against desmoglein 3 decreased, being one of them negative. One of the patients was initially negative for antibodies against desmoglein 3 but later on, he developed anti desmoglein 3 antibodies.

**CONCLUSION.** The immunological response against IgG and IgG4 desmoglein 1 as well as against desmoglein 3 were reduced after the treatment and showed a tendency to become negative. This was correlated with IFI values as well. IgM desmoglein antibodies did not show important variations despite of the corticosteroid treatment.

**KEY WORDS.** Endemic pemphigus foliaceus, immunopathology.

## INTRODUCCIÓN

El pénfigo foliáceo endémico (PFE) junto con el pénfigo vulgar endémico (PVE) constituyen las únicas enfermedades autoinmunes endémicas descritas a nivel mundial.<sup>1-4</sup> Se ha demostrado la existencia de casos en Brasil, Colombia, Paraguay, Venezuela y Túnez.<sup>1-8</sup> Desde la década de 1920 se han reportado casos de PFE en nuestro país los cuales se han limitado a personas residentes en comunidades de bajas condiciones socioeconómicas o personas que por motivos ocupacionales se encontraban expuestas a la ecología y factores ambientales propios de las áreas endémicas de la Amazonía, particularmente insectos hematófagos.<sup>1</sup>

La primera publicación científica fue realizada en 1976 por Heimgartner y Heimgartner<sup>9</sup> la cual confirmaba las observaciones y comunicaciones orales de la existencia de PFE en el Perú. A partir de allí, diversos estudios han caracterizado la epidemiología y clínica de la enfermedad mostrando que en nuestro país está se encuentra concentrada principalmente en áreas endémicas de la Amazonía de Ucayali y Loreto, que afecta a niños y adultos jóvenes sin predominio claro por sexo, siendo más frecuente la forma clínica generalizada.<sup>10-13</sup> La caracterización ultraestructural basada en los hallazgos a la microscopía electrónica de transmisión de la piel de los pacientes con PFE se realizó el año 2008 la cual mostró alteraciones no solo a nivel subcorneal sino en todas las capas de la epidermis.<sup>14</sup>

La caracterización inmunopatológica de los pacientes se completó en el período 2005-2009, mediante el uso de pruebas de IFI, Elisa e inmunoprecipitación.<sup>15</sup> Hasta ese momento no se contaba con datos de la evolución inmunopatológica de la enfermedad en los pacientes peruanos una vez que se había instalado el tratamiento, particularmente de la respuesta IgM antidesmogleína 1, que había publicado por primera vez en el año 2005.<sup>16</sup>

El presente trabajo tiene como objetivo describir la respuesta inmunopatológica de cinco pacientes peruanos con PFE antes y después de seis meses de terapia con corticosteroides sistémicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Tipo de estudio y participantes

Estudio longitudinal. Se incluyó en el estudio a cinco pacientes con pénfigo foliáceo endémico que cumplieren con los criterios epidemiológico, clínico, histopatológico e inmunológico. Dichos pacientes formaban parte de la cohorte del estudio *Endemic Pemphigus in Peruvian Amazonia*. Se excluyó a los que no aceptasen participar voluntariamente del estudio.

### Técnica y método

Los pacientes previo consentimiento informado fueron sometidos a examen físico obteniéndose datos epidemiológicos y clínicos, luego se obtuvo una muestra de sangre a la que se le realizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando como sustratos esófago de mono (ME) y piel humana normal (NHS), Elisa IgM antidesmogleína 1, Elisa IgG antidesmogleína 1 (total y subclases), inmunoprecipitación (IP) antidesmogleína 1 y antidesmogleína 3. Los pacientes recibieron tratamiento con corticosteroides sistémicos por seis meses realizándose examen clínico y obteniéndose nuevamente una muestra de sangre para estudiar su evolución inmunopatológica la cual fue documentada en un instrumento de recolección de datos validado en un estudio previo. Las muestras de sangre fueron almacenadas a  $-20^{\circ}$  C en el instituto de Investigaciones Clínicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y transportadas según protocolo a los Laboratorios de Investigación Dermatológica de la Universidad de Carolina del Norte de Chapel Hill (EE UU) donde se realizó el procesamiento y lectura de los estudios inmunopatológicos.

### Inmunofluorescencia indirecta

Se realizó de acuerdo a protocolo usando dos sustratos para aumentar la sensibilidad de la prueba: piel humana normal (NHS) y esófago de mono (ME).

### Estudios con detección de desmogleína 1 y 3

Tanto para los estudios de Elisa como inmunoprecipitación se generó formas recombinantes de desmogleína 1 y desmogleína 3 conteniendo la totalidad del dominio extracelular y un C-terminal His-tag los cuales fueron generados en un sistema baculovirus y purificados mediante cromatografía de afinidad a níquel (Ishi, 1997).<sup>17</sup>

### Inmunoprecipitación

La IP se realizó de acuerdo al protocolo empleado en estudios previos<sup>18</sup> y fue pareada con Immunoblot.

### Immunoabsorción ligada a enzimas (Elisa)

Se realizaron los siguientes procedimientos:

- Dilución e incubación a 4 °C de sueros problema y control.
- Añadido de anticuerpo secundario anti-IgG humana de origen animal (ratón) conjugada con peroxidasa (Zymed, Ca, EE UU).
- Cuantificación de la reacción antígeno anticuerpo luego de lavado con o-fenilendiamina (Sigma, Mo, EE UU) disuelta en buffer fosfato/citrato con perborato de sodio hasta que el control positivo en cada test marcó 0,30 unidades de densidad óptica o en caso contrario durante 30 minutos.
- Detención de la reacción con 4 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Para fijar los valores de corte se realizó la estandarización de la prueba con muestras de sangre de sujetos sanos y pacientes con pénfigo foliáceo endémico de Brasil, EE UU y Perú usando el análisis de características operativas del receptor (ROC). Los resultados fueron expresados como valores índice de acuerdo a lo reportado por Amagai y col. en el año 1999:<sup>19</sup>

Cálculo del valor índice para Elisa:

$$\text{Valor índice} = \frac{(\text{DO muestra evaluada}) - (\text{DO control negativo}) \times 100}{(\text{DO control positivo}) - (\text{DO control negativo})}$$

DO = Densidad óptica.

Como control positivo para anticuerpos antidesmogleína 1 se empleó suero de pacientes con PFE mientras que para anticuerpos antidesmogleína 3 se empleó suero de pacientes con PVE. Para la IgG total antidesmogleína 1 y antidesmogleína 3, se consideró (+) cuando el valor índice se situó por encima de 20. Para la IgG1, se consideró (+) cuando el valor índice fue superior 12; para la IgG2, cuando el valor índice fue mayor de 13; para IgG3, cuando el valor índice fue superior a 6 y para IgG4, cuando fue superior a 10. Dichos valores han sido estandarizados en un estudio previo.<sup>20</sup>

### Aspectos éticos

Los pacientes fueron informados del estudio y de los riesgos de la obtención de una muestra de sangre para lo cual dieron su consentimiento informado. Los participantes se beneficiaron de tratamiento gratuito, de la evaluación de un Dermatólogo con seguimiento periódico y de la realización de estudios inmunológicos para el seguimiento de su enfermedad. Se respetó los derechos de los pacientes de acuerdo a lo estipulado en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial.

### Análisis estadístico

El procesamiento estadístico se realizó con el programa SPSS versión 20.0 para Windows. Se realizó análisis descriptivo obteniéndose frecuencias, porcentajes, medidas de tendencia central y de dispersión relativa.

### RESULTADOS

La edad promedio de los pacientes con PFE fue de 21,8 ± 8,2 años, la cual varió entre los 15 y los 35 años; cuatro correspondieron al sexo masculino y uno al sexo femenino. Al examen físico inicial, tres presentaban la forma clínica generalizada y dos, la localizada. Al sexto mes, tres habían presentado tratamiento regular de acuerdo a la prescripción médica y dos, tratamiento irregular; cuatro presentaban remisión de las lesiones y uno, lesiones activas.

La IFI mostró que cuatro de los cinco pacientes redujeron notablemente sus títulos o se hicieron negativos dependiendo de si se usó como sustrato ME o NHS, el único paciente que no redujo sus títulos había presentado tratamiento irregular. La IFI NHS mostró mayor capacidad para detectar anticuerpos en comparación con la IFI ME lo cual se evidenció al observarse que la IFI ME daba títulos negativos después del tratamiento en los pacientes 4 y 10 (Tabla 1); mientras que, la IFI NHS detectaba aún títulos que también fueron detectados por el Elisa y en un caso por la IP antidesmogleína 1. Adicionalmente, la IFI usando los dos sustratos mostró mayores variaciones en sus títulos relacionadas con el tratamiento que las demás pruebas lo cual estuvo de acuerdo con la presencia de lesiones y con la forma de tratamiento (regular o irregular).

Se observó que los pacientes con anticuerpos antidesmogleína 1 IgG total detectados mediante Elisa mostraron una reducción de los valores índice luego de los seis meses de tratamiento a excepción de un paciente con tratamiento irregular y otro con tratamiento regular que incrementaron sus valores índices. Los que presentaban IgG4 antidesmogleína 1 detectada mediante Elisa redujeron notablemente sus valores índices luego del tratamiento incluidos los que tenían tratamiento irregular con tendencia a la negativización. Similar comportamiento mostraron las demás subclases de IgG (Tabla 2).

De los dos pacientes que presentaban anticuerpos IgM antidesmogleína 1 detectados mediante Elisa, uno continuaba la producción de anticuerpos luego de seis meses de tratamiento. A esto se suma que un paciente, al sexto mes de tratamiento, desarrolló respuesta IgM anti-DSG-1. De este modo, no se observó tendencia a la negativización o reducción de los valores índice de la respuesta.

**Tabla 1.** Evolución de la respuesta antidesmogleína 1 y antidesmogleína 3 de pacientes con pénfigo foliáceo endémico sin tratamiento y al sexto mes de tratamiento con corticosteroides sistémicos.

Paciente	Momento de toma de muestra	Forma clínica	IFI ME	IFI NHS	IP anti-DSG-1	Elisa IgM anti-DSG-1	Elisa IgG anti-DSG-1	IP anti-DSG-3	Elisa IgG anti-DSG-3
▲ 2	Sin tratamiento	Generalizada	1/40	1/1280	++	Negativo	67,88	Negativo	Negativo
▲ 2	Al mes 6 de tratamiento regular	No lesiones	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	29,75	Negativo	29,44
▲ 3	Sin tratamiento	Generalizada	1/320	1/2560	+++	Negativo	101,39	Negativo	Negativo
▲ 3	Al mes 6 de tratamiento irregular	Lesiones activas	1/1280	1/2560	+++	104,80	139,33	Negativo	Negativo
▲ 4	Sin tratamiento	Generalizada	1/160	1/1280	++	Negativo	44,99	Negativo	Negativo
▲ 4	Al mes 6 de tratamiento regular	No lesiones	Negativo	1/80	++	Negativo	50,96	Negativo	Negativo
▲ 10	Sin tratamiento	Localizada	1/640	1/640	++	54,14	117,10	Negativo	164,12
▲ 10	Al mes 6 de tratamiento irregular	No lesiones	Negativo	1/40	Negativo	58,50	59,30	Negativo	38,97
▲ 11	Sin tratamiento	Localizada	1/160	1/320	++	57,85	139,68	Negativo	164,05
▲ 11	Al mes 6 de tratamiento	No lesiones	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

De los dos pacientes que presentaban anticuerpos IgG anti-DSG-3 (Elisa) uno redujo sus valores índices con el tratamiento y el otro se hizo negativo; mientras que un paciente inicialmente negativo desarrolló al final del tratamiento respuesta anti-DSG-3. La IP para anticuerpos anti-DSG-3 fue negativa para los cinco pacientes.

## DISCUSIÓN

En la literatura hay escasos estudios que muestren la evolución de la respuesta inmunopatológica antes y después del tratamiento. En Brasil (Paraná), sí existen estudios que muestran que luego de dos a cuatro décadas de seguimiento, la frecuencia de pacientes que expresan anticuerpos se reduce drásticamente debido a una disminución de la estimulación

antigénica, que se tradujo en remisión de la enfermedad por más de cinco años, probablemente, por efecto de la mejora en la calidad de vida de la población (urbanización).<sup>21</sup>

El presente estudio muestra que el tratamiento tiene un efecto positivo sobre la clínica e inmunología de la enfermedad. Así, los anticuerpos patogénicos IgG4 detectados mediante Elisa muestran una reducción y tendencia a la negativización tanto en los pacientes con tratamiento regular como irregular. Esto coincide con lo observado en el mismo estudio con otras pruebas como la IFI y la IP anti-DSG-1. Si bien es cierto que el Elisa muestra variaciones importantes luego del tratamiento, las mayores variaciones se observan con la IFI y de ellas, pareciera que fuese más sensible la que usa como sustrato piel humana

**Tabla 2.** Evolución de las subclases de IgG (Elisa) de pacientes con PFE antes y al sexto mes de tratamiento con corticosteroides sistémicos.

Paciente	Momento de toma de muestra	Forma clínica	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
▲ 2	Sin tratamiento	Generalizada	96,95	133,36	Negativo	64,73
▲ 2	Al mes 6 de tratamiento regular	No lesiones	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
▲ 3	Sin tratamiento	Generalizada	254,25	42,68	18,43	135,07
▲ 3	Al mes 6 de tratamiento irregular	Escasas lesiones	130,23	19,81	18,12	42,50
▲ 4	Sin tratamiento	Generalizada	90,63	Negativo	Negativo	152,17
▲ 4	Al mes 6 de tratamiento regular	No lesiones	19,97	Negativo	Negativo	86,71
▲ 10	Sin tratamiento	Localizada	51,42	78,31	Negativo	127,64
▲ 10	Al mes 6 de tratamiento irregular	No lesiones	36,25	30,81	Negativo	73,61
▲ 11	Sin tratamiento	Localizada	39,72	202,56	Negativo	140,38
▲ 11	Al mes 6 de tratamiento	No lesiones	Negativo	Negativo	Negativo	Negativa

normal en comparación con la que usa esófago de mono, observándose que la primera de ellas muestra títulos más altos y que detecta anticuerpos contra los espacios celulares que no detecta la que usa esófago de mono lo cual se confirma con el Elisa IgG total y la IP antidesmogleína 1.

Se evidencia la discordancia entre el Elisa y la IP para la detección de anticuerpos anti-DSG-3, lo cual ha sido observado en otros estudios y que ha sido explicado por las bajas concentraciones de anticuerpos patogénicos y predominio de los no patogénicos los cuales no son detectados por la IP 20.

La producción de anticuerpos IgM antidesmogleína 1 ha sido explicada en estudios previos como la respuesta temprana y activa que se produce al exponerse a los factores ambientales presentes en los focos endémicos.<sup>16</sup> El presente estudio muestra que en uno de los dos pacientes en los que fue detectada se mantuvo positiva y que durante el tratamiento un paciente inicialmente negativo desarrolló respuesta IgM anti-DSG-1 lo que implica que a pesar de recibir tratamiento, los pacientes siguen expuestos a los factores ambientales que desencadenan y/o mantienen la respuesta IgM. Es por esta razón y por observaciones clínicas que consideramos conveniente que los pacientes en la medida de sus posibilidades cambien de residencia a áreas urbanas donde el medio ambiente no juegue un rol negativo en la perpetuación de la respuesta autoinmune y persistencia de su enfermedad.

Una limitación del estudio es la pequeña cantidad de sujetos ( $n = 5$ ); sin embargo, el estudio no muestra evaluar una inferencia estadística a la totalidad de los pacientes (que implica una cantidad suficiente de sujetos) sino describir el comportamiento de la respuesta inmunológica frente al tratamiento, la cual muestra un patrón bien definido y que posiblemente no varíe si se incrementase el número de pacientes. Asimismo, el seguimiento prospectivo de los pacientes ha evitado la pérdida de información como ocurre cuando se revisa historias clínicas de los pacientes en tratamiento.

En conclusión, la respuesta antidesmogleína 1 IgG total e IgG4 así como la respuesta antidesmogleína 3 de los pacientes estudiados muestran reducción de sus valores con tendencia a la negativización luego de seis meses de tratamiento, lo que es evidenciado también con la IFI. La respuesta IgM antidesmogleína 1 no mostró variaciones importantes a pesar del tratamiento lo que indica estimulación antigénica permanente en las áreas endémicas.

#### AGRADECIMIENTO

Al Dr. Luis A. Díaz, de la Universidad de Carolina del Norte de Chapel Hill, por su apoyo en el procesamiento de muestras para la caracterización inmunopatológica de los sujetos sanos de áreas endémicas de PFE en Perú.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aranha-Campos J. Invasão do pénfigo foliáceo na América do Sul. *Arq Dermat Sif*. 1952;14:12-20.
2. Hans-Filho G, Aoki V, Rivitti EA, Eaton DP, Lin MS, LA Diaz. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) 1998. *Clin Dermatol*. 1999;17:225-35.
3. Campbell I, Reis V, Aoki V, Cunha P, Hans-Filho G, Alves G, et al. Pénfigo foliáceo endémico/fogo selvagem. *An Bras Dermatol*. 2006;6:13-33.
4. Abreu AM. Pénfigo foliáceo endémico. Situación en Colombia. *Acta Med Colomb* 1996;21:27-34.
5. Hernandez-Perez E. Pemphigus in El Salvador. An eight-year study (1970-1977). *Int J Dermatol*. 1979;18: 645-8.
6. Aldama A. Pénfigo foliáceo endémico en Paraguay (disertación). Buenos Aires: XV Congreso Ibero-Latinoamericano de Dermatología; 2003.
7. González F, Sáenz AM, Cirocco A, Tacaronte IM, Fajardo JE, Calebotta A. Endemic pemphigus foliaceus in Venezuela: Report of two children. *Pediatric Dermatol*. 2006;23:132-5.
8. Kallel Sellami M, Ben Ayed M, Mouquet H, Drouot L, Zitouni M, Mokni M, et al. Anti-desmoglein I antibodies in Tunisian healthy subjects: arguments for the role of environmental factors in the occurrence of Tunisian pemphigus foliaceus. *Clin Exp Immunol*. 2004;137:195-200.
9. Heimgartner E, de Heimgartner V. Experiencias en enfermedades dermatológicas endémicas en la selva peruana: Leishmaniasis y pénfigo foliáceo endémico. *Med Cut ILA*. 1976;1:1-6.
10. Castillo A, Maguina C. Pénfigo foliáceo variedad fuego salvaje en la selva peruana. *Bol Soc Per Med Int*. 1993;6:65-7.
11. Galarza C, Ronceros G, Mendoza D, Sánchez G, Vilcarromero M, Ráez E. Pénfigo foliáceo endémico en el departamento de Ucayali-Perú. Reporte de 16 casos. *An Fac Med (Lima)* 2002;63:19-24.
12. De Amat F, Diaz J. Pénfigo foliáceo endémico en las comunidades de Vista Alegre y San Francisco (Ucayali, Perú) Octubre 2000-septiembre 2001. Lima: Tesis Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2001.
13. Cruz A. Estudio clínico epidemiológico del pénfigo foliáceo endémico en pacientes del Hospital de Yarinacocha-Pucallpa, 1995-2002 [Tesis especialista en Dermatología]. Lima: Universidad Nacional de San Marcos; 2005.
14. Galarza C, Ramos W, Rojas N, Gutierrez LE, Neira E, Ronceros G, et al. Características ultraestructurales de la piel de pacientes con pénfigo foliáceo y vulgar endémico de la Amazonía peruana. Reporte preliminar. *Dermatol Perú*. 2010;20(4):228-35.
15. Chacón GR, Ortega-Loayza AG, Cyr RM. Historical notes on endemic pemphigus foliaceus in South America. *Int J Dermatol*. 2012;51:477-81.
16. Diaz LA, Prisyahin PS, Dasher DA, Li N, Evangelista F, Aoki V, et al. The IgM response distinguishes Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) from other forms of Pemphigus. *J Invest Dermatol*. 2007;128:667-75.
17. Ishii K, Amagai M, Hall RP, Hashimoto T, Takayanagi A, Gamou S, Shimizu N, Nishikawa T. Characterization of autoantibodies in pemphigus using antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay with baculovirus-expressed recombinant desmogleins. *J Immunol*. 1997;159:2010-17.
18. Li N, Aoki V, Hans-Filho G et al. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Exp Med*. 2003;197(11):1501-1510.
19. Amagai M, Komai A, Hashimoto T, Shirakata Y, Hashimoto K, Yamada T, Kitajima Y, Ohya K, Iwanami H, Nishikawa T. Usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmogleins 1 and 3 for serodiagnosis of pemphigus. *Br J Dermatol*. 1999;140(2):351-357.
20. Ortega-Loayza AG, Ramos W, Gutierrez EL, Jimenez G, Rojas I, Galarza C. Endemic pemphigus foliaceus in the Peruvian Amazonia. *Clin Exp Dermatol*. 2012 [Aceptado para publicación].
21. Empinotti JC, Aoki V, Figueira A, Sampaio SAP, Rivitti EA, Sanches JA, et al. Clinical and serological follow up studies of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in western Parana, Brasil (2001-2002). *Br J Dermatol*. 2006;155:446-50.
22. Ramos W, Galarza C, Gutierrez, EL, Jimenez G; Rojas I, Hanco J, Ronceros G, Munive L, Tello M, Vilcarromero Maria, Rojas N, Ortega-Loayza, AG. Epidemiological and immunopathologic characteristics in a cohort of healthy subjects for desmoglein I autoantibodies from endemic areas for endemic pemphigus foliaceus and vulgaris of Peru. *Dermatol Peru*. 2009;19(1):12-21.